

Федеральное государственное унитарное предприятие
“Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов”

На правах рукописи

Прошкин Сергей Александрович

**МЕХАНИЗМЫ КООРДИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ С ТРАНСЛЯЦИЕЙ И
РЕПАРАЦИЕЙ ДНК У *ESCHERICHIA COLI***

03.01.03 - Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
профессор Миронов А.С.

Москва

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
1. Регуляция элонгации транскрипции у бактерий (обзор литературы).....	6
1.1. Структура и функции элонгационного комплекса РНК-полимеразы.....	6
1.1.1. Функциональные участки РНК-полимеразы.....	6
1.1.2. Каталитические активности.....	10
1.1.3. Цикл присоединения нуклеотидов.....	12
1.1.4. Транслокация.....	13
1.2. Регуляция элонгации транскрипции.....	15
1.2.1. Неравномерность элонгации: паузы, терминация и антитерминация транскрипции.....	15
1.2.2. Регуляторные белки.....	25
2. Материалы и методы.....	36
2.1. Материалы.....	36
2.2. Методы.....	42
3. Результаты.....	55
3.1. Координация транскрипции и трансляции.....	55
3.1.1. Скорость транскрипции и трансляции <i>in vivo</i> в различных условиях роста клеток...55	55
3.1.2. Структурные изменения элонгационного комплекса РНК-полимеразы под влиянием рибосомы.....	60
3.1.3. Влияние рибосомы на прохождение РНК-полимеразой участков ДНК, связанных с белками.....	66
3.2. Координация транскрипции и репарации ДНК.....	67
3.2.1. Воздействие фактора Mfd на элонгационный комплекс РНК-полимеразы <i>in vivo</i> ...67	67
3.2.2. Роль фактора UvrD в координации транскрипции и репарации ДНК.....72	72
3.2.3. Участие транскрипционного фактора NusA в координации транскрипции с репарацией ДНК.....	79
4. Обсуждение результатов.....	80
4.1. Модель координации транскрипции с трансляцией.....	80
4.2. Модель координации транскрипции с репарацией ДНК.....	83
5. Выводы.....	86
Список сокращений.....	87
Список литературы.....	88

ВВЕДЕНИЕ

Транскрипция, осуществляемая РНК-полимеразой, - ключевой этап экспрессии генов и клеточной регуляции. Элонгационный комплекс, включающий РНК-полимеразу, матрицу ДНК и синтезируемую РНК, – центральный интермедиат в транскрипционном цикле, который служит конечной мишенью для различных регуляторных белковых факторов и сигналов, закодированных в ДНК и/или РНК. В течение последних нескольких лет было получено много структурных и биохимических данных, которые проливают свет на молекулярные детали функционирования бактериальной РНК-полимеразы [1-4]. Взаимодействие элонгационного комплекса РНК-полимеразы с компонентами других клеточных процессов (трансляции, репликации или репарации ДНК) позволяет координировать транскрипцию с последующими этапами генной экспрессии, лежит в основе механизма поддержания стабильности генома и сопряжения транскрипции с репарацией ДНК [5]. Изучение механизмов, определяющих взаимосвязь этих важнейших молекулярных машин,- актуальная фундаментальная проблема, на решение которой было направлено диссертационное исследование.

Транскрипция и трансляция у бактерий сопряжены в пространстве и во времени. Инициация трансляции большинства бактериальных мРНК начинается вскоре после экспонирования рибосом-связывающего участка (RBS) РНК на выходе из РНК-связывающего канала РНК-полимеразы. Хотя о связи транскрипции и трансляции в бактериях известно уже несколько десятилетий, механизм, лежащий в основе координации этих процессов, был описан лишь для специфических случаев полярного эффекта и аттенюации транскрипции [6]. Остановка трансляции мРНК одного из генов (например, из-за нонсенс-мутации) нарушает экспрессию расположенных за ним генов, входящих в состав той же транскрипционной единицы (полярный эффект). Образующийся в этом случае разрыв между транслирующими рибосомами и РНК-полимеразой дает возможность фактору Rho связать РНК и терминировать транскрипцию [7]. Рибосомы также ответственны за преждевременную терминацию транскрипции в аттенюаторах ряда метаболических оперонов, влияя на образование Rho-независимых терминационных шпилек в РНК [8]. В каждом из этих феноменов эффект рибосомы на РНК-полимеразу опосредован или фактором Rho, или специфической вторичной структурой РНК. В то же время оставался неясен механизм синхронизации скоростей транскрипции и трансляции, которые зависят от скорости роста бактерий в различных условиях [9]. В данной работе мы обнаружили, что транслирующая рибосома напрямую assisteрует РНК-полимеразе в ходе элонгации транскрипции.

Клеточные РНК-полимеразы очень чувствительны к отклонениям в структуре матричной цепи ДНК, и в случае повреждения ДНК транскрипция на этом месте временно или постоянно блокируется [10-11]. Таким образом, РНК-полимераза может служить сенсором, осуществляющим контроль качества ДНК во время транскрипции. Скорость репарации нуклеотидов активно транскрибируемых генов обычно выше, чем нетранскрибируемых участков генома, причем матричная цепь ДНК исправляется быстрее нематричной [12]. Это явление получило название репарации, сопряженной с транскрипцией (transcription-coupled repair, TCR), и описано как путь глобальной эксцизионной репарации нуклеотидов у бактерий и у эукариот [13-14]. В ходе транскрипции РНК-полимераза останавливается на поврежденных участках ДНК. Для исправления повреждения ДНК к соответствующему участку необходим доступ белков системы репарации, поэтому остановленная РНК-полимераза должна быть удалена с матрицы (терминация транскрипции) или отодвинута в сторону от повреждения. Известная на сегодняшний день модель сопряженной с транскрипцией репарации ДНК, у бактерий основана на использовании фактора Mfd, действующего на остановленные элонгационные комплексы РНК-полимераз и терминирующего транскрипцию. Мы обнаружили, что хеликаза UvrD может быть ключевым компонентом альтернативного пути сопряжения транскрипции с репарацией ДНК.

Целью настоящей работы являлось выяснение механизмов взаимосвязи транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК у *Escherichia coli*. В ходе работы решались следующие задачи: определение скорости транскрипции и трансляции в зависимости от генотипа и условий роста клеток; установление влияния транслирующей рибосомы *in vivo* на структурные изменения элонгационного комплекса РНК-полимеразы и эффективность преодоления им белковых препятствий на ДНК-матрице; определение эффектов белков Mfd и UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo*; изучение с использованием генетических подходов влияния различных элонгационных факторов на сопряжение транскрипции с репарацией ДНК.

В результате данного исследования открыты новые механизмы координации транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК у бактерий. В частности, впервые показано, что лидирующая рибосома препятствует спонтанному возвратному смещению РНК-полимеразы в ходе транскрипции *in vivo* и облегчает прохождение РНК-полимеразой участков ДНК, связанных с белками. Функциональное взаимодействие между двумя молекулярными машинами у бактерий позволяет подстраивать транскрипцию к трансляционным потребностям на разных генах в разных условиях роста клетки [15].

Кроме того, впервые обнаружено, что в основе координации транскрипции с репарацией ДНК, лежит UvrD-зависимое возвратное смещение элонгационного комплекса РНК-полимеразы, которое необходимо для экспонирования поврежденной ДНК белкам систем репарации [16]. Наличие гомологов UvrD у эукариот, может свидетельствовать о существовании схожего механизма и у высших организмов.

1. РЕГУЛЯЦИЯ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ У БАКТЕРИЙ

(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Структура и функции элонгационного комплекса РНК-полимеразы

1.1.1. Функциональные участки РНК-полимеразы

Используя нуклеозидтрифосфаты (НТФ) в качестве субстрата, РНК-полимераза синтезирует РНК по матрице ДНК. Минимальный фермент (кóр) РНК-полимеразы, осуществляющий элонгацию транскрипции, у бактерий состоит из четырех субъединиц (β' , β , 2α и ω) массой около 0.4 МДа. В ходе обширных биохимических и генетических исследований локализован активный центр РНК-полимеразы [17-19], а также участки связывания нуклеиновых кислот, необходимых для стабильности элонгационного комплекса [20-24]. Выяснилось, что три остатка аспарагиновой кислоты в консервативном у всех многосубъединичных РНК-полимераз мотиве **NADFDGD** самой большой субъединицы (β') хелатируют каталитический ион Mg^{2+} . Субъединицы β' и β формируют три сайта связывания: 1) сайт связывания дуплекса ДНК из ~10 п.о. перед активным центром, 2) сайт связывания гибридного участка РНК-ДНК длиной 8--9 п.о., образующегося в “транскрипционном пузырьке” из 12--15 п.о. расплавленной ДНК, и 3) сайт связывания одноцепочечного участка РНК, удаленного на ~8—14 нуклеотидов от 3'-конца РНК [25] (рис. 1).

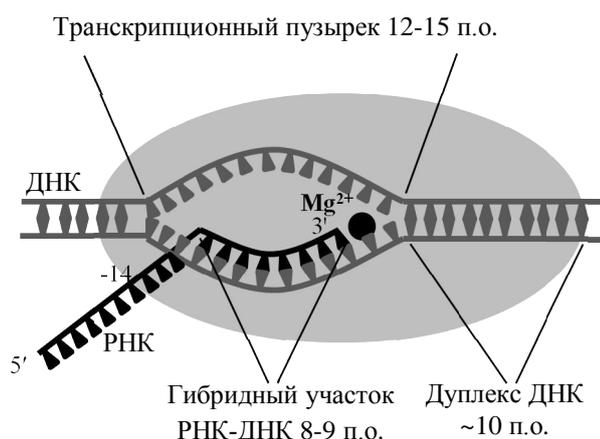


Рисунок 1. Модель элонгационного комплекса РНК-полимеразы. Схематично показано расположение нуклеиновых кислот в составе комплекса, черный кружок символизирует активный центр фермента с каталитическим ионом магния.

Установление пространственной структуры ко́ра РНК-полимеразы *Thermus aquaticus* [26] позволило предложить модель элонгационного комплекса, в котором нуклеиновые кислоты расположены в соответствии с данными, полученных с помощью фотоаффинных сшивок белка с ДНК и РНК [27]. Затем определили пространственную структуру эукариотической РНК-полимеразы II из *Saccharomyces cerevisiae* и обнаружили ее поразительное структурное сходство с бактериальным ферментом как в общем плане строения, так и в относительном расположении функциональных элементов [28-29]. Позже удалось установить пространственные структуры реконструированных элонгационных комплексов РНК-полимеразы *Thermus thermophilus* и дрожжевой РНК-полимеразы II [30-34]. В них нуклеиновые кислоты представлены короткими цепочками ДНК и РНК, полученными химическим синтезом. В этих комплексах РНК частично комплементарна матрице ДНК в пределах неспаренной нуклеотидной последовательности ДНК (искусственного “транскрипционного пузырька”). Информация о молекулярных деталях пространственной организации элонгационного комплекса позволила выделить вероятные структурные элементы РНК-полимеразы, ответственные за стабильность, процессивность и отклик на регуляторные сигналы. Важную особенность РНК-полимеразы представляют подвижные домены, необходимые для катализа и перемещения фермента по матрице ДНК. При построении структурной модели РНК-полимеразы ее домены, а также функционально значимые полипептидные петли получили специальные наименования, основанные с их расположением или предполагаемой функцией (рис. 2).

Выяснилось, что в элонгационном комплексе передний (по ходу движения РНК-полимеразы) дуплекс ДНК располагается в основном канале между субъединицами β' и β . Прямые контакты РНК-полимеразы с участком ДНК из ~10 п.о. образуют функциональный сайт связывания ДНК. Подвижный домен β' , названный “зажимом” (clamp), удерживает ДНК в канале [27, 30, 32].

Вероятно, непосредственно перед активным центром, расположенном в конце основного канала, происходит плавление ДНК (позиция +2, считая от нуклеотидсвязывающего участка в положении +1) [30, 35]. Полипептидная петля субъединицы β , “петля вилки-2” (fork loop-2, аминокислотные остатки 413-451 в РНК-полимеразе *T. thermophilus*) стерически блокирует дальнейшее поступление спирали ДНК в активный центр, играя, по-видимому, главную роль в расплетании дуплекса ДНК и поддержании переднего края транскрипционного пузырька. В этом месте ДНК изгибается под углом ~90°, и далее формируется гибридный участок РНК-ДНК длиной 8-9 п.о. [21, 30, 32-33]. Гибрид РНК-ДНК полностью укрыт в канале, стенки которого

образованы субъединицами β' и β . Доступ к активному центру через основной канал заблокирован нуклеиновыми кислотами. Однако под активным центром располагается вторичный канал (secondary channel), который очевидно служит для поступления нуклеотидов к каталитическому участку и связыванию 3'-концевого одноцепочечного участка РНК при возвратном смещении фермента (см. ниже). Вторичный канал имеет вид воронки, постепенно сужаясь в направлении активного центра (рис. 2).

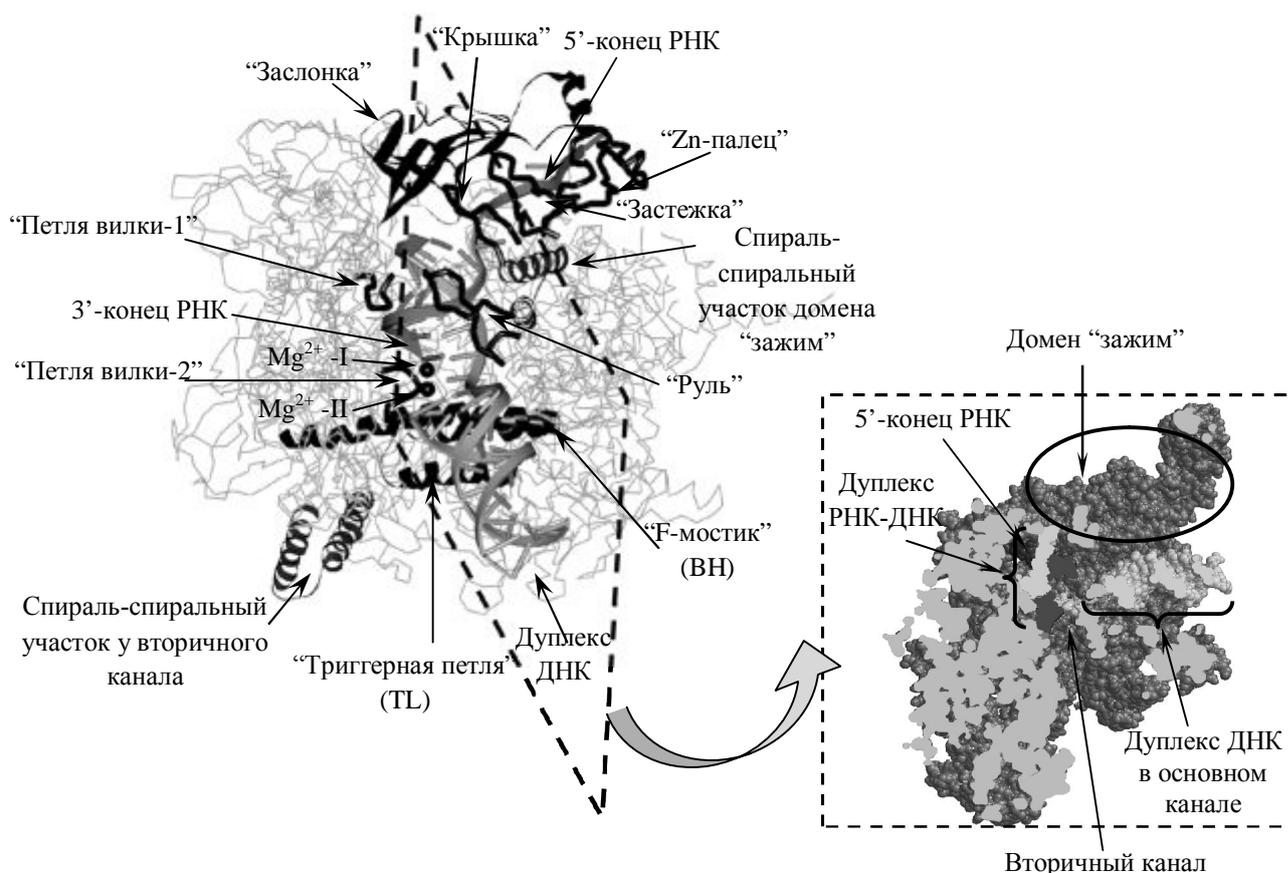


Рисунок 2. Структура элонгационного комплекса РНК-полимеразы *Thermus thermophilus*. Выделены функциональные мобильные элементы белковой структуры, которые могут играть ключевую роль в цикле присоединения нуклеотидов, поддержании транскрипционного пузыря и во взаимодействии с РНК и дуплексом РНК-ДНК. Расположенные в активном центре фермента ионы магния показаны сферами. Также отмечены спираль-спиральные домены, взаимодействующие с элонгационными факторами (см. текст далее). Справа представлено сечение атомной модели элонгационного комплекса вдоль оси основного канала. Отмечено положение основного и вторичного каналов, а также дуплексов ДНК и РНК-ДНК. Рисунки подготовлены с помощью программ Accelrys DS-Visualizer и RasMol, с использованием координат атомов элонгационного комплекса (номер депонирования 2O5J) из Банка белковых структур (Protein Data Bank) (см. также [30-31]).

После синтеза 9 н. цепь РНК отделяется от ДНК. Петля β' -субъединицы, названная “крышкой” (lid, аминокислотные остатки 525-539), стерически препятствует образованию более протяженного гибрида РНК-ДНК, облегчая вытеснение РНК [33, 36-39]. Восстановление дуплекса ДНК на заднем крае транскрипционного пузырька также вносит вклад в отделение РНК [36, 39]. В стабилизацию гибридного участка вовлечены, вероятно, еще петля “руль” (rudder, аминокислотные остатки 582-602) β' -субъединицы [40] и “петля вилки-1” (fork loop-1, аминокислотные остатки 387-395) β -субъединицы. Три полипептидные петли “крышка”, “руль” и “петля вилки-1” образуют сеть межмолекулярных взаимодействий как между собой, так и с нуклеиновыми кислотами, формируя задний край транскрипционного пузырька [30]. Структурные элементы РНК-полимеразы у обоих концов гибридного участка РНК-ДНК обеспечивают поддержание постоянной его длины в ходе элонгации транскрипции.

Петля β' “крышка” (lid) и участок β “седловина” (saddle) формируют узкую пору, через которую проходит одноцепочечная РНК после отделения от гибрида РНК-ДНК [30, 32-33]. Далее растущая цепь РНК попадает в более широкий канал между доменами β' “застежка” (zipper, аминокислотные остатки 26-47) и “цинковый палец” (аминокислотные остатки 51-83) с одной стороны и доменом β “заслонка” (flap, аминокислотные остатки 703-830) с другой (рис. 2). Эти элементы РНК-полимеразы, по-видимому, вовлечены в узнавание сигналов терминации и антитерминации, а также пауз, зависящих от шпильки в РНК [41-43].

Предполагается, что все три участка связывания нуклеиновых кислот аллостерически взаимодействуют с активным центром фермента, модулируя каталитические свойства РНК-полимеразы. Очевидно, что эти функциональные участки наряду с вторичным каналом могут служить мишенями для регуляторных факторов элонгации/терминации.

Из-за проблем с кристаллизацией РНК-полимеразы *E. coli* пространственные структуры высокого разрешения для этого фермента недоступны. Применение крио-электронной микроскопии позволило провести структурный анализ РНК-полимеразы *E. coli* лишь с разрешением 15Å [44]. Поскольку субъединицы РНК-полимераз высоко консервативны в эволюции, то, вероятно, большая часть третичной структуры РНК-полимеразы *E. coli* очень схожа, если не идентична, с известной структурой РНК-полимераз из термофильных бактерий [45]. Однако большие субъединицы β' и β *E. coli* и *Thermus* содержат протяженные включения аминокислотных последовательностей (>40 а.о.), не являющиеся общими между этими видами и отсутствующие в других видах бактерий. Многие из этих доменов могут быть вовлечены в белковые взаимодействия и играть регуляторную роль. Поскольку большая часть наших

фундаментальных знаний о бактериальной транскрипции основана на генетических и биохимических исследованиях в *E. coli*, информация о структуре РНК-полимеразы из этого модельного организма представляет большой интерес. Сочетание различных экспериментальных подходов (рентгенологический анализ отдельных фрагментов РНК-полимеразы, предсказание структуры *ab initio*, моделирование по гомологии и крио-электронная микроскопия) позволило недавно предложить наиболее полную на сегодняшний день модель РНК-полимеразы *E. coli* [46].

1.1.2. Каталитические активности

В ходе матричного синтеза РНК-полимераза катализирует нуклеофильную атаку 3'-гидроксила растущей цепи РНК на α -фосфат поступающего NTP, в результате чего происходит включение очередного нуклеотида в цепь РНК и высвобождение пирофосфата. Активный центр фермента содержит участок связывания 3'-конца РНК (*i*-сайт) и участок связывания поступающего NTP (*i*+1-сайт). За образованием фосфодиэфирной связи следует транслокация вновь образованного 3'-конца РНК из *i*+1-сайта в *i*-сайт, при этом *i*+1-сайт освобождается для поступления нового NTP (посттранслокационное состояние). Вместе с этим происходит разъединение пары оснований в переднем дуплексе ДНК, образование пары оснований в заднем дуплексе и разъединение последней пары оснований в гибриде РНК-ДНК [2].

Кроме основной реакции синтеза РНК в том же самом активном центре при определенных условиях могут протекать и реакции деградации РНК [47]. В случае смещения РНК-полимеразы назад на один нуклеотид против хода транскрипции, 3'-конец РНК снова оказывается в *i*+1-сайте (претранслокационное состояние). В этом положении невозможно удлинение РНК, но возможна реакция пирофосфоролиза либо экзонуклеазное отщепление 3'-концевого нуклеотида. Кроме того, РНК-полимераза способна к возвратным смещениям (backtracking) сразу на несколько нуклеотидов (рис. 3). При этом 3'-конец РНК покидает активный центр фермента, а 3'-концевые нуклеотиды вытесняются из гибридного участка с ДНК. Одновременно происходит возвратное смещение транскрипционного пузырька. В таких ситуациях фермент сохраняет прочную связь с матрицей ДНК и РНК-продуктом, но теряет способность к синтезу РНК [21, 48-49]. Небольшие смещения (на 2-3 нт.), как правило, обратимы и приводят к паузам в транскрипции. Осциллирующая РНК-полимераза способна вернуться в активное состояние, в котором 3'-конец РНК расположен в активном центре. При более далеком возвратном смещении (до 18 нт.) происходит перманентная остановка транскрипции. Элонгационный комплекс инактивируется, образуя тупиковый комплекс (arrested). В таком комплексе 3'-конец РНК из активного центра проходит во вторичный канал РНК-полимеразы. Выступающий 3'-

концевой фрагмент РНК может удаляться эндонуклеазным расщеплением фосфодиэфирной связи, против которой оказался активный центр. Реакции гидролиза значительно стимулируются факторами GreA или GreB [50]. В результате 3'-конец РНК снова занимает i-сайт и фермент приобретает способность присоединять нуклеотиды. Эти ферментативные реакции играют большую роль в регуляции элонгации транскрипции и контроле точности синтеза РНК.

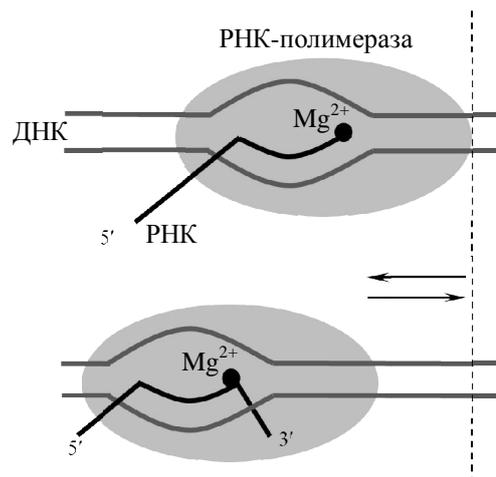


Рисунок 3. Возвратное движение РНК-полимеразы в элонгации транскрипции. Схематично показана структура активного элонгационного комплекса (вверху) и комплекса, смещенного назад (внизу).

В активном центре РНК-полимеразы находятся два каталитических иона магния, расположенные на расстоянии 5-6 Å друг от друга [29, 31, 47, 51]. Один ион Mg^{2+I} постоянно связан тремя остатками аспарагиновой кислоты β' -субъединицы (D739, D741 и D743). Его роль заключается в активации 3'-концевой ОН-группы РНК и координации α -фосфатной группы присоединяемого нуклеотида. Второй ион Mg^{2+II} не связан постоянно, а поступает в активный центр вместе с субстратом NTP (при синтезе РНК) или с другими лигандами, такими как пирофосфат (при фосфороллизе) или некомплементарными NTP (при экзонуклеазном расщеплении). Mg^{2+II} прямо связан с D739 β' , а также через молекулы воды с D741 β' и E685, D686 β [31]. Во время синтеза РНК (или обратной реакции пирофосфоролиза) Mg^{2+II} координирует α -, β - и γ -фосфаты NTP в пространственном расположении, нужном для нуклеофильной атаки 3'-концевого гидроксила на α -фосфат. При эндонуклеазном расщеплении РНК два консервативных кислых аминокислотных остатка Gre-белков, по-видимому,

непосредственно участвуют в координации Mg^{2+} и атакующей молекулы воды для стабилизации пентавалентного переходного состояния фосфата [52-54].

Установление пространственных структур РНК-полимеразы, связанной с субстратом или его аналогом, позволило выявить каталитически активный сайт (i+1) связывания поступающего NTP (insertion site), а также перекрывающиеся с ним дополнительные, каталитически неактивные сайты связывания (preinsertion sites) [31]. Таким образом, связывание NTP в активном центре фермента происходит, вероятно, через ряд промежуточных состояний, позволяющих отбирать правильный субстрат перед его включением в растущую цепь РНК [31, 33-34].

Активный центр РНК-полимеразы содержит два подвижных домена: F-мостик (α -спиральный мостик, VH) и триггерную петлю (TL) (рис. 2). Оба структурных элемента белка играют существенную роль в связывании NTP и транслокации. В установленных пространственных структурах РНК-полимеразы удалось зафиксировать несколько различных конформаций TL. В отсутствие субстрата TL находится преимущественно в “открытой”, развернутой конформации. Однако при связывании в (i+1)-сайте правильного NTP происходит ее сворачивание в две α -спирали [31]. В такой “закрытой” конформации TL образует сеть контактов с функциональными мотивами NTP, обеспечивая его связывание по механизму индуцированного соответствия. Эти контакты определяют химическую природу субстрата и правильность образования пары с основанием ДНК в положении i+1.

1.1.3. Цикл присоединения нуклеотидов

До загрузки субстрата в активный центр фермента элонгационный комплекс, вероятно, осциллирует между посттранслокационным состоянием (i+1), готовым к синтезу РНК, и неактивными претранслокационным (i) и возвратным (backtracking) состояниями [55]. В активном состоянии (i+1)-сайт открыт для связывания следующего субстрата, в то время как при возвратном смещении он занят РНК. Связывание NTP происходит, вероятно, в два этапа. Сначала нуклеотид попадает в каталитически неактивный сайт связывания, где устанавливается Уотсон-Криковское взаимодействие с комплементарным основанием нуклеотида матричной ДНК. В этом сайте фосфаты NTP и второй ион магния находятся слишком далеко от первого иона магния для протекания каталитической реакции [31, 33]. Здесь осуществляется первый этап отбора субстрата. Затем индуцируемое подходящим NTP сворачивание TL в α -спиральную шпильку (триггерную спираль, TH) приводит к изомеризации элонгационного комплекса в

каталитически активное состояние, в котором активный центр закрыт [31, 56]. NTP действует как храповик, который стабилизирует посттранслокационное состояние фермента. Возникновение сети взаимодействий NTP и белка фиксирует субстрат в активном центре фермента и ориентирует его должным образом для осуществления катализа. Здесь происходит второй, более строгий этап отбора субстрата. Последующая каталитическая реакция приводит к удлинению РНК и высвобождению пирофосфата. Возможно, что освобождение пирофосфата дестабилизирует закрытую конформацию активного центра, приводя к разворачиванию TL. Передвижение нуклеиновых кислот относительно фермента переводит элонгационный комплекс в посттранслокационное состояние, завершая цикл присоединения нуклеотидов [31].

При температурах меньше 37°C РНК-полимераза из термофильных бактерий *T. aquaticus* транскрибирует матрицу ДНК значительно медленнее, чем РНК-полимераза из ближайших родственных мезофильных бактерий *Deinococcus radiodurans* [57]. Выяснилось, что отчасти за это различие ответствен структурный элемент РНК-полимеразы “F-петля” (FL), расположенная рядом с N-концевым участком ВН и непосредственно контактирующая с ТН [58]. Результаты исследований указывают на то, что FL РНК-полимеразы способствует сворачиванию TL в ходе присоединения нуклеотидов [58]. Анализ взаимодействия TL и FL демонстрирует адаптивную роль тройного структурного элемента TL-FL-ВН при различных каталитических активностях термофильной и мезофильной РНК-полимераз [59].

1.1.4. Транслокация

Сравнение пространственных структур минимального фермента бактериальной РНК-полимеразы [26] и РНК-полимеразы II [29] дрожжей позволило предположить, что конформационная перестройка в средней части ВН способствует транслокации. Так, во впервые полученной структуре кора РНК-полимеразы *T. aquaticus* ВН согнут из-за разворачивания средней части α -спирали, в то время как в РНК-полимеразе II ВН имеет однородную α -спиральную конформацию. Передний край гибридного участка РНК-ДНК упирается в ВН, и возможное локальное движение ВН сопровождается перемещением нуклеиновых кислот в ходе транслокации. В определенной впоследствии структуре холофермента РНК-полимеразы *T. thermophilus* центральная часть ВН имеет выпетливание (flip out) из двух аминокислотных остатков (в отличие от частично развернутой спирали в первой установленной структуре кора) и контактирует с TL [51]. Функциональная связь ВН и TL, а также способность ВН менять свою конформацию показана в биохимических опытах [60-61]. Так, мутации в TL влияют на

конформацию ВН, транслокацию, точность синтеза и ответ на регуляторные сигналы и факторы [61]. Изменения в ВН при этом наблюдали с помощью фотоаффинных сшивок РНК с белком. Существование альтернативных конформаций ВН (прямая или с выпетливанием) подтверждено также в других структурах холофермента РНК-полимеразы [62].

Во всех известных на сегодняшний день структурах элонгационного комплекса РНК-полимеразы бактерий (*T. thermophilus*) ВН находится в виде однородной α -спирали (“прямая” конформация) [30-31], поэтому нет достаточной структурной информации о конформационном переходе ВН в ходе элонгации. При этом, как отмечалось выше, удалось выявить структурную перестройку ТЛ, вызванную связыванием подходящего NTP. Переход ТЛ в α -спиральную конформацию “запирает” активный центр и может способствовать транслокации вперед, просто предотвращая возвратное смещение [31, 63].

В установленной структуре связанного с α -аманитином элонгационного комплекса РНК-полимеразы II дрожжей, фермент стабилизирован в новом конформационном состоянии [64]. В нем центральная часть ВН смещена на 2.5 Å по направлению к переднему краю гибрида РНК-ДНК, занимая положение +1 матричного нуклеотида. При этом основание ДНК, входящее в активный центр, располагается над ВН в “предматричном” (pretemplating) участке. Аминокислотный остаток L1081 (*Saccharomyces cerevisiae*) ТЛ формирует “клин” к ВН, тем самым стабилизируя его смещенное положение. Возможно, такая конформация элонгационного комплекса представляет промежуточную стадию между пре- и посттранслокационным состоянием фермента. Соответствующий L1081 аминокислотный остаток ТЛ в бактериальной РНК-полимеразе (M1238 у *T. thermophilus*) занимает сходное положение в структурах холофермента РНК-полимеразы *T. thermophilus* [51] и РНК-полимеразы *T. aquaticus*, связанной с антибиотиком [65]. В этих структурах ВН имеет выпетливание в участке, который смещен в транслокационном интермедиате РНК-полимеразы II дрожжей. Эти данные позволили предложить двухстадийный механизм транслокации у всех многосубъединичных РНК-полимераз через переходное состояние, стабилизированное ТЛ, со смещением центральной части ВН [64, 66]. Однако реализуется ли такое конформационное состояние в ходе элонгации у бактерий, еще предстоит выяснить.

Считается, что для транслокации нуклеиновых кислот не требуется ничего, кроме броуновского и собственного теплового движения. Связывание NTP, сопряженное с координированными конформационными изменениями в ВН и ТЛ, приводит к пошаговому движению фермента вперед и включению очередного нуклеотида.

1.2. Регуляция элонгации транскрипции

1.2.1. Неравномерность элонгации: паузы, терминация и антитерминация транскрипции

Продвижение РНК-полимеразы по матрице ДНК происходит неравномерно. В ходе элонгации этот фермент может делать временные остановки (паузы), прекращать движение (арест, перманентная остановка) или терминировать синтез РНК (с освобождением РНК и ДНК) в ответ на регуляторные воздействия со стороны белковых факторов и/или сигналов, закодированных в ДНК и РНК. Неравномерность процесса элонгации позволяет точно соотносить синтез РНК с ее последующим использованием.

Описаны два типа временных задержек в элонгации: (1) паузы, зависящие от шпильчатых структур РНК, и (2) паузы, вызванные возвратным смещением РНК-полимеразы (backtracking) [67]. В первом случае сигналом служит шпилька в РНК, образующаяся на расстоянии 10-12 нт. от 3'-конца РНК, в окружении специфических нуклеотидных последовательностей [68]. Такого рода паузы обнаружены в лидерных участках некоторых метаболических оперонов [8, 69]. Было сделано предположение, что шпилька аллостерически передает сигнал к активному центру, взаимодействуя с доменом “заслонка” (flap) β -субъединицы РНК-полимеразы [70]. Смещение этого домена приводит, возможно, к изменению в окружении 3'-конца РНК и приостановке транскрипции. Недавно были установлены пространственные структуры элонгационных комплексов РНК-полимераз *Thermus* (*Taq* и *Tth*), имитирующих паузу в *his* опероне *E. coli* [71]. РНК-полимераза в полученных комплексах подвержена сопряженным конформационным изменениям, которые приводят к открытию домена “зажим” (clamp), сгибанию ВН и уширению РНК-связывающего канала.

Однако одной лишь шпильчатой структуры РНК обычно недостаточно для возникновения паузы. Действительно, например, стабильные терминаторные шпильки сами по себе не приостанавливают элонгацию [72], в то время как для паузы достаточно политимидиновой последовательности. Вероятно, более распространен второй тип пауз с возвратным смещением РНК-полимеразы [5, 73] (рис. 3). Для пауз такого рода не требуется какая-то специфическая структура РНК или последовательность нуклеотидов. Образование сдвинутых назад против хода транскрипции элонгационных комплексов, вероятно, определяется главным образом свободной энергией пар оснований в гибридном участке РНК-ДНК, дуплексе ДНК, фланкирующем транскрипционный пузырек, и в РНК непосредственно после выхода из фермента [5, 21, 74]. Структурные основы отката РНК-полимеразы установлены совсем

недавно для дрожжевой РНК-полимеразы II [75]. В полученном тупиковом комплексе РНК-полимеразы II 3'-концевой участок РНК из 8 нт. образует контакты с аминикислотными остатками во вторичном канале, а также с ТL. Триггерная петля при этом принимает конформацию, несовместимую с элонгацией транскрипции. По сравнению с активным элонгационным комплексом гибридный участок РНК-ДНК в тупиковом комплексе подрасплетен и наклонен в сторону ВН. Обширная сеть взаимодействий РНК-белок, по-видимому, обеспечивает дополнительную стабилизацию такого комплекса [75].

По-видимому, существует общий неактивный интермедиат для обоих типов пауз, из которого элонгационный комплекс может либо сместиться назад, либо остаться в конформации, стабилизированной шпилькой [43, 61]. Образование такого интермедиата обусловлено, по-видимому, изменением конформации модуля ВН/ТL, что препятствует связыванию подходящего субстрата в (i+1)-сайте и ингибирует перемещение вперед [31, 56, 61, 63-64]. Формирование сходных неактивных комплексов обнаружено и в ходе терминации транскрипции как необходимая стадия перед диссоциацией элонгационного комплекса с высвобождением нуклеиновых кислот [42, 76].

Терминация транскрипции. Терминаторы разделяют опероны на независимые транскрипционные единицы, контролируют экспрессию генов в опероне и обеспечивают рециркуляцию РНК-полимераз для последующих циклов транскрипции. У бактерий известно два вида терминации транскрипции: фактор-независимая (intrinsic termination) и фактор-зависимая. Сигналом для терминации первого типа служит стабильная шпилька в РНК (обычно G/C-богатая), за которой следует полиуридиловая последовательность. Одной такой структуры достаточно для диссоциации элонгационного комплекса *in vitro*. В терминации второго типа принимают участие белковые факторы и отсутствует какая-то определенная специфическая последовательность в месте терминации. Обнаружены два бактериальных белка, осуществляющих терминацию: Rho и Mfd. На основании анализа нуклеотидной последовательности генома у *Escherichia coli* предсказано, что примерно половина оперонов имеет фактор-независимые терминаторы. Для терминации транскрипции оставшейся части генов используется, по-видимому, фактор Rho. Другой фактор, Mfd, участвует в освобождении РНК-полимеразы, остановленной в местах повреждений ДНК, и будет рассмотрен нами отдельно. В последние годы стали известны многие детали механизмов терминации транскрипции.

В результате биохимического анализа фактор-независимой терминации установили основные стадии, ведущие к диссоциации элонгационного комплекса (рис. 4). Сначала РНК-полимераза делает паузу, обусловленную ее возвратным смещением из-за политимидинового участка [72]. Задержка в элонгации дает время, необходимое для начала формирования шпильчатой структуры в РНК. Сформировавшись, шпилька инактивирует элонгационный

Терминация транскрипции

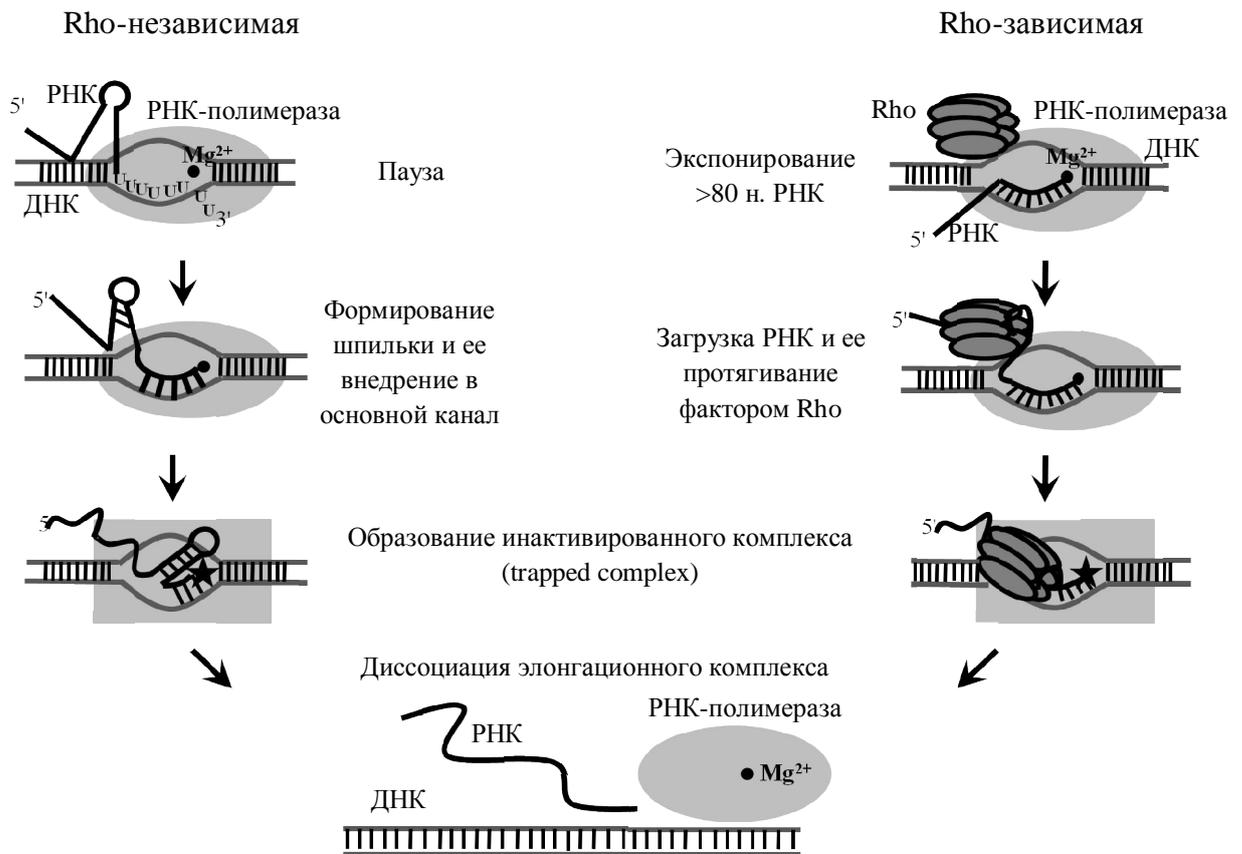


Рисунок 4. Модель терминации транскрипции. Представлены возможные основные этапы Rho-независимой и Rho-зависимой терминации.

комплекс, вытесняет РНК из РНК-связывающего канала и расплетает заднюю часть гибридного участка РНК-ДНК [72, 77]. Чтобы объяснить, как простая последовательность фактор-независимого терминатора приводит к разрушению ключевых контактов РНК-полимеразы с РНК и ДНК, первоначально предложили “транслокационную” модель [78-79]. В соответствии с ней для диссоциации нуклеиновых кислот на терминаторе необходимо перемещение РНК-

полимеразы по ходу движения. Однако эта модель не объясняет, например, каким образом проходила бы транслокация фермента вперед без синтеза РНК. Позже на основе анализа фотоаффинных сшивок РНК с РНК-полимеразой предложили альтернативную “аллостерическую” модель терминации [42]. По-видимому, в ферменте происходят крупные конформационные перестройки, вызванные образующейся терминационной шпилькой. Подвижные части РНК-связывающего канала (“застежка”, “цинковый палец” и “заслонка”) облегчают начальный этап сворачивания шпильки (нуклеация). Эти взаимодействия также могут аллостерически индуцировать сворачивание ТЛ фермента, вызывая временную остановку РНК-полимеразы в претранслокационном состоянии [63]. По мере своего формирования (более 4-5 п.о.) шпилька, вероятно, внедряется в основной канал с неизбежным плавлением гибрида РНК-ДНК. Рост стебля (основания) шпильки приводит к прямому контакту ее головки (петли и верхней части стебля) с ТЛ, вызывая изменение конформации ТЛ. Это взаимодействие возможно в результате либо оборачивания шпильки вокруг нематричной цепи ДНК, либо вытеснения шпилькой переднего дуплекса ДНК [42]. Сворачивание ТЛ в “закрытое” состояние, индуцированное шпилькой, может ингибировать связывание субстрата и “запирать” РНК-полимеразу в неактивном претранслокационном состоянии. Кроме того, движение ТЛ, составляющей основание ДНК-связывающего “зажима” (clamp) предположительно вызывает перемещение других структурных элементов (например, “вилка-2” субъединицы β) и приводит к одновременному открыванию “зажима”. При этом разрываются все основные контакты нуклеиновых кислот с РНК-полимеразой. Сходная стратегия (быстрая инактивация и последующая диссоциация элонгационного комплекса), по-видимому, используется и в случае Rho-зависимой терминации [76].

Фактор Rho - гомогексамерный белковый комплекс с АТФ-зависимой РНК/ДНК-хеликазной активностью. Согласно классическим моделям, Rho связывается с нетранслируемыми цитидин-богатыми участками РНК с неразвитой вторичной структурой (так называемые rut-сайты) и двигается по ней в 5' → 3'-направлении до тех пор, пока не достигнет РНК-полимеразы [80]. Кинетика, т.е. скорость движения РНК-полимеразы, - важный параметр, определяющий сайты терминации, многие из которых совпадают с участками пауз в транскрипции.

Недавно *in vitro* обнаружили, что Rho может прямо связываться с РНК-полимеразой, т.е. для первичного взаимодействия с Rho в принципе не требуется цепь синтезируемой РНК [76]. Кроме того, в комплексе с РНК-полимеразой Rho меняет распределение пауз в транскрипции, что указывает на его роль в элонгации. Связавшись с РНК-полимеразой *in vitro*, один и тот же

гексамер Rho участвует в элонгации и последующей терминации, не вытесняясь другими молекулами Rho. Это позволило предположить, что Rho может быть ассоциирован с РНК-полимеразой с самого начала транскрипционного цикла. Как только РНК становится достаточно длинной и Rho имеет возможность захватить ее, он протаскивает ее через себя, используя энергию гидролиза АТФ [76]. В опытах с иммунопреципитацией хроматина обнаружено, что *in vivo* Rho локализуется вместе с элонгационным комплексом РНК-полимеразы сразу после инициации транскрипции [81].

С момента своего открытия [81] Rho был предметом многих биохимических и структурных исследований, в результате которых стали известны детали загрузки РНК в фактор Rho и механизм транслокации [82]. Однако каким образом Rho вызывает разрушение элонгационного комплекса, долгое время не могли понять. Для описания механизма терминации предложено несколько моделей. Модель “наматывания на катушку” (spooling) предполагает вытягивание РНК из элонгационного комплекса с использованием АТФ-зависимой активности [83]. Хотя Rho способен прилагать силу более 200 пН [84], сила, необходимая для разворачивания гибридного участка в элонгационном комплексе РНК-полимеразы неизвестна [80]. Другой вариант – перемещение РНК-полимеразы вперед без синтеза РНК с укорочением гибрида РНК-ДНК (forward translocation) [85]. Ингибирование Rho-зависимой терминации мутациями, предотвращающими восстановление дуплекса ДНК в верхнем участке транскрипционного пузырька, согласуется с этой гипотезой [85]. В то же время эффект на терминацию от изменения нуклеотидного состава в переднем дуплексе ДНК и гибридном участке РНК-ДНК свидетельствует против этих двух моделей [76]. Недавно появились доказательства в пользу альтернативной аллостерической модели терминации [76] (рис. 4). Оказалось, что быстрая инактивация элонгационного комплекса – критический скорость-лимитирующий этап, определяющий положение места терминации. Нахождение контактов 3'-конца РНК с помощью фотоаффинных сшивок выявило его взаимодействие с разными частями ТЛ в случае инактивированного и активного элонгационного комплекса [76]. Очевидно, Rho вызывает конформационные изменения в ТЛ, приводящие к инактивации комплекса и открыванию домена “зажим”. В результате, как и в случае фактор-независимой терминации, теряются основные контакты РНК-полимеразы с нуклеиновыми кислотами и происходит дестабилизация элонгационного комплекса. Вероятно, Rho внедряется в основной канал и расплетает гибридный участок РНК-ДНК, напоминая вхождение терминаторной шпильки. В пользу предположения о ключевой роли конформационного состояния ТЛ свидетельствуют данные о том, что мутации в этом домене влияют на эффективность терминации. Кроме того, тагетитоксин (антибиотик, связывающийся с ферментом вблизи активного центра и

стабилизирующий “свернутую”, или “закрытую” конформацию TL) подавляет терминацию. Мутация в другом домене, “крышка” (lid), вовлеченном в отделение РНК от ДНК на заднем крае гибридного участка РНК-ДНК, ингибирует терминацию [76]. Возможно, что Rho может взаимодействовать с этим доменом и аллостерически передавать сигнал на активный центр. Структурно-функциональное сходство протекания фактор-независимой и ρ -зависимой терминации говорит в пользу единого аллостерического механизма терминации транскрипции с первоначальной инактивацией элонгационного комплекса и последующей его диссоциацией.

Для фактор-независимой или Rho-зависимой терминации транскрипции *in vitro* достаточно сигнала терминации, кодируемого нуклеиновыми кислотами, или одного фактора Rho соответственно. Однако *in vivo* в терминацию вовлечены дополнительные факторы, например общие факторы элонгации NusA и NusG, незаменимые у *E. coli* [3].

Активностью фактора Rho обусловлен давно известный эффект полярности, при котором нонсенс-мутация в одном гене препятствует транскрипции следующих за ним генов этого оперона. Диссоциация рибосом на стоп-кодоне позволяет Rho связать РНК и воздействовать на элонгационный комплекс РНК-полимеразы. Это же объясняет, почему Rho-зависимая терминация обычно происходит в конце гена, хотя потенциальные rut-сайты распределены по всей транскрибируемой последовательности. Неспособность Rho терминировать транскрипцию некодирующих РНК обусловлена, вероятно, действием специальной системы антитерминации, а также отчасти сложной структурой самой РНК. Таким образом, Rho может препятствовать накоплению РНК, не используемой трансляционным аппаратом клетки или не включаемой в РНК-белковые комплексы. Недавно обнаружили, что в *E. coli* фактор Rho участвует в репрессии генов профагов и других инсерций чужеродных ДНК в бактериальный геном, приобретенных в результате горизонтального переноса [86]. Оказалось, что штамм MDS42 *E. coli* с уменьшенным на 14% геномом [87], из которого направленно удалены профаги, IS-элементы и кластеры K-островков, значительно более устойчив к ингибитору ρ бицикломицину, чем исходный штамм K-12. Хотя в штамме MDS42 фактор Rho по-прежнему остается жизненно важным белком, клетки этого штамма сохраняют жизнеспособность при повреждении его кофакторов NusA и NusG. Удаление профага *rac* в штамме дикого типа увеличивает устойчивость бактерий к бицикломицину и приводит к сохранению его жизнеспособности при повреждении гена *nusG*. Таким образом, Rho-зависимая терминация защищает клетки *E. coli* от токсического действия чужеродных генов [86]. Кроме того, Rho и NusG *E. coli* супрессируют повсеместную антисмысловую транскрипцию [88]. Интересно отметить, что в клетках *Bacillus subtilis* содержание Rho невелико и составляет меньше 5% от

его количества в *E. coli*. В отличие от кишечной палочки в клетках *B. subtilis* факторы Rho и NusG не относятся к существенным белкам, тогда как NusA необходим для жизни клетки независимо от действия Rho [89].

Регуляция терминации транскрипции. Принятие решения о диссоциации элонгационного комплекса или продолжении транскрипции - важный этап контроля экспрессии генов. В бактериях можно условно выделить два механизма регуляции терминации транскрипции: аттенуацию и процессивную антитерминацию.

Аттенуация транскрипции, что подразумевает преждевременную терминацию, широко используемая в бактериях стратегия регуляции экспрессии генов [90]. В ответ на специфический метаболический сигнал транскрипция либо терминируется в лидерной части соответствующего оперона, либо продолжается в область структурных генов. В случае с регуляцией Rho-независимой терминации транскрипции в РНК часто может возникать альтернативная терминаторной шпильке структура, названная антитерминатором. Антитерминатор включает участок РНК, входящий в состав терминаторной шпильки, так что эти две структуры взаимоисключаемые. Регулирование образования конкурирующих структур в РНК влияет на формирование терминаторной шпильки, т.е., в конечном итоге, на терминацию транскрипции. Есть примеры, когда в РНК может образоваться анти-антитерминаторная структура. В случае ее реализации блокируется образование антитерминатора, формируется терминаторная шпилька и происходит терминация. Формирование альтернативных структур в РНК может определяться транслирующей рибосомой, регуляторными белками, тРНК или низкомолекулярными лигандами. Rho-зависимая терминация регулируется доступностью синтезируемой РНК и/или РНК-полимеразы для фактора Rho, а также изменением чувствительности элонгационного комплекса к паузам.

У многих бактерий опероны, связанные с метаболизмом аминокислот, регулируются с помощью транслирующей рибосомы [91]. В лидерных РНК в этих случаях закодированы короткие пептиды, включающие несколько остатков той аминокислоты, биосинтез которой определяется опероном. Задержка рибосомы на кодонах аминокислот, которые необходимо синтезировать, приводит к формированию альтернативных шпилечных структур РНК (рис. 5а). Классическим примером служит аттенуация триптофанового оперона у *E. coli*. При дефиците триптофана и, следовательно, соответствующих аминокислотированных тРНК^{Trp} рибосома останавливается на кодонах триптофана, что позволяет сформироваться антитерминаторной шпильке РНК. Поскольку в этом случае терминаторная шпилька не образуется, транскрипция продолжается в область структурных генов. Другой важный элемент здесь - образование перед

антитерминатором шпильки, вызывающей паузу в транскрипции. Пауза позволяет синхронизировать транскрипцию лидерной части оперона с его трансляцией.

В аттенюации триптофанового оперона у *B. subtilis* используется другой механизм. Первичным регулятором транскрипции служит не рибосома, а РНК-связывающий белок TRAP (*trp* **R**NA-binding **A**ttenuation **P**rotein), который взаимодействует также с триптофаном [92]. После образования комплекса с триптофаном белок приобретает способность связываться с антитерминаторным участком лидерной РНК. В результате формируется терминаторная шпилька и происходит терминация транскрипции (рис. 5б). В отсутствие триптофана белок не связывается с РНК, в лидерном участке образуется антитерминаторная структура и транскрипция, напротив, идет дальше. Другим примером РНК-связывающих белков служат факторы антитерминации транскрипции семейства Bgl, регулирующие экспрессию различных катаболитных оперонов у грамположительных и грамотрицательных бактерий [93]. BglG *E. coli* в виде димера также связывается с лидерной областью РНК, однако, в отличие от белка TRAP BglG стабилизирует антитерминатор, предотвращая тем самым терминацию транскрипции (рис. 5в). Активность BglG контролируется другим регуляторным белком, BglF, который реагирует на концентрацию сахара.

Показано, что незаряженные (неацелированные) тРНК могут заменять сенсорные белки в качестве посредников в ходе аттенюации транскрипции [94]. Выяснилось, что ряд генов *B. subtilis*, контролирующих аминоксил-тРНК-синтетазы и некоторые опероны биосинтеза аминокислот, содержат в нетранслируемой лидерной области РНК так называемый Т-бокс (рис. 5г). Сквозная транскрипция терминирующей шпильки лидерной РНК происходит в том случае, если соотношение заряженной и незаряженной тРНК снижается, что сигнализирует о дефиците соответствующей аминокислоты. Экспериментально показано, что незаряженная тРНК может связываться с двумя сайтами Т-бокса: проксимальным, который определяет специфичность связывания за счет кодон-антикодонового взаимодействия, и дистальным, обеспечивающим контакт свободного акцепторного домена тРНК с антитерминатором. В результате незаряженная тРНК фиксируется за счет этих двух основных контактов в лидерной области, стабилизируя антитерминатор и предотвращая формирование терминирующей шпильки. В случае заряженной тРНК такого связывания не происходит, что приводит к терминации транскрипции [95].

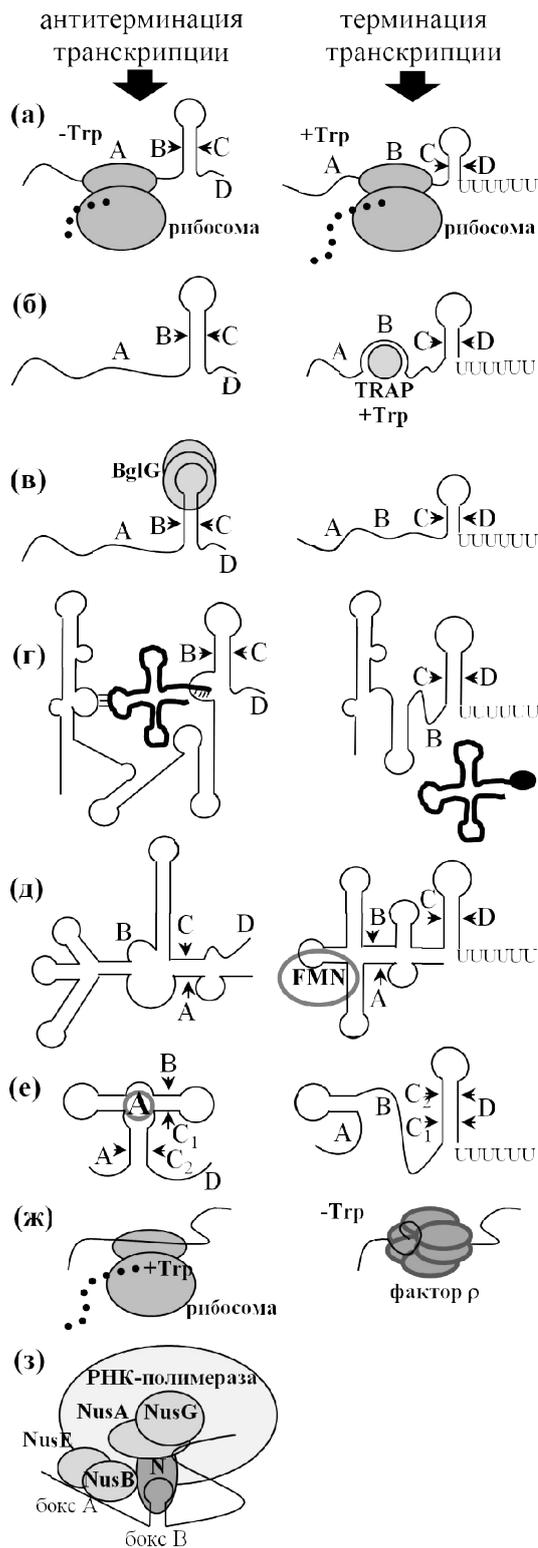


Рисунок 5. Разнообразие молекулярных механизмов, регулирующих терминацию транскрипции. Схематично представлены альтернативные вторичные структуры РНК (A:B – анти-антитерминатор, B:C – антитерминатор, C:D – терминатор) при модулировании Rho-независимой терминации (a-e). Примеры аттенуации транскрипции с участием рибосомы (a), белков (б, в), тРНК (г) и сенсорных РНК, связывающих FMN (д) и аденин (е). Регулирование Rho-зависимой терминации: рибосома препятствует связыванию с РНК фактора Rho (ж). Модификация элонгационного комплекса РНК-полимеразы белком N фага λ приводит к процессивной антитерминации (з).

Сравнительно недавно был открыт новый тип регуляции экспрессии с помощью *цис-*действующих сенсорных РНК [96-97]. Эти РНК, названные рибопереклещателями (riboswitches), с высокой специфичностью прямо распознают и связывают природные

метаболиты. Располагаясь преимущественно в 5'-некодируемых областях, сенсорные РНК способны формировать альтернативные вторичные структуры в зависимости от присутствия специфического лиганда и включать или выключать процесс элонгации транскрипции мРНК или инициации трансляции этих мРНК [98] (рис. 5*d,e*). В структуре рибопереключателей можно выделить два функциональных модуля: аптамерный, отвечающий за распознавание и связывание метаболита, и экспрессионный, вовлеченный в регуляцию активности прилегающих генов. В состав экспрессионного модуля входит фактор-независимый терминатор транскрипции либо секвестр трансляции, т.е. шпильчатая структура, перекрывающая SD-последовательность и сайт инициации трансляции. Регуляция на уровне терминации транскрипции более характерна для генов, объединенных в опероны. В большинстве случаев сенсорные РНК представляют собой рецепторы конечных продуктов биосинтетических путей (или их производных), и накопление этих метаболитов служит сигналом к репрессии активности соответствующих генов. Так, например, связывание флавиномононуклеотида (FMN) с аптамерным доменом лидерной части *rib*-оперона *B. subtilis* стабилизирует такую конфигурацию сенсорной РНК (анти-антитерминатор), которая препятствует формированию антитерминатора и приводит к терминации транскрипции [96] (рис. 5*d*). У *E. coli*, вероятно, аналогичный комплекс блокирует образование антисеквестора и делает недоступным для рибосомы последовательность SD. Позитивная регуляция с участием сенсорных РНК характерна для генов, продукты которых вовлечены в деградацию или экспорт метаболитов из клетки. Примером может служить регуляция транскрипции гена *pbuE* *B. subtilis* аденином [99-100]. Формирование аптамерной структуры в присутствии аденина исключает образование терминаторной шпильки, и экспрессия генов активизируется (рис. 5*e*). В отсутствие метаболита в данном случае аптамерная структура не стабилизируется, вместо нее формируется терминатор транскрипции, блокирующий экспрессию структурных генов. Недавно на примере генов *ribB* *E. coli* и *mgtA* *Salmonella enterica* мы описали новый механизм регуляции, в котором рибопереключателем напрямую контролируется Rho-зависимую терминацию транскрипции [101]. Когда концентрация лиганда выше порогового значения, рибопереключателем принимает конформацию, благоприятную для связывания Rho и активации АТФазы, что ведет к преждевременной терминации транскрипции в лидерной части гена. В отсутствие лиганда альтернативная структура рибопереключателем препятствует связыванию Rho и благоприятствует взаимодействию рибосом с рибосом-связывающим сайтом РНК, обеспечивая транскрипцию и трансляцию структурных генов [101].

Показано, что сенсорные РНК принимают участие в регуляции ряда бактериальных оперонов, контролируемых биосинтезом витаминов, аминокислот, нуклеотидов, а также

транспорт ионов металлов [102]. С момента открытия обнаружено уже более двадцати разных рибопереключателей, контролирующих по крайней мере 3% бактериальных генов.

В качестве примера регулирования Rho-зависимой терминации можно привести аттенуацию транскрипции в *tna*-опероне *E. coli* [103]. Гены этого оперона участвуют в использовании триптофана как источника углерода и азота. В условиях недостатка триптофана рибосома, транслирующая лидерную область *tnaC*, покидает РНК на стоп-кодоне (рис. 5ж). Это позволяет фактору Rho связаться с РНК и терминировать транскрипцию, действуя на РНК-полимеразу в состоянии паузы. В присутствии избытка триптофана TnaC-пептидил-тРНК не может быть расщеплена, и рибосома остается на стоп-кодоне. Остановленная рибосома препятствует связыванию с РНК фактора Rho, предотвращая терминацию, и способствует тем самым транскрипции структурных генов оперона.

При процессивной антитерминации сразу после начала транскрипции регуляторные факторы узнают специфические сигналы в РНК/ДНК и стабильно модифицируют РНК-полимеразу в устойчивую к терминаторам форму [104]. Кроме того, эта модификация фермента ингибирует паузы, задерживающие элонгацию транскрипции. В качестве примера можно привести антитерминацию транскрипции у фага λ (рис. 5з) и бактериальных оперонов рРНК. В состав таких комплексов входят факторы NusA, NusB, NusG, NusE (S10) и фаговый белок N или несколько других клеточных белков. У колифага НК022 для модификации элонгационного комплекса даже не требуются белковые факторы, а необходим специальный участок в РНК (rut-сайт). Несмотря на то, что явление процессивной антитерминации давно известно и описаны необходимые компоненты комплекса антитерминации, детали модификации элонгационного комплекса остаются малоизученными. Поскольку антитерминаторы способны супрессировать как фактор-зависимую, так и фактор-независимую терминацию, можно предположить, что они воздействуют на интермедиаты элонгационного комплекса, общие для двух классов терминации.

1.2.2. Регуляторные белки

Факторы, действующие через вторичный канал. Основной и РНК-связывающий каналы в элонгационном комплексе заняты нуклеиновыми кислотами, однако, прямой доступ к активному центру РНК-полимеразы из раствора (с поверхности фермента) возможен через вторичный канал. Описан ряд факторов (GreA/B, Gfh1, DksA, Rnk, TraR), использующих вторичный канал для контроля транскрипции [105-108].

Встречая различные затруднения по ходу транскрипции, РНК-полимераза подвергается возвратным смещениям по матрице. При этом 3'-конец РНК покидает активный центр и попадает во вторичный канал. Бактериальные факторы GreA и GreB супрессируют паузы и перманентные остановки (арест) *in vitro* и *in vivo*, стимулируя эндонуклеазную активность РНК-полимеразы [50, 109-110]. После расщепления РНК вновь образованная 3'-ОН-группа оказывается в активном центре фермента, и РНК-полимераза снова получает шанс транскрибировать этот участок матрицы. Факторы GreA/B облегчают переход РНК-полимеразы от инициации к элонгации [111-113], а также способствуют повышению точности синтеза РНК [114]. В результате действия GreA в ходе гидролиза образуются ди- и тринуклеотиды, в то время как GreB способствует отщеплению 3'-концевых фрагментов РНК длиной до 10 нт. в зависимости от степени смещения РНК-полимеразы назад [50]. Тип расщепления (GreA- или GreB-тип) определяется спираль-спиральным доменом фактора [115]. Основное различие в этом домене – размер положительно заряженного участка, который у GreB больше, чем у GreA. Очевидно, он необходим для правильной ориентации 3'-концевого участка РНК во вторичном канале. Если GreA только предотвращает перманентную остановку, то GreB способен реактивировать уже попавшие в это состояние комплексы [50]. У эукариот есть функциональный аналог Gre-белков - фактор TFIIIS. Интересно отметить, что, несмотря на отсутствие гомологии между GreA/B и TFIIIS и значительную разницу в пространственном строении этих факторов, бактериальная и эукариотическая РНК-полимеразы используют одинаковую стратегию для реактивации тупиковых комплексов. Общепринятая модель предполагает проникновение спираль-спирального (coiled coil) домена Gre-белков или домена “цинковой ленты” (Zn-ribbon) TFIIIS через вторичный канал к активному центру фермента [52-54, 75, 116]. Как отмечено выше, два остатка аспарагиновой и глутаминовой кислот на вершине этих доменов участвуют в оптимальном для нуклеазной реакции размещении Mg^{2+} и молекулы воды. Вероятно, для облегчения гидролиза РНК факторы взаимодействуют с TL/ВН-модулем РНК-полимеразы и с 3'-концевым участком РНК [52]. Действительно, недавние исследования структуры тупикового комплекса РНК-полимеразы II с TFIIIS показывают, что фактор TFIIIS вытесняет РНК из сайта связывания во вторичном канале и переводит TL из неактивной конформации (trapped) в “закрытую” конформацию (locked) [75]. Сходные взаимодействия между TL и GreB предположены на основе биохимических опытов с РНК-полимеразой *E. coli* [117]. В результате сдвинутый 3'-концевой участок РНК отщепляется и диссоциирует, а элонгационный комплекс переходит в состояние, готовое для включения следующего нуклеотида.

Предложенные модели комплекса РНК-полимеразы с белками Gre-семейства расходятся, однако, в некоторых деталях положения контактов глобулярного домена фактора и РНК-полимеразы [52-54]. Недавно с высоким разрешением установили пространственную структуру GreB [118]. Межмолекулярные взаимодействия, обнаруженные в кристалле, позволили предположить возможность аналогичного взаимодействия между гидрофобной впадиной глобулярного домена фактора и гидрофобным участком на кончике спираль-спирального домена β' -субъединицы у широкой внешней стороны вторичного канала [118] (рис. 2).

Белок Gfh1 термофильных бактерий относится к семейству Gre-белков, однако он ингибирует все каталитические активности РНК-полимеразы [119-120]. Пространственные структуры доменов Gfh1 и Gre-белков схожи, но различается их взаимная ориентация в установленных структурах факторов [107, 121-122]. Показано, что конформация Gfh1 меняется в зависимости от значения pH [122]. При pH больше 7 домены Gfh1 находятся в “неактивной”, развернутой друг относительно друга ориентации, и фактор не связывается с РНК-полимеразой. Однако при более низких значениях pH конформация Gfh1 изменяется, и домены ориентируются, как у Gre-белков. В такой конформации Gfh1 связывается с РНК-полимеразой и ингибирует ее активность, конкурируя с нуклеотидами за координирование Mg^{2+} в активном центре [122]. Очевидно, геометрия размещения иона магния в активном центре Gfh1 и Gre-белков принципиально отличается. Вероятно, Gfh1 не только стабилизирует Mg^{2+} в непродуктивном состоянии, но и блокирует подходящее размещение нуклеофила (молекулы воды или гидроксид-иона). В основе функционального различия между Gfh1 и Gre-белками лежат особенности локальной конформации полипептидной петли на вершине спираль-спирального домена, которая через вторичный канал поступает в активный центр фермента. Ингибирование также может быть следствием блокирования вторичного канала фактором Gfh1 и ограничения поступления субстратов и выхода продуктов abortивного синтеза РНК [122].

Хотя фактор DksA не гомологичен белкам Gre-семейства, их пространственные структуры очень похожи [106]. По-видимому, DksA связывается с РНК-полимеразой глобулярным доменом у внешнего отверстия вторичного канала и так же, как Gre-белки, укладывает в нем спираль-спиральный домен. Показано, что DksA усиливает эффект клеточного алармона гуанозинтетрафосфата (ppGpp) при “строгом ответе” (stringent response) [106, 123]. Для объяснения кооперативного эффекта DksA и ppGpp предложена модель, основанная на установленной структуре комплекса ppGpp и РНК-полимеразы *T. thermophilus* [124]. Предполагается, что DksA с помощью двух остатков аспарагиновой кислоты на кончике спираль-спирального домена координирует ион магния и стабилизирует комплекс РНК-

полимеразы с ppGpp [106]. Однако проведенные генетические исследования ставят под вопрос соответствие обнаруженного в структуре РНК-полимеразы *T. thermophilus* сайта связывания ppGpp физиологически значимому сайту в ферменте *E. coli* [125]. Установлено, что в присутствии DksA снижается время жизни открытого промоторного комплекса [123]. По-видимому, избирательность действия ppGpp и DksA на рибосомные промоторы объясняется внутренними свойствами самих промоторов, которые образуют нестабильные открытые комплексы с малым временем жизни. Возможно, контакт DksA с модулем TL/ВН приводит к аллостерической передаче сигнала на аминокислотные остатки, контролирующие открытие/закрытие домена “зажим” и/или взаимодействующие с промоторной ДНК [126]. Хотя эта модель может объяснить негативное влияние фактора на рибосомных промоторах, непонятным остается механизм его синергизма с ppGpp, а также способ, при помощи которого DksA осуществляет позитивный контроль на генах, кодирующих ферменты синтеза аминокислот. Установлено, что DksA может предотвращать и перманентные остановки РНК-полимеразы в элонгации транскрипции [106]. Однако, в отличие от GreA, этот фактор не способен стимулировать гидролиз РНК. Аминокислотные замены двух инвариантных остатков аспарагиновой кислоты в спираль-спиральном домене привели к утрате эффекта DksA на инициацию транскрипции, но не повлияли на его связывание с РНК-полимеразой и предотвращение образования тупиковых комплексов [106]. Вероятно, располагаясь во вторичном канале, DksA блокирует попадание туда 3'-концевого участка РНК, подавляя возвратное смещение РНК-полимеразы. В этом заключается еще одно его отличие от Gre-белков, которые связывают выступающий 3'-концевой фрагмент РНК положительно заряженным участком их спираль-спирального домена. Недавно появились новые данные о функциональной значимости DksA в элонгации транскрипции [127]. Выяснилось, что у *E. coli* DksA способствует репликации ДНК, устраняя препятствия со стороны транскрипции. Этот эффект особенно выражен при аминокислотном голодании. Детальный механизм влияния DksA на элонгацию транскрипции еще предстоит выяснить. Примечательно, что одновременное разрушение *greA*, *greB* и *dksA* значительно замедляет репликацию даже в нормальных условиях роста, подчеркивая важность этих факторов в преодолении столкновений процессов репликации и транскрипции [127].

Недавно описали еще два белка, по-видимому, регулирующих транскрипцию через вторичный канал. Фактор Rnk сходен с Gre-белками С-концевым глобулярным доменом, однако его спираль-спиральный домен сильно укорочен [128]. Это подразумевает одинаковое связывание с РНК-полимеразой, но отличный механизм действия. Фактор TraR, кодируемый конъюгативной плазмидой F, имеет структурное сходство с DksA [129]. Однако полипептидная

цепь TraR почти в 2 раза короче, чем у DksA. Предсказание вторичной структуры показало, что в N-концевой части находится только одна α -спираль, соответствующая части спираль-спирального домена DksA. Возможно, TraR функционирует в виде димера [130]. TraR оказывает сходный с DksA эффект на транскрипцию, но не зависит от ppGpp. Молекулярные механизмы регуляции факторами Rnk и TraR остаются невыясненными.

Таким образом, все белки этой группы имеют два домена: глобулярный и вытянутый спираль-спиральный. Благодаря глобулярному домену факторы образуют стабильные и специфические комплексы с РНК-полимеразой, в то время как спираль-спиральный домен используется для проникновения белков через вторичный канал к активному центру фермента. Модулирование каталитических активностей РНК-полимеразы в ряде случаев происходит, вероятно, в результате изменения аффинности и геометрии связывания Mg^{2+} за счет кислых аминокислотных остатков, расположенных в петле спираль-спирального домена. Кроме того, возможно аллостерическое действие факторов благодаря контактам с функциональными модулями РНК-полимеразы, например с TL/ВН. Факторы связываются примерно в одном месте у выхода на поверхность вторичного канала и могут конкурировать друг с другом, осуществляя тонкую регуляцию уровня экспрессии генов.

Факторы, действующие аллостерически (NusA, NusG, RfaH). Открытые первоначально как бактериальные компоненты системы антитерминации фага λ , факторы транскрипции NusA и NusG играют важную роль в общем контроле скорости элонгации, а также эффективности терминации и антитерминации транскрипции.

NusA – консервативный у бактерий белок, который в разных ситуациях может противоположным образом влиять на транскрипцию. Сам по себе фактор увеличивает паузы в транскрипции и усиливает фактор-независимую терминацию *in vitro*. Кроме того, NusA модулирует р-зависимую терминацию. Однако совместное действие NusA с другими белками Nus (NusG, NusB, NusE) или белками N и Q фага λ , наоборот, приводит к супрессии пауз в элонгации транскрипции и антитерминации на фактор-независимых и фактор-зависимых терминаторах [3]. Биохимические основы этих эффектов еще не вполне понятны.

Структурные исследования NusA из *Mycobacterium tuberculosis* и *Thermotoga maritima* выявили мультидоменную организацию фактора [131-134]. N-концевой домен NusA, взаимодействующий с РНК-полимеразой, соединен подвижным полипептидным участком с тремя РНК-связывающими глобулярными доменами -- S1, KH1 и KH2. Фактор *E. coli* также содержит два C-концевых домена AR1 и AR2, блокирующих связывание РНК с доменами S1 и

КН. Автоингибирование устраняется взаимодействием AR1и AR2 с С-концевым доменом α -субъединицы РНК-полимеразы [135].

N-концевым доменом NusA взаимодействует с участком РНК-полимеразы, расположенным около канала, через который синтезируемая РНК выходит из фермента, в частности, с доменом “заслонка” (flap) [70, 136-137] (рис. 2). Обнаружено, что N-концевого домена NusA достаточно для стимулирования фактор-независимой терминации и пауз, обусловленных шпилькой в РНК, при этом другие домены NusA помогают фактору связаться с элонгационным комплексом [137]. Вытесняя одноцепочечную РНК с поверхности РНК-полимеразы, NusA может способствовать образованию терминационной шпильки [138]. Не исключено также, что фактор прямо стабилизирует шпильку благодаря своим контактам с РНК. Облегчение формирования шпилек в РНК фактором NusA должно, очевидно, усилить в ряде случаев паузы в транскрипции, вызванные такой структурой РНК. С другой стороны, вероятно, что через модуль TL/ВН NusA может аллостерически влиять на активный центр РНК-полимеразы, стимулируя паузы [61]. В антитерминационном комплексе образуется сеть контактов NusA с факторами, РНК-полимеразой и РНК. По-видимому, эти взаимодействия устраняют функции NusA, связанные с усилением пауз и терминации. Например, фактор NusA в комплексе с антитерминатором Q бактериофага 82 экранирует участок РНК и затрудняет формирование в нем вторичных структур [139].

Другой фактор элонгации, NusG, широко распространен в бактериях и имеет гомологов у архей и эукариот. NusG *E. coli* супрессирует паузы в транскрипции, вызванные возвратным смещением РНК-полимеразы, и ускоряет элонгацию транскрипции *in vitro*. В терминации транскрипции этот фактор усиливает действие бактериального белка Rho и белка Nun фага НК022, однако в комплексе с другими факторами он участвует в антитерминации транскрипции бактериального оперона рРНК и генов фага λ . Несмотря на высокую консервативность, белки NusG разных видов бактерий могут иметь свои особенности и в функционировании, и в наборе белков-партнеров [140-141]. Многие виды бактерий также кодируют специализированные паралоги NusG, например RfaH у *E. coli*. Фактор RfaH супрессирует паузы и Rho-зависимую терминацию транскрипции в оперонах, содержащих *ops*-элемент длиной 12 нт. [142].

Все белки семейства NusG имеют двухдоменную структуру с высококонсервативным N-концевым доменом и варибельным С-концевым доменом [143-144]. В N-концевом домене находится гидрофобная впадина, по-видимому, вовлеченная во взаимодействие со спираль-спиральным участком домена “зажим” РНК-полимеразы (рис. 2). Впадина заблокирована С-концевым доменом у RfaH, но открыта у NusG. RfaH специфически узнает нуклеотиды *ops*-

элемента в нематричной цепи ДНК, экспонированной в транскрипционном пузырьке, что, вероятно, приводит к диссоциации доменов RfaH и открытию области взаимодействия с РНК-полимеразой. N-концевого домена NusG *E. coli* достаточно для супрессии пауз в транскрипции *in vitro*, однако для усиления Rho-зависимой терминации или поддержания антитерминации необходим полный белок [143]. По-видимому, в белках семейства NusG C-концевой домен играет белок-специфичную роль, организуя сборку и функционирование регуляторных комплексов.

Анализ *in vitro* РНК-полимераз с мутациями в TL позволил предположить, что контроль элонгации факторами NusA и NusG осуществляется посредством регуляции функционального состояния модуля TL/ВН [61]. Например, NusG стабилизирует РНК-полимеразу в посттранслокационном (активном) состоянии, подобно мутации в TL, ускоряющей элонгацию. РНК-полимераза с такой мутацией теряет чувствительность к NusG, поскольку фактор не способен воздействовать на измененный модуль TL/ВН. NusA, напротив, снижает скорость элонгации и супрессирует перемещение вперед. Мутация в TL, замедляющая элонгацию, приводит к устойчивости РНК-полимеразы к действию NusA на паузы и транслокацию.

Факторы с АТРазной активностью (Mfd, RapA, Rho). Белок Mfd – фактор, связывающий транскрипцию и репарацию у бактерий. Согласно предложенной модели Mfd узнает остановленные из-за повреждений в ДНК элонгационные комплексы РНК-полимераз, удаляет их с матрицы и рекрутирует к этим участкам белки эксцизионной репарации [145]. Этот фактор имеет структурное сходство с АТРазой суперсемейства II RecG и, очевидно, является АТР-зависимой транслоказой. Mfd состоит из нескольких компактно расположенных функциональных модулей, отвечающих за взаимодействие с комплексом репарации и РНК-полимеразой, а также за транслокацию [146-147].

В РНК-полимеразе сайт связывания с Mfd локализован в пределах N-концевой области из 142 а. о. (*E. coli*) субъединицы β [147-148]. В структуре комплекса элонгации этот домен β находится рядом с задним краем транскрипционного пузырька. В соответствии с таким расположением Mfd для связывания необходимы ~25 нт. дуплекса ДНК непосредственно за транскрипционным пузырьком [148].

In vitro обнаружено, что Mfd, используя энергию гидролиза АТР, способен реактивировать сместившиеся назад элонгационные комплексы [148]. Возобновление элонгации в этом случае возможно только при условии, что 3'-конец РНК снова окажется в активном центре РНК-полимеразы. Поскольку Mfd в отличие от GreA/B не стимулирует эндонуклеазное расщепление РНК, механизм его работы предположительно заключается в

транслокации комплекса элонгации вперед по ходу транскрипции [148]. Если транскрипция заблокирована из-за повреждений в ДНК или низкой концентрации нуклеотидов, то действие Mfd приводит к диссоциации комплекса элонгации. Однако *in vitro* в отсутствие физических преград на матрице и при физиологических концентрациях нуклеотидов элонгация транскрипции преобладает над Mfd-зависимым высвобождением РНК. Детали механизма разрушения комплекса элонгации фактором Mfd не выяснены. По-видимому, для диссоциации непродуктивного элонгационного комплекса недостаточно простого смещения его вперед, а требуются дополнительные изменения конформации, вызванные взаимодействиями фактора с мобильными доменами РНК-полимеразы и/или с нуклеиновыми кислотами.

В клетке функции Mfd не ограничиваются репарацией, связанной с транскрипцией. Недавно показали, что *in vitro* Mfd способствует прохождению репликативной вилки после встречного столкновения реплисома с РНК-полимеразой [149]. Возобновление репликации возможно только после вытеснения РНК-полимеразы с матрицы ДНК. Известно также несколько других примеров, где экспрессия генов регулируется или нарушается препятствиями элонгации транскрипции [150-152].

Другая АТРаза, взаимодействующая с РНК-полимеразой, - RapA (или HerA) [153-154]. RapA принадлежит к белковому семейству SWI/SNF2, что указывает на возможную роль фактора в ремоделировании нуклеиновых кислот. RapA способен связывать нуклеиновые кислоты, а его АТРазная активность стимулируется РНК-полимеразой [153]. Количество RapA в клетке сопоставимо с σ^{70} , и RapA также легко очищается вместе с РНК-полимеразой.

RapA состоит из нескольких доменов, включающих четырехдоменный АТРазный модуль, типичный для ДНК-транслоказ [155]. Два N-концевых домена обладают структурным сходством с доменом Mfd, контактирующим с РНК-полимеразой. Сайт связывания с фактором на РНК-полимеразе локализован на субъединицах β' и α , однако детали этого контакта неизвестны [156]. Установлено, что RapA взаимодействует с минимальным ферментом (кором) РНК-полимеразы, причем σ^{70} легко вытесняет фактор из этого комплекса [155]. Примечательно, что Mfd тоже не влияет на содержащие σ^{70} промоторные комплексы РНК-полимеразы [148]. Действительно, структурные данные указывают на блокирование инициаторным фактором сайта связывания Mfd на РНК-полимеразе [147].

Работы *in vitro* показали, что RapA стимулирует множественную транскрипцию (multiround transcription) на суперскрученной ДНК при высокой концентрации соли [156]. Хотя RapA и не считается белком, существенным в оптимальных условиях, разрушение его гена

приводит к нарушению роста клеток на агаризованных средах при повышенной концентрации соли. Для объяснения стимулирующего эффекта RapA предположили, что он высвобождает неактивные элонгационные комплексы, способствуя рециркуляции РНК-полимераз в ходе транскрипции [156-157]. Однако по-прежнему неизвестна точная топология элонгационных комплексов, на которые действует RapA, и неясен механизм реактивации таких комплексов. Интересно проверить, способен ли RapA подобно Mfd осуществлять АТР-зависимую транслокацию РНК-полимеразы.

Недавно проведенные структурные исследования выявили новые детали в рабочем цикле фактора терминации Rho [82]. Шесть субъединиц фактора организованы в кольцевую структуру. В N-концевых доменах субъединиц располагаются участки первичного связывания РНК, обращенные во внутреннюю часть этой гексамерной структуры [158]. Вероятно, с этими доменами взаимодействует rut-сайт РНК при загрузке РНК в фактор. Таким образом, РНК связывается по периферии внутренней стороны кольца из субъединиц Rho, при этом 3'-конец РНК ориентируется в направлении центрального отверстия. Длина оцРНК, покрывающей N-концевые домены всех субъединиц, составляет 70-80 н., что соответствует размеру неструктурированной РНК, необходимой для Rho-зависимой терминации. В C-концевых доменах субъединиц находятся АТР-зависимые центры и вторичные участки связывания РНК, необходимые для транслокации и хеликазной активности фактора. Пока 3'-концевая часть РНК не попадет во вторичный сайт связывания, гексамерное кольцо Rho может существовать в разомкнутом виде, напоминая пружинную шайбу [158]. В такой конформации в одном месте кольца нет контакта между субъединицами, и РНК без свободного конца может попасть в центр кольцевой структуры фактора. Обнаружено, что структурные элементы Rho, участвующие в связывании и гидролизе АТР, прямо взаимодействуют с РНК во вторичном участке связывания [82]. Таким образом, связывание РНК непосредственно влияет на состояние АТР-зависимых центров и регулирует гидролиз АТР. По-видимому, в каждый момент времени гидролиз АТР происходит только в одном АТР-зависимом центре, который ассоциирован с РНК. Сопряженно с АТР-зависимой активностью РНК по кольцу переходит от одной субъединицы к другой, при этом осуществляется транслокация РНК через гексамер (что аналогично движению Rho по РНК) в 5' → 3'-направлении [82]. Относительные перемещения фактора и РНК необходимы для функции Rho и могут отражать акт освобождения РНК в ходе терминации транскрипции. Где и каким образом Rho взаимодействует с NusG и РНК-полимеразой еще предстоит выяснить. Поскольку в отличие от Mfd фактор Rho действует на движущиеся элонгационные комплексы, ключевым этапом Rho-зависимой терминации считается быстрая инактивация РНК-полимеразы для осуществления последующей диссоциации комплекса.

Взаимодействие между РНК-полимеразами в ходе элонгации транскрипции

In vivo РНК-полимераза с высокой скоростью (20-80 нт. в секунду) синтезирует длинные РНК из тысяч нуклеотидов [9]. Однако *in vitro* одиночная транскрипция (single round transcription) проходит с гораздо меньшей эффективностью, прерываясь многочисленными паузами и перманентными остановками. Такие задержки значительно уменьшают скорость элонгации и долю полноразмерных транскриптов. Высокая эффективность элонгации транскрипции *in vivo* еще более удивительна, если учесть, что в клетке с ДНК-матрицей связаны различные белки, представляющие собой потенциальные препятствия для продвижения РНК-полимеразы. Многие из таких белков частично или полностью блокируют одиночную транскрипцию *in vitro* [159-160].

В большинстве случаев задержки в элонгации связаны, вероятно, с возвратными смещениями РНК-полимеразы. Реактивация элонгационных комплексов *in vitro* происходит либо спонтанно из-за обратимости небольших по амплитуде возвратных смещений [21, 48], либо с участием специальных факторов. Например, факторы GreA/B стимулируют эндонуклеазное расщепление РНК [50, 110], а белок Mfd сдвигает РНК-полимеразу вперед, используя гидролиз АТФ [148]. В результате в обоих случаях 3'-конец РНК размещается в активном центре фермента и возобновляется синтез РНК. Примечательно, что ни один из этих факторов не входит в число необходимых для жизни клеток в физиологических условиях [145, 161]. Следовательно, можно предположить, что существуют более общие механизмы, лежащих в основе эффективной транскрипции *in vivo*.

В стадии элонгации по одной и той же матрице ДНК молекулы РНК-полимераз следуют друг за другом, а в случае высокоактивных генов (например, генов рРНК или стресс-индуцибельных генов) практически вплотную друг к другу. Обнаружено, что большей части задержек транскрипции *in vitro* можно избежать, если более одной РНК-полимеразы начинают синтез РНК с одного промотора (multi-round transcription) [162]. Удалось показать, что молекулы РНК-полимеразы способны подавлять возвратные смещения впереди идущих молекул РНК-полимераз в местах пауз и перманентных остановок. Возвратные движения элонгационных комплексов, по-видимому, возможны практически в любых позициях на матрице, однако скорость и амплитуда этих осцилляций зависит от локальных нуклеотидных последовательностей. В определенных участках РНК-полимераза задерживается из-за высокой вероятности спонтанного возвратного смещения и относительно низкой вероятности движения вперед. Характер движения, определяемый свободной энергией пар нуклеотидов в ДНК, гибридном участке РНК-ДНК и РНК, может значительно меняться даже на соседних

нуклеотидных позициях. Это означает, что в то время как одна РНК-полимераза образует непродуктивный комплекс, следующая за ней молекула может находиться в активном состоянии, сдвигая равновесие первой молекулы также к активному состоянию.

Взаимодействие между комплексами элонгации облегчает также преодоление препятствий в виде связанных с матрицей белков *in vitro* и *in vivo* [163]. Анализ конформаций элонгационных комплексов показал, что при встрече с препятствием РНК-полимераза находится в непродуктивном состоянии, вызванным возвратным смещением комплекса. Для прохождения препятствия необходимо выполнение двух шагов: 1) реактивации элонгационного комплекса и 2) смещения и/или диссоциации белка-препятствия. Кооперация между РНК-полимеразами позволяет ускорить первый шаг без использования эндонуклеазного расщепления РНК путем смещения непродуктивного комплекса вперед по ходу транскрипции. Второй шаг, зависящий от природы контактов репрессора и ДНК, также может подвергаться влиянию первого шага из-за локальных изменений в структуре ДНК и/или стерических затруднений между белками. Тот же механизм, как выяснилось в опытах *in vitro*, может способствовать преодолению нуклеосом [164].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Реактивы

Использовали хлорид натрия, хлорид магния, хлорид калия, ацетат натрия, глицин, диэтилпиروкарбонат, борную кислоту, трис(гидроксиметил)аминометан, DTT (USB), N,N-диметилформамид, карбонат натрия, гидроксид натрия, гидроксид калия, натрий фосфорнокислый 1-замещенный и двузамещенный, фикол, поливинилпирролидон, кумасси R-250 (FisherBiotech), фенол, хлороформ, имидазол, нитрат серебра, сульфат магния, хлорид марганца, сульфат аммония, тиосульфат натрия, TEMED, бромфеноловый синий, ксиленцианол, нонидет P-40, хлорид кальция, митомицин С, цисплатин, 4-NQO, IPTG, α -метилглюкозид, хлорацетальдегид, диметилсульфоксид, глицерин, EDTA, формалин, ампициллин, канамицин, тетрациклин, ангидротетрациклин, хлорамфеникол, спектиномицин, стрептомицин, мочевины, 2-пропанол, 2-метилбутанол, формамид (Sigma-Aldrich), рифампицин, SDS, персульфат аммония, PEG-6000, тритон X-100 (Serva); акриламид, N,N'-метилен-бисакриламид, PMSF (Roche); краситель для определения концентрации белков по Брэдфорду Bio-Rad protein assay (Bio-Rad); нуклеотиды (Amersham), ингибитор РНКаз SUPERase-In (Ambion); агар, дрожжевой экстракт, бакто-триптон, гидролизат казеина (Difco); сефарозные шарики TALON-Co²⁺ (Clontech); бромистый этидий (Calbiochem); [α -³²P]СТР (NEN Life Science); агарозу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, маркеры молекулярной массы GeneRuler 100 DNA Ladder Plus, 1kb DNA Ladder, PageRuler (Fermentas); [γ -³²P]АТР, [α -³²P]УТР (ИБХ РАН), глюкозу, сахарозу, метол, сульфит натрия, гидрохинон, бромид калия, гипосульфит натрия, метабисульфит натрия, соляную кислоту, уксусную кислоту, трихлоруксусную кислоту, этанол, бутанол (отечественного производства).

Ферменты

Использовали эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Sac*I, *Eco*RV, *Nhe*I, *Pst*I, *Sal*I, *Apa*I, *Nco*I, *Nde*I, *Pvu*I, *Xho*I, *Xba*I *Sph*I; щелочную фосфатазу из кишечника теленка (CIP), ДНК-полимеразу I *E.coli* (фрагмент Кленова), ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага Т4 (Fermentas); обратную транскриптазу вируса иммунодефицита человека (Ambion); термостабильную ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* (ИБХ РАН); РНК-азу А (Sigma-Aldrich); лизоцим (Serva).

Материалы

Использовали мембрану Hybond-N⁺; хроматографические колонки HiTrap HeparinHP и Superose-6 (Amersham); концентраторы Centricon-100 (Amicon); набор для выделения ДНК illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, спин-колонки для очистки олигонуклеотидов и фрагментов ДНК illustra MicroSpin G-25 (G-50) Columns (GE Healthcare); фильтры Millex с диаметром пор 0.45 и 0.22 мкм; рентгеновскую пленку RETINA (ХВМ) и Биомат HR (Kodak).

Лабораторное оборудование

В работе использовали настольную центрифугу Eppendorf Centrifuge 5415D и центрифуги с охлаждением Eppendorf 5417D и 5804R (Eppendorf); хроматографическую систему АКТАprime plus, спектрофотометр Ultrospec 3100 pro (Amersham); гибридизационную печь BFED (Binder); настольную мини-центрифугу (Fisher Scientific); амплификатор MyCycler, прибор для белкового электрофореза Mini-Protean3Cell, сушку для гелей Gel Dryer model 583, насос HydroTech Vacuum Pump, прибор для электротрансформации Gene Pulser Xcell (Bio-Rad); термостатируемый шейкер для культивирования клеток Excella E24 (New Brunswick Scientific); источник постоянного тока EPS 500/400 (Pharmacia), прибор для вертикального электрофореза (OWL); ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т; счетчик радиоактивности Minimonitor-125 (RMI); прибор для дозированного УФ-облучения (Vilber Lourmat); весы Adventurer и Analytical Plus (Ohaus); твердотельный термостат Гном (ДНК-технология), водный термостат НААКЕ DC10, автоматические микропипетки (Gilson).

Олигонуклеотиды

N2: 5'-cga-ttg-gga-tat-atc-aac-ggt-gg-3'

N5: 5'-gca-aag-cat-aac-caa-acg-cgc-at -3'

Ter3: 5'-gat-cca-tga-gcc-cgc-cta-atg-agc-ggg-ctt-ttt-tta-t-3'

Ter4: 5'-gat-cat-gaa-aaa-aaa-agc-ccg-ctc-att-agg-cgg-gct-cat-g-3'

Ins1: 5'-gat-cct-cta-aag-aaa-agt-ttg-aac-gta-ctc-acc-3'

Ins2: 5'-gat-cgg-tga-gta-cgt-tca-aac-ttt-tct-tta-gag-3'

SD3: 5'-gat-cgt-tta-act-tta-aga-agg-aga-tat-acc-atg-g-3'

SD4: 5'-gat-ccc-atg-gta-tat-ctc-ctt-ctt-aaa-gtt-aaa-c-3'

Z: 5'-cca-tta-tta-tca-tga-cat-taa-cct-3'

uvrD-2: 5'-cct-tca-agc-tta-cac-cga-ctc-cag-ccg-3'

uvrD-4: 5'-tta-cat-gtt-ggg-gac-gat-ctc-3'

uvrD-5: 5'-ggc-acg-att-tca-cat-atg-tat-atg-3'

uvrD-L: 5'-cac-cgc-atc-cgg-caa-cgt-tac-acc-gac-tcc-agc-cgg-gct-gta-ggc-tgg-agc-tgc-ttc-g-3'
 uvrD-R: 5'-ttc-tcc-gcc-caa-cct-att-ttt-acg-cgg-cgg-tgc-caa-tg a-ttc-cgg-gga-tcc-gtc-gac-c-3'
 mfd-L: 5'-atg-cct-gaa-caa-tat-cgt-tat-acg-ctg-ccc-gtc-aaa-tga-agc-ctg-ctt-ttt-tat-act-aag-3'
 mfd-R: 5'-tta-agc-gat-cgc-gtt-ctc-ttc-cag-ttc-acg-cat-aac-gct-caa-gtt-agt-ata-aaa-aag-ct-3'
 mfd-1: 5'-cag-tta-ctc-ccg-cta-agc-ca-3'
 mfd-2: 5'-gat-agt-gca-ggg-aag-tgc-aaa-3'
 greA-L: 5'-tga-gta-ttg-ggt-aat-tct-tac-agg-tat-tcc-acc-tta-att-gta-ggc-tgg-agc-tgc-ttc-g-3'
 greA-R: 5'-ctt-gcc-cta-tca-gga-ata-ttc-aag-agg-tat-aac-aaa-tga-ttc-cgg-gga-tcc-gtc-gac-c-3'
 greB-L: 5'-gag-gtt-aag-act-ctt-cct-tac-ggt-ttc-acg-tac-tcg-att-gta-ggc-tgg-agc-tgc-ttc-g-3'
 greB-R: 5'-tgc-gca-tta-tca-aac-aga-caa-agg-gaa-tca-acg-aga-tga-ttc-cgg-gga-tcc-gtc-gac-c-3'
 greA-1: 5'-agc-tga-cct-ggg-act-tgt-ac-3'
 greA-2: 5'-ctg-cca-cgc-taa-gat-tat-cct-3'
 greB-1: 5'-ctc-acg-ttc-gtc-acc-agc-ta-3'
 greB-2: 5'-gca-gcg-tca-acc-tgt-tcc-g-3'

Буферы и растворы

TE-буфер: 10 мМ трис-НСl, pH 7.5, 1 мМ EDTA.

10x TBE: 108 г/л трис-основание, 55 г/л борная кислота, 20 мМ EDTA, pH 8.3.

50x TAE: 242 г/л трис-основание, 57.1 мл ледяной уксусной кислоты на 1л буфера, 20 мМ EDTA, pH 8.5.

5x TGB: 0.125 М трис-основание, 0.96 М глицин, pH 8.3, 0.5% SDS.

STET: 10 мМ трис-НСl, pH 8.0; 8% глюкоза, 0.5% тритон X-100, 50 мМ EDTA.

Физиологический раствор: 0.9% раствор NaCl.

Раствор ТВ для приготовления компетентных клеток: 10 мМ PIPES, pH 6.7; 15 мМ CaCl₂, 250 мМ KCl, 55 мМ MnCl₂.

Растворы для выделения ДНК методом щелочного лизиса:

раствор I (25 мМ трис-НСl, pH 7.5; 10 мМ EDTA, 15% сахароза);

раствор II (0.2 н NaOH, 1% SDS).

Phet-раствор: 60% этанол, 2% фенол, 10 мМ EDTA.

Лизирующий раствор: 10 мМ трис-НСl, pH 8.0; 0.5% SDS, 200 мМ NaCl, 10 мМ EDTA.

Растворы для гибридизации:

50x раствор Денхардта (1% фикоил, 1% поливинилпирролидон, 1% БСА);

20x SSPE (0.2 М NaH₂PO₄, pH 7.4; 3М NaCl, 0.02 М EDTA).

Для обработки рентгеновской пленки использовали:

проявитель (на 1 л) - метол 2.2 г, сульфит натрия безв. 72 г, гидрохинон 8.8 г, углекислый натрий безв. 48 г, бромистый калий 4.0 г; фиксаж (на 1 л) - гипосульфит натрия 200 г, метабисульфит натрия 20 г.

Буферы для электрофореза белков:

для приготовления образцов - 125 мМ трис-НСl, рН 6.8, 3% SDS, 20% глицерин, 3% β -меркаптоэтанол, 0.05% бромфеноловый синий;

4x DB (для разделяющего геля) – 1.5 М трис-НСl, рН 8.8, 0.4 % SDS;

4x UB (для концентрирующего геля) – 0.5 М трис-НСl, рН 6.8, 0.4% SDS.

Буфер для обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека: 50 мМ трис-НСl, рН 8.3, 75 мМ КСl, 3 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT.

Буфер для щелочной фосфатазы из кишечника телят (CIP): 50 мМ трис-НСl, рН 9.0, 1мМ MgCl₂, 0.1 мМ ZnCl₂.

Буфер для Taq-полимеразы: 75 мМ трис-НСl, рН 8.8, 6.7 мМ MgCl₂, 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20.

Буфер для полимеразы I *E.coli* (фрагмент Кленова): 50 мМ трис-НСl, рН 8.0, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT.

Буфер для ДНК-лигазы фага T4: 40 мМ трис-НСl, рН 7.8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 0.5 мМ АТР.

Буфер для полинуклеотидкиназы фага T4 (для прямой реакции): 50 мМ трис-НСl, рН 7.6, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 1 мМ спермидин.

Буферы для эндонуклеаз рестрикции:

G-буфер (10 мМ трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 0.1 мг/мл БСА);

R-буфер (10 мМ трис-НСl, рН 8.5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ КСl, 0.1 мг/мл БСА);

O-буфер (50 мМ трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 0.1 мг/мл БСА);

B-буфер (10 мМ трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 0.1 мг/мл БСА);

Tango-буфер (33 мМ трис-ацетат, рН 7.9, 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия, 0.1 мг/мл БСА).

Растворы для фиксации белков в ПААГ: 10 % трихлоруксусная кислота, 10 % изопропанол (окраска кумасси) или 30% этанол, 5% уксусная кислота (окраска серебром).

Растворы для прокрашивания белков в ПААГ:

1) 0.15% Coomassie R-250, 10 % уксусная кислота, 10% изопропанол (окраска кумасси);

2) 0.2% нитрат серебра, 0.01% формалин (окраска серебром).

Раствор для проявления при окраске серебром: 2% карбонат натрия, 0.01% формалин.

Буферы для выделения РНК-полимеразы:

GB (50 mM трис-HCl, pH 7.9; 300 mM NaCl, 5% глицерин, 10 mM EDTA, 10 mM β -меркаптоэтанол, 0.1% PMSF, 133 мкг/мл лизоцим);

TGED (10 mM трис-HCl, pH 7.9; 5% глицерин, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM DTT).

Буфер Txp для транскрипции *in vitro*: 50 mM трис-HCl, pH 7.9; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂.

Stop-раствор: 95% формамид, 20 mM EDTA, 0.03% бромфеноловый синий, 0.03% ксиленцианоловый.

Z-буфер: 21.48 г/л Na₂HPO₄·12H₂O, 6.24 г/л NaH₂PO₄·2H₂O, pH 7.0; 0.75 г/л KCl, 0.246 г/л MgSO₄·7H₂O.

Бактериальные среды:

LB-бульон (1% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl);

LB-агар (LB-бульон с 1.5% агаром);

SOB-бульон (2% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄);

SOC-бульон (SOB-бульон с 20 mM глюкозой);

Среда M9 (42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 19 mM NH₄Cl, 8 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.4% глюкоза).

Для культивирования штаммов *E. coli* при необходимости использовали следующие антибиотики: ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (30 мкг/мл), спектиномицин (50 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (30 мкг/мл).

Плазмиды и штаммы

Использованные в работе плазмиды и штаммы *E. coli* представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Плазмиды.

Плаزمида	Описание	Источник
pUV12	<i>bla</i> (Ap ^r) <i>ori</i> (pMB1) P _{A1lac-op} <i>lacZ</i>	[9]
pLacI ^q	<i>tet</i> (Tc ^r) <i>ori</i> (p15a) <i>lacI^q</i>	[165]
pATC10	<i>bla</i> (Ap ^r) <i>ori</i> (pMB1) P _{hisR} (ATC) ₁₀ -lac-op	[163]
pEC1	<i>bla</i> (Ap ^r) <i>ori</i> (pMB1) P _{hisR} Ter(<i>trp</i>)-(ATC) ₁₀ -lac-op	данная работа
p ^{RBS} EC1	<i>bla</i> (Ap ^r) <i>ori</i> (pMB1) P _{hisR} RBS-Ter(<i>trp</i>)-(ATC) ₁₀ -lac-op	данная работа
pZA31	<i>cat</i> (Cm ^r) <i>ori</i> (p15a)	[166]
pETDuet-uvrD	<i>bla</i> (Ap ^r) <i>ori</i> (pMB1) P _{T7} <i>uvrD</i>	V. Epshtein (New York University)
pUvrD	<i>cat</i> (Cm ^r) <i>ori</i> (p15a) P _{L tet-op} <i>uvrD</i>	данная работа

Таблица 2. Штаммы *E.coli*.

Штамм	Генотип	Источник
Mg1655	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1	ВКИМ
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ.M15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene
TG1	<i>supE44, hsdΔ5, thi, strA, endA, sbcB, Δ(lac-proAB), F'[traD36,proAB⁺, lacI^f, lacZΔM15]</i>	ВКИМ
RL721	F-1- <i>thr-1 leu-6 pro-A2 his-4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 syl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE37 recB21 recC22 sbcB15 sbcC201 rpoC3531 [His6] zja::kan</i>	R. Landick (University of Wisconsin-Madison)
CH184	W3110 <i>zhd</i> -126:: <i>Tn10 ~rpsL</i> (SmP)	[167]
Mg1655 Z1	Mg1655 с интегрированной кассетой <i>Sp^R lacI⁺ tetR⁺</i>	[166]
SP1010	Mg1655 Z1 Δ <i>mf</i> <i>d</i>	данная работа
SP1011	Mg1655 Z1 Δ <i>greA</i> :: <i>Km^r</i>	»
SP1012	Mg1655 Z1 Δ <i>greB</i> :: <i>Km^r</i>	»
SP1013	Mg1655 Z1 Δ <i>greA</i>	»
SP1014	Mg1655 Z1 Δ <i>greA ΔgreB</i>	»
SP1015	Mg1655 Z1 Δ <i>uvrD</i> :: <i>Km^r</i>	»
SP1016	Mg1655 Z1 Δ <i>uvrD</i>	»
SP1017	Mg1655 Z1 Δ <i>greA ΔgreB ΔuvrD</i> :: <i>Km^r</i>	»
MDS42	MG1655 с уменьшенным на 14% геномом	[87]
RSW421	MDS42 <i>nusA</i> :: <i>Cm^r</i>	[86]
SP1020	MDS42 <i>nusA</i> :: <i>Cm^r ΔgreB</i> :: <i>Km^r</i>	данная работа

2.2. Методы

Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию *in vitro* фрагментов генов проводили в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 50 нг ДНК в качестве матрицы, по 20 пмоль прямого и обратного праймеров, 1x буфер для ПЦР, смесь dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ) и 2 ед. акт. термостабильной ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus* (ИБХ РАН). Смесь инкубировали в амплификаторе DNA Thermal Cycler в течение 25-30 циклов, каждый из которых включал денатурацию (30 с при 94°С), отжиг (30 с при температуре, рассчитанной по формуле $t=T-4^{\circ}\text{C}$; $T=4^{\circ}\text{C}\times(\text{G+C})+2^{\circ}\text{C}\times(\text{A+T})$, где T - температура плавления дуплекса матрица-праймер, (G+C) и (A+T) - число G-C и A-T пар в этом дуплексе), элонгацию (при 72°С, время - в соответствии с длиной амплифицируемого фрагмента). Продукты анализировали с помощью электрофореза в 1.2% агарозе в 1x TAE.

Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*

Минипрепаративное выделение плазмидной ДНК

Клетки из 2 мл ночной культуры осаждали на центрифуге Eppendorf 5415C (6000 об/мин, 5 мин) и удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 0.21 мл буфера STET. Добавляли 15 мкл свежеприготовленного раствора лизоцима (10 мг/мл в TE-буфере) и перемешивали. Пробирку помещали в кипящую водяную баню на 40-50 сек и сразу центрифугировали (13000 об/мин, 10 мин). Осадок удаляли стерильной зубочисткой, к супернатанту добавляли 0.1 объёма 3 М ацетата натрия, pH 6.0 и равный объём изопропанола. Выдерживали при -20°С 30 мин, затем центрифугировали (13000 об/мин, 10 мин). Осадок плазмидной ДНК промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в 30 мкл TE-буфера. [168]

Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса с переосаждением полиэтиленгликолем

Клетки *E. coli*, содержащие плазмиду, выращивали с аэрацией в течение ночи при 37°С в 25 мл среды LB с соответствующим антибиотиком. Клетки центрифугировали при 2600x g 10 мин при 4°С, супернатант отбрасывали. Клеточный осадок промывали 2 мл физиологического раствора и ресуспендировали в 200 мкл раствора I. Затем добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора I с лизоцимом (5 мг/мл) и инкубировали во льду 20 мин. Осторожно перемешивая, добавляли 800 мкл раствора II и инкубировали во льду 10 мин. Затем к инкубационной смеси добавляли 500 мкл 3М ацетата натрия pH 4.6, осторожно перемешивали

и инкубировали во льду 20 мин. После этого центрифугировали при 16000x g 10 мин при 4°C. К супернатанту, содержащему плазмидную ДНК, добавляли равный объем изопропилового спирта и выдерживали 30 мин при -20°C. Плазмидную ДНК осаждали центрифугированием 10 мин при 16000x g при 4°C, осадок промывали 70% этанолом и растворяли в 600 мкл ТЕ-буфера. Затем добавляли 2 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и инкубировали 20 мин при 37°C. Проводили экстракцию равными объемами фенола, затем смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт 25:24:1 и, наконец, хлороформа. Из водной фазы ДНК осаждали равным объемом изопропанола, добавив 1/10 часть объема ацетата натрия, в течение 30 мин при -20°C. Осадок растворяли в 60 мкл воды, добавляли 20 мкл 4 М хлорида натрия и 120 мкл 13% раствора PEG-6000 и выдерживали во льду не менее 2 ч, после чего центрифугировали 10 мин при 16000x g при 4°C. Осадок растворяли в 60 мкл ТЕ-буфера [169].

Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозе

Электрофорез в агарозных гелях использовали для анализа продуктов ПЦР и препаратов ДНК, расщепленных рестриктазами, а также для проверки качества препаратов плазмидных ДНК. Для электрофореза использовали 0.8-1.5% агарозные гели в 1x ТАЕ. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 120 В.

Электрофорез нуклеиновых кислот в ПААГ

Для разделения фрагментов нуклеиновых кислот использовали вертикальный денатурирующий 8% или 12% ПААГ (20/1 AA/bisAA) в 1x ТВЕ с 7М мочевиной. Электрофорез проводили в 1x ТВЕ при постоянной температуре 50°C и мощности 30-50 Вт.

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции

Расщепление эндонуклеазами рестрикции проводили в объеме 15-20 мкл. Инкубационная смесь содержала 1-2 мкг анализируемой плазмидной ДНК, 1 ед. акт. фермента и соответствующий буфер. Реакцию проводили в течение 1 ч при 37°C (исключение составляла рестриктаза *SmaI*, для работы которой оптимальной температурой является 30°C).

Клонирование фрагментов ДНК и продуктов ПЦР

Подготовка фрагментов ПЦР для клонирования

Для ПЦР в работе использовались олигонуклеотиды с некомплементарными матрице 5'-концами, формирующими на концах ПЦР-фрагмента участки узнавания эндонуклеаз рестрикции, необходимые для клонирования в вектор.

После ПЦР пробу осаждали равным объемом изопропилового спирта, осадок ДНК промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в 10-15 мкл ТЕ. Затем ПЦР-фрагмент обрабатывали соответствующими рестриктазами, после чего продукт расщепления очищали в агарозном геле и выделяли с помощью набора illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Подготовка фрагментов ДНК для клонирования

2-5 мкг плазмидной ДНК обрабатывали соответствующими рестриктазами. Продукты рестрикции разделяли в агарозном геле. Нужный фрагмент ДНК элюировали из геля.

Подготовка вектора для клонирования

Векторы для клонирования по двум сайтам расщепляли соответствующими эндонуклеазами рестрикции. При совпадении состава буферов для обоих ферментов расщепление вели в одной инкубационной смеси. При необходимости смены буфера ДНК расщепляли сначала одним ферментом, затем проводили осаждение ДНК, заменяли буфер и обрабатывали другим ферментом. После этого вектор очищали в агарозном геле и элюировали.

Если клонирование проводили по единственному участку расщепления эндонуклеазы рестрикции, то после гидролиза вектор дефосфорилировали щелочной фосфатазой СІР. Реакцию дефосфорилирования вели в соответствующем буфере, дважды инкубируя смесь 15 мин при 37⁰С и 15 мин при 56⁰С (если дефосфорилировались тупые концы). При дефосфорилировании выступающих концов инкубацию с СІР при 56⁰С не проводили.

Достраивание укороченных 3'-концов двуцепочечной ДНК осуществляли с использованием фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Инкубационная смесь содержала 1-4 мкг ДНК, 1 ед. акт. фермента, буфер, по 2 нмоль (1 мкл 2 мМ раствора) четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов. Реакцию проводили в объеме 20 мкл при 30⁰С в течение 30 мин. Затем фермент инактивировали при 75⁰С в течение 10 мин.

Лигирование фрагментов ДНК с вектором проводили с помощью ДНК-лигазы фага Т4 в 15 мкл инкубационной смеси, содержащей 0.2 мкг вектора, 0.5-2 мкг фрагмента ДНК, 1 мМ АТР, буфер для лигазы и 2.5 ед. акт. фермента. Реакцию лигирования проводили 3 ч при 15⁰С для выступающих концов или 12 ч при 20⁰С для тупых концов.

Трансформация клеток *E. coli*

Химический способ трансформации клеток E. coli

Получение компетентных клеток. В 25 мл SOB-бульона засеивали 0.25 мл ночной культуры *E. coli* и инкубировали с аэрацией при 30°C до оптической плотности OD₆₀₀ 0.45. Биомассу охлаждали во льду 10 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 2600x g при 4°C. Клетки последовательно промывали в 15 мл и 7 мл охлажденного раствора ТВ, выдерживая по 10 мин во льду между центрифугированиями. Наконец, клетки ресуспендировали в 2 мл ТВ и 150 мкл DMSO и выдерживали во льду 10 мин. Затем клеточную суспензию расфасовывали по 200 мкл, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C [170].

Трансформация клеток *E. coli*. 200 мкл замороженной суспензии компетентных клеток размораживали во льду и добавляли 10 - 20 нг плазмидной ДНК или 7 мкл лигазной смеси. Инкубировали во льду 30 мин, выдерживали 1 мин 20 с при 42°C и добавляли 800 мкл SOC-бульона. Клеточную суспензию инкубировали 1 ч при 37°C (либо 2ч при 30°C) и рассевали по 100-200 мкл на селективные чашки с LB-агаром.

Электротрансформация (электропорация) клеток E. coli

Приготовление клеток. В 50 мл SOB-бульона засеивали 0.5 мл ночной культуры *E. coli*. Клетки растили с аэрацией при 30°C (или 37°C) до оптической плотности OD₆₀₀ 0.6-0.8. Биомассу охлаждали во льду 15 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 2600x g при 4°C. Клетки последовательно промывали в 100 мл, 50 мл, 2 мл охлажденного во льду стерильного 10 % глицерина, каждый раз осаждая их с помощью центрифугирования в том же режиме и тщательно удаляя супернатант. Наконец, клетки ресуспендировали в конечном объеме 200 мкл 10 % глицерина. Суспензию клеток расфасовывали по 50 мкл и хранили при -70°C [171].

Трансформация (электропорация). 50 мкл замороженной суспензии компетентных клеток размораживали на ледяной бане и добавляли 10 нг плазмидной ДНК или 100 нг линейризованного фрагмента ДНК. Смесь клеток и ДНК инкубировали во льду 5 мин. Суспензию переносили в охлажденную кювету (0.2 см) для электротрансформации (Bio-Rad) и помещали в экспоненциально убывающее электрическое поле с высоким начальным значением напряженности (параметры электротрансформации: емкость разряжаемого конденсатора 25 мкФ, сопротивление шунтирующего резистора 200 Ом, начальное значение напряжения на конденсаторе 2.5 кВ). После этого к клеткам сразу же добавляли 1 мл SOC-бульона и инкубировали 1ч при 37°C. Клетки рассевали на селективные чашки с LB-агаром.

Выделение РНК-полимеразы *E.coli*

Ночную культуру штамма RL721 (5 мл) разбавляли 400 мл LB-бульона (30 мкг/мл) и растили до оптической плотности $OD_{600} \sim 1$. Клетки собирали центрифугированием при 4°C при $2600 \times g$ в течение 10 мин, ресуспендировали в 10 мл буфера GB и выдерживали во льду 20 мин. Затем добавляли 200 мкл 10% дезоксихолата натрия, лизировали клетки на ледяной бане с помощью ультразвукового дезинтегратора (продолжительность ультразвуковой обработки 30 с с перерывом в 1 мин, 5-7 раз) и осадили нерастворимую фракцию центрифугированием 30 мин при $7500 \times g$. К супернатанту медленно добавляли 10% раствор полимина Р (polymin Р) до конечной концентрации 0.35%, перемешивали в течение 10 мин, а затем образцы центрифугировали 5 мин при $4500 \times g$. Осадок тщательно ресуспендировали в 10 мл буфера TGED с 0.4 М NaCl, суспензию центрифугировали в том же режиме, а супернатант отбрасывали. Для экстракции РНК-полимеразы с полимина осадок ресуспендировали в 10 мл буфера TGED с 1М NaCl в течение 1ч при 4°C , а затем суспензию осветляли центрифугированием. К супернатанту добавляли сухой порошок сульфата аммония до 65% и инкубировали с перемешиванием в течение ночи при 4°C . Далее суспензию центрифугировали 30 мин при $1600 \times g$ и растворяли осадок в 3 мл буфера TGED. Нерастворимый материал удаляли центрифугированием.

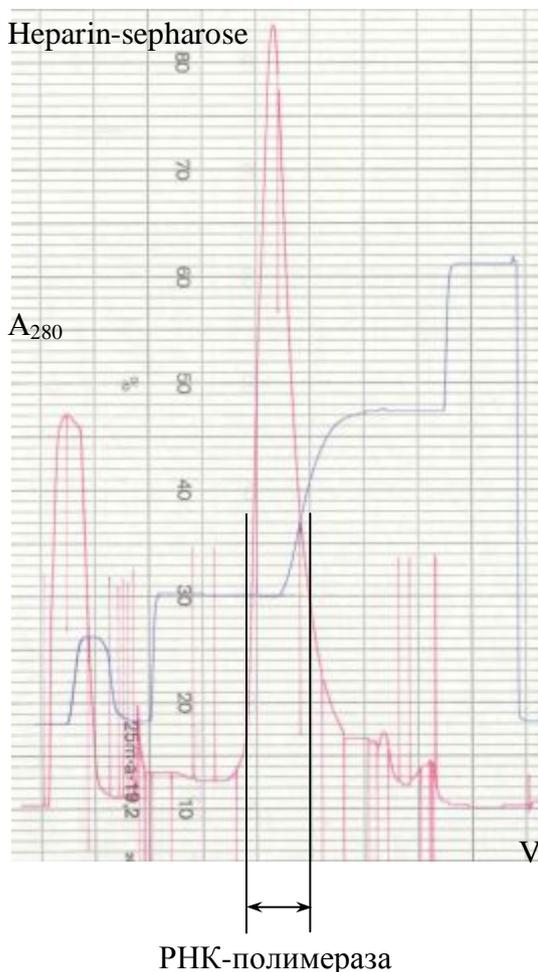


Рисунок 6. Белковый профиль элюции на колонке с гепарин-сефарозой.

Используя хроматографическую систему АКТА Prime Plus (Amersham), супернатант наносили на колонку с гепарин-сефарозой (2x1мл Heparin-sepharose, Amersham), уравновешенную буфером TGED с 50 мМ NaCl, со скоростью 0.5 мл/мин. Колонку промывали тем же буфером, а затем буфером TGED с 0.3 М NaCl со скоростью 1 мл/мин. РНК-полимеразу элюировали в TGED с 0.6 М NaCl (рис.6).

Далее фракции, содержащие РНК-полимеразу, концентрировали с помощью Centricon-100 (Millipore) до 8 мг/мл. Затем образец наносили на колонку Superose-6 (Amersham) в буфере TGED с 0.2 М NaCl со скоростью потока 0.15 мл/мин. РНК-полимераза выходит из колонки через ~2 ч, формируя второй пик в кривой поглощения на 280 нм (рис.7). Далее образец концентрировали на Centricon-100 до 1.8 мг/мл (рис.8) [172].

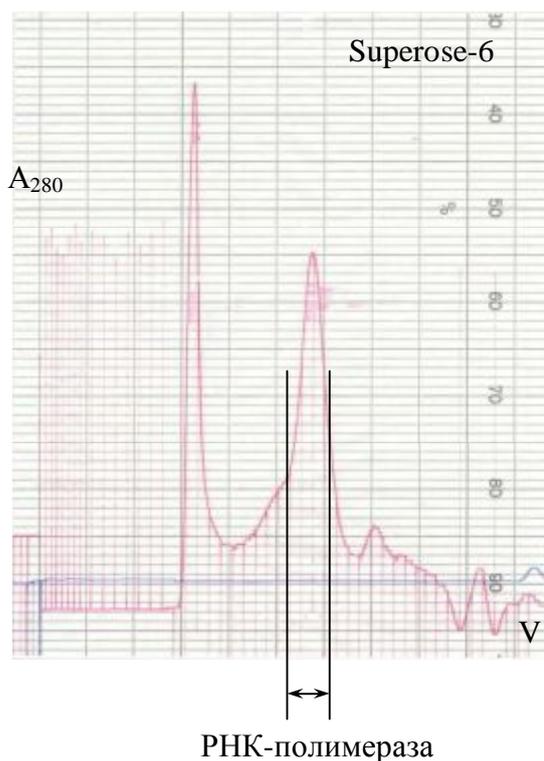


Рисунок 7. Белковый профиль элюции на колонке Superose-6.

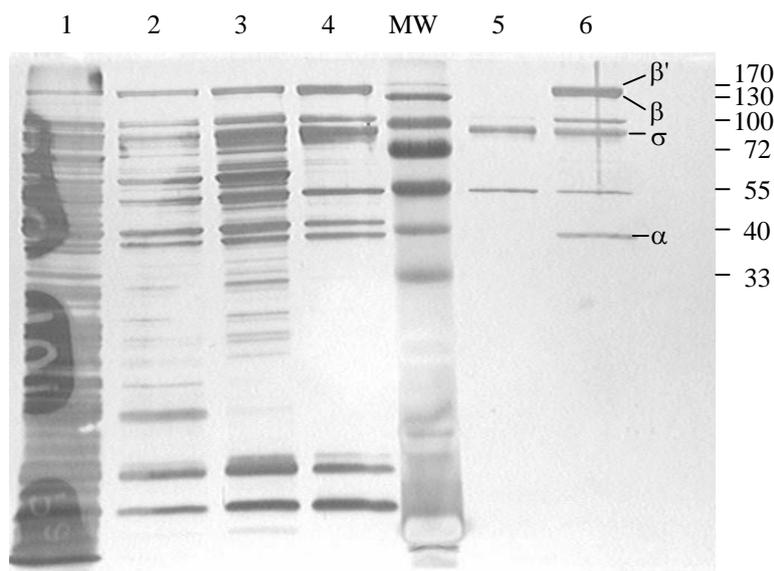


Рисунок 8. Электрофоретическое разделение белков в 12% ПААГ из образцов, полученных на разных стадиях очистки РНК-полимеразы: (1) суммарный лизат, (2) осаждение полимином Р, (3) осаждение сульфатом аммония, (4) элюция 0.6 М NaCl с колонки Нерагип-сепхарозе, (5) белки, соответствующие первому пику в белковом профиле элюции на колонке Superose-6, (6) препарат РНК-полимеразы, соответствующий второму пику в белковом профиле элюции на колонке Superose-6.

Быстрое минипрепаративное выделение РНК-полимеразы *E.coli*

Клетки штамма RL721 подращивали в 25 мл LB-бульона до оптической плотности $OD_{600} \sim 1$, осаждали при 4°C при 2600x g в течении 10 мин и ресуспендировали в 3 мл буфера TGED с 500 mM NaCl. Далее лизировали клетки на ледяной бане с помощью ультразвукового дезинтегратора и осаждали нерастворимую фракцию центрифугированием 15 мин при 16000x g. Отбирали супернатант и измеряли концентрацию белков в экстракте методом Брэдфорда. Разводили экстракт буфером TGED с 500 mM NaCl до концентрации 1 мг/мл, алиquotы по 200 мкл замораживали и хранили при -70°C. Перед опытом размораживали во льду пробирку с экстрактом, добавляли 50 мкл суспензии металл-аффинных шариков Talon-Co²⁺, предварительно промытых буфером TGED с 500 mM NaCl, и инкубировали с постоянным перемешиванием при 4°C в течение 1 ч. Далее шарики собирали на настольной мини-центрифуге Fisher, промывали 1мл буфера TGED с 500 mM NaCl, 5 раз по 1 мл TGED с 2 M NaCl и 3 раза по 1 мл TGED с 50 mM NaCl. К шарикам с иммобилизованной на них РНК-полимеразой добавляли субъединицу σ^{70} (1мкг), матрицу ДНК и инкубировали в буфере Tхп

при 37°C 15 мин. Полученный таким образом препарат может использоваться для реконструкции транскрипции *in vitro*.

Электрофорез белков

Электрофорез белков проводили в двухступенчатом денатурирующем полиакриламидном геле: верхний (концентрирующий) - 4% ПААГ в 1х буфере UB, нижний (разделяющий) – 10% или 12% ПААГ в 1х буфере DB. Электрофорез проводили при напряжении 200В в 1х TGB до тех пор, пока краситель бромфеноловый синий не достигал конца геля [169].

Визуализация белковых полос в ПААГ

Окраска серебром

Гель после электрофореза помещали в раствор для фиксирования (30% этанол, 5% уксусная кислота) на 30 мин, затем раствор сливали, добавляли свежую порцию и выдерживали еще 30 мин. Затем гель промывали водой 4 раза по 10 мин, помещали в 0.02% тиосульфат натрия на 1 мин и дважды промывали водой по 1 мин. После этого гель прокрашивали в растворе, содержащем 0.2% нитрата серебра и 0.01% формалина, в течение 30-40 мин. После двукратной (по 1 мин) промывки водой гель проявляли в растворе с 2% карбонатом натрия и 0.01% формалином. При появлении белковых полос реакцию останавливали заменой проявляющего раствора на 5% уксусную кислоту [173].

Окраска кумасси

После электрофореза гель помещали на 5-10 мин в фиксирующий раствор (10% трихлоруксусная кислота, 10% изопропанол), затем в течение 30-60 мин при 50°C прокрашивали водным раствором, содержащим 0,2% кумасси R-250, 10% уксусную кислоту, 10% изопропанол. Гель отмывали 5% уксусной кислотой с кипячением в течение 5-10 мин [169].

Определение концентрации белков по методу Брэдфорда

Раствор красителя для определения концентрации белков Bio-Rad protein assay (на основе Coomassie brilliant blue) разводили водой до 1х, переносили в спектрофотометрические кюветы, добавляли по 20 мкл приготовленного раствора БСА известной концентрации (0.2; 0.4; 0.6; 0.8 и 1 мкг/мкл) или исследуемый образец белка и измеряли величину оптического поглощения на 585 нм. По стандартам БСА строили калибровочную прямую зависимости оптического

поглощения от концентрации белка и по ней определяли концентрацию исследуемого образца белка.

Транскрипция *in vitro*

Холофермент His⁶-РНК-полимеразы (~2 пмоль) смешивали с 2-молярным избытком матрицы ДНК в 20 мкл транскрипционного буфера Txn50 и инкубировали 5 мин при 37°C. Затем добавляли рибо-олигонуклеотид ApUpC (10 мкМ), GTP и ATP (по 25 мкМ) и инкубировали еще 10 мин. К реакционной смеси добавляли 5 мкл суспензии металл-аффинных шариков Talon-Co²⁺, предварительно промытых буфером Txn50, и инкубировали 5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Затем добавляли 1 мкл [α -³²P]CTP (3000 Кю/ммоль), инкубировали 5 мин, после чего добавляли CTP (5 мкМ). Спустя 5 мин шарики промывали буфером TB1000 (5 раз по 1 мл) и Txn50 (2 раза по 1мл). Там, где было нужно, к полученному остановленному элонгационному комплексу добавляли NusG (0.1 мг/мл). Элонгацию транскрипции возобновляли, добавив 1 мМ ATP, CTP, UTP и 25 мкМ GTP. Через определенные временные интервалы отбирали аликвоты и смешивали с равным объемом stop-раствора. Образцы анализировали на 12% ПААГ [172].

Секвенирование ДНК по методу Сэнгера с использованием *Taq* ДНК-полимеразы

Использовали 2 пмоля подходящего 5'-радиоактивно меченого праймера, который смешивали в объеме 30 мкл с 4 мкл буфера для секвенирования (Fermentas), 150 фмоль матрицы ДНК и 2 ед. акт. *Taq* ДНК-полимеразы. Далее по 6 мкл этой смеси добавляли к 2 мкл каждой из четырех терминационных смесей G, A, T, C mix (Fermentas), содержащих все четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) и один из четырех дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP). Реакции проводили в амплификаторе MyCycler (Bio-Rad), используя следующий температурный профиль: первичная денатурация в течение 3 минут при 94°C; затем 25 циклов с денатурацией 30 с при 94°C, отжигом праймеров 30 с при 54°C и элонгацией 1 мин при 72°C. По завершении всех циклов к образцам добавляли 4 мкл Stop-раствора. Образцы разделяли в денатурирующем 8% ПААГ.

Приготовление радиоактивно меченых праймеров и ДНК-зондов

Для приготовления 5'-радиоактивно меченого праймера в 15 мкл смешивали 10 пмоль олигонуклеотида, 1 мкл 10x буфера для T4 полинуклеотидкиназы (для прямой реакции), 3 мкл [γ -³²P]ATP (3000 Кю/ммоль) и 10 ед. акт. T4 полинуклеотидкиназы и инкубировали 30 мин при 37°C. Далее фермент инактивировали 3 мин при 95°C. Радиоактивно меченый праймер очищали

на спин-колонке с сефадексом G-25 (GE Healthcare).

ДНК-зонды P1 (или P2) готовили с помощью ПЦР, используя олигонуклеотиды oP1R (или oP2R, соответственно) и oP1F (или oP2F) и плазмиду pUV12 в качестве матрицы. Предварительно в 5'-конец олигонуклеотида oP1F (или oP2F) в ходе киназной реакции вводили нерадиоактивный фосфат, используя 50 пмоль oP1F (или oP2F), 1 мМ АТФ и 10 ед. акт. Т4 полинуклеотидкиназы в соответствующем буфере. Фрагменты ДНК, полученные в результате ПЦР, очищали в агарозном геле, денатурировали и метили по 5'-концу с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ и Т4 полинуклеотидкиназы. Радиоактивно меченые зонды очищали на спин-колонке с сефадексом G-50 (GE Healthcare) и использовали для гибридизации с РНК.

Определение скорости элонгации транскрипции *in vivo*

Клетки *E. coli*, содержащие плазмиды pUV12 и pLacK, подращивали с аэрацией в 25 мл LB-бульона или M9 при 37°C до оптической плотности $\text{OD}_{600} \sim 0.4$. Транскрипцию гена *lacZ* индуцировали с помощью 1 мМ IPTG. Далее каждые 20 с отбирали аликвоты клеточной культуры по 500 мкл, которые переносили в охлажденные на спиртовой бане (-30°C) пробирки с 200 мкл Phet-раствора. Клетки осаждали центрифугированием 2 мин при 16000x g и из них выделяли суммарную РНК. Образцы РНК анализировали с помощью гибридизации с радиоактивно мечеными ДНК-зондами P1 и P2. Эти зонды комплементарны 5'- и 3'- концевым областям мРНК *lacZ*, удаленным на 2700 нуклеотидов друг от друга. Скорость элонгации транскрипции определяли по разнице во времени начала линейного приращения радиоактивности для проксимального (P1) и дистального (P2) зонда [9].

Выделение суммарной РНК из клеток *E. coli*

Клетки *E. coli* осаждали центрифугированием при 16000x g 1 мин, ресуспендировали в 300 мкл лизирующего раствора и прогревали на кипящей водяной бане в течение 2 мин. Затем сразу проводили экстракцию раствором фенола (рН 4.3), затем смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (соотношение 125:25:1, рН 5.2) и, наконец, хлороформом. Из водной фазы РНК осаждали, добавляя 1/10 часть (от начального объема) 3М ацетата натрия (рН 5.2) и 3 объема этанола и выдерживая 1ч при -70°C. Осадок промывали 75% этанолом и растворяли в 40 мкл воды. Все растворы готовились на воде mQ, обработанной диэтилпиروкарбонатом.

Гибридизация РНК с ДНК-зондами

Образцы РНК с равной концентрацией наносили на мембрану Hybond-N⁺ (GE Healthcare) по 3 мкл. С помощью ультрафиолетового излучения (150 мДж/см²) проводили сшивки РНК и мембраны, помещали мембрану в 3 мл раствора для предгибридации (50% формамид, 5х раствор Денхардта, 0.1% SDS, 100 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося, 5х SSPE) и инкубировали при 42°C с постоянным покачиванием в течение 2 ч. Далее в раствор добавляли предварительно денатурированный (5 мин при 100°C) радиоактивно меченый зонд и инкубировали при 42°C с постоянным покачиванием в течение 12 ч. Затем мембрану отмывали, последовательно заменяя растворы: сначала дважды по 15 мин при комнатной температуре в 150 мл раствора 6х SSPE/0.3%SDS, потом дважды по 15 мин при 37°C в 150 мл раствора 1х SSPE/0.3%SDS и, наконец, 1ч при 55°C в 150 мл раствора 0.1х SSPE/0.1%SDS. Мембрану высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой и/или вырезали области мембраны с отдельными образцами и считывали радиоактивный уровень на сцинтиляционном счетчике.

Определение скорости элонгации трансляции *in vivo*

Штаммы *E.coli* подращивали в LB-бульоне до оптической плотности OD₆₀₀~0.4. После индукции экспрессии гена *lacZ* 1мМ IPTG отбирали образцы по 200 мкл каждые 15 с и смешивали с 300 мкл охлажденного раствора хлорамфеникола (1 мг/мл). Далее добавляли 500 мкл Z-буфера, 50 мкл хлороформа, 50 мкл 0.1% SDS и инкубировали при 28°C 10 мин. С момента добавления 100 мкл орто-нитрофенил-β-D-галактозида (ONPG) (8 мг/мл) отсчитывали время. После добавления 500 мкл 1М Na₂CO₃ и центрифугирования определяли образование о-нитрофенола, измеряя оптическую плотность на 420 нм. Полученные величины корректировались вычитанием значения поглощения для образцов, взятых сразу после добавления индуктора IPTG, и нормировались к плотности клеток и времени инкубации после добавления ONPG. Число аминокислотных остатков в мономере β-галактозидазы, равное 1023, делилось на время, необходимое для образования первых функциональных мономеров белка после добавления IPTG [174].

Футпринтинг *in situ*

Клетки тестируемых штаммов *E.coli* растили с аэрацией при 37°C на среде M9, содержащей 0.4% глюкозу, 0.4% казаминовые кислоты и ампициллин (100 мкг/мл) до оптической плотности OD₆₀₀~0.6. После остановки транскрипции рифампицином (0.2 мг/мл)

через определенные промежутки времени осуществляли модификацию азотистых оснований 7 мин 4% хлорацетальдегидом (CAA) при 37°C. Затем клетки сразу охлаждали во льду и промывали физиологическим раствором.

Выделение плазмид из клеток проводили минипрепаративным методом с дополнительной обработкой РНКазой А и протеиназой К и экстракцией фенолом, смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт 25:24:1 и хлороформом.

Для локализации модификаций азотистых оснований в плазидах использовали радиоактивно меченный по 5'-концу олигонуклеотидный праймер oN2. Достройку олигонуклеотидной затравки проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы в ходе модифицированной ПЦР, в которой присутствует только один праймер. Параллельно с этого же праймера вели секвенирование матрицы для определения сайтов модификаций. Использовали следующий температурный профиль реакции: первичная денатурация в течение 3 минут при 94°C; затем 25 циклов с денатурацией 30 с при 94°C, отжигом праймеров 30 с при 54°C и элонгацией 1 мин при 72°C. Образцы разделяли в денатурирующем 8% ПААГ [175].

Обратная транскрипция

Для обратной транскрипции 10 мкг суммарной РНК смешивали с 10 пмоль радиоактивно меченого праймера в объеме 12 мкл. Образцы денатурировали 3 мин при 90°C и быстро охлаждали во льду. Далее добавляли 2 мкл 10x буфера для обратной транскриптазы, 4 мкл dNTP (каждый в концентрации 2.5 мМ), 1 мкл ингибитора РНКаз SUPERase-In (Ambion) и 1 мкл обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека (Ambion). Реакцию проводили в течение 1ч при 44°C. Затем добавляли равный объем stop-раствора. Образцы прогревали 5 мин при 92°C и анализировали в 8% ПААГ.

Инактивация генов

Инактивацию генов в *E.coli* проводили прецизионной инсерцией/делецией структурной области соответствующего гена с помощью метода, основанного на Red-зависимой рекомбинации [176]. Интегративную кассету, содержащую ген устойчивости к хлорамфениколу или канамицину, амплифицировали с помощью ПЦР с соответствующими праймерами и плазидами pMW118- λ attL-Cm^R- λ attR [177] или pKD13 [176] в качестве матрицы. Клетки штамма *E.coli*, содержащего вспомогательную плазмиду pKD46, подрачивали до OD₆₀₀~0.6 при 30°C в SOB-бульоне с 1 мМ арабинозой (для индукции экспрессии генов Red-системы), и трансформировали в них с помощью электропорации линейный фрагмент ДНК с интегративной

кассетой. Интегранты отбирали на среде с хлорамфениколом или канамицином. Вспомогательная плазида элиминировалась после инкубации клеток при 42°C. Замещение целевого гена на маркерный ген проверяли с помощью ПЦР с праймерами, фланкирующими целевой ген с двух сторон. Для удаления маркерного гена мутантный штамм трансформировали плазмидой pInt/Xis (в случае использования системы на основе att-сайтов) или pCP20 (в случае FTR-сайтов). Трансформанты отбирали на среде с ампициллином при 30°C. Для элиминации вспомогательной плазмиды клетки рассеивали на чашки без антибиотиков и инкубировали при 42°C. Отдельные колонии тестировали на чувствительность к ампициллину и хлорамфениколу (или канамицину).

Получение фаголизатов донорских штаммов и трансдукция в штаммы-реципиенты

Готовили суспензию клеток донорского штамма в физиологическом растворе (10^8 клеток/мл), инфицировали их фагом P1 в нескольких разведениях в среде LB, содержащей 2.5 mM CaCl₂ и 0.1% глюкозу, и высевали на чашки с агаризованным LB с 0.1% глюкозой. С чашек, где множественность заражения составляла 10^3 - 10^4 бляшек на чашку, собирали фаговый лизат, обрабатывали хлороформом и изолировали супернатант, содержащий фаговые частицы.

Культуру клеток штамма-реципиента *E.coli* выращивали в 5 мл LB бульона в течение 12 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием. Осадок дважды промывали физиологическим раствором, содержащим 0.025 M CaCl₂. К 0.5 мл клеточной суспензии добавляли 0.1 мл лизата фага P1, выращенного на требуемом штамме *E.coli*, инкубировали в течение 15 мин при 37°C и высевали на селективные чашки. Полученные трансдуктанты промывали физиологическим раствором и рассеивали до единичных колоний. Отобранные трансдуктанты проверялись на наличие инсерций в генах с помощью контрольной ПЦР с использованием соответствующих пар праймеров, фланкирующих инактивируемый ген.

Тест на чувствительность к генотоксичным реагентам и ультрафиолетовому облучению

Клетки *E.coli* подращивали в LB-бульоне, готовили необходимые разведения культуры в физиологическом растворе, высевали на чашки с LB-агаром без добавок или с добавлением митомицина C (0.5-1 мкг/мл) или цисплатина (80 мкг/мл) или 4-NQO (1-3 мкМ) и инкубировали 24 ч при 30°C. В опыте на чувствительность к ультрафиолетовому излучению необходимые разведения культуры высевали на чашки с LB-агаром, облучали с помощью ультрафиолетовой лампы (254 нм) и инкубировали в темноте 24 ч при 30°C.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. КООРДИНАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ И ТРАНСЛЯЦИИ

3.1.1. Скорость транскрипции и трансляции *in vivo* в различных условиях роста клеток

Для выяснения, не может ли рибосома непосредственно влиять на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo* и определять ход транскрипции, мы направленно воздействовали на рибосому, меняя скорость трансляции, и проверили, что при этом произойдет со скоростью транскрипции.

Для измерения скорости элонгации транскрипции *in vivo* мы использовали плазмиду pUV12 с репортерным геном *LacZ* под контролем IPTG-индуцибельной версии промотора A1 фага T7 [9] (рис. 9). Среднюю скорость элонгации определяли по разнице во времени появления сигнала гибридизации со специфических зондов, комплементарных проксимальной и дистальной частям гена *LacZ*. Хотя абсолютные значения сигналов гибридизации могут меняться в зависимости от разных факторов (Rho-зависимая терминация, стабильность РНК или скорость инициации транскрипции), время между линейным приращением сигнала от двух зондов зависит только от скорости движения РНК-полимеразы [9, 163] (рис. 10). Мы также определили скорость элонгации трансляции по времени, необходимом для синтеза первых активных мономеров β -галактозидазы [174] (рис. 11).

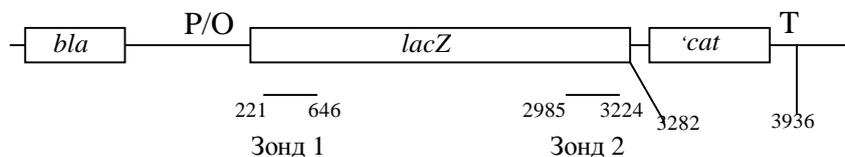


Рисунок 9. Схема фрагмента плазмиды pUV12. Прямоугольниками условно обозначены гены. Отмечены положения промотора T7A1_{04/03} с *lac* оператором (P/O), терминатора транскрипции *rrnB* (T), а также использованных в гибридизации зондов (1 и 2), комплементарных *lacZ* транскриптам.

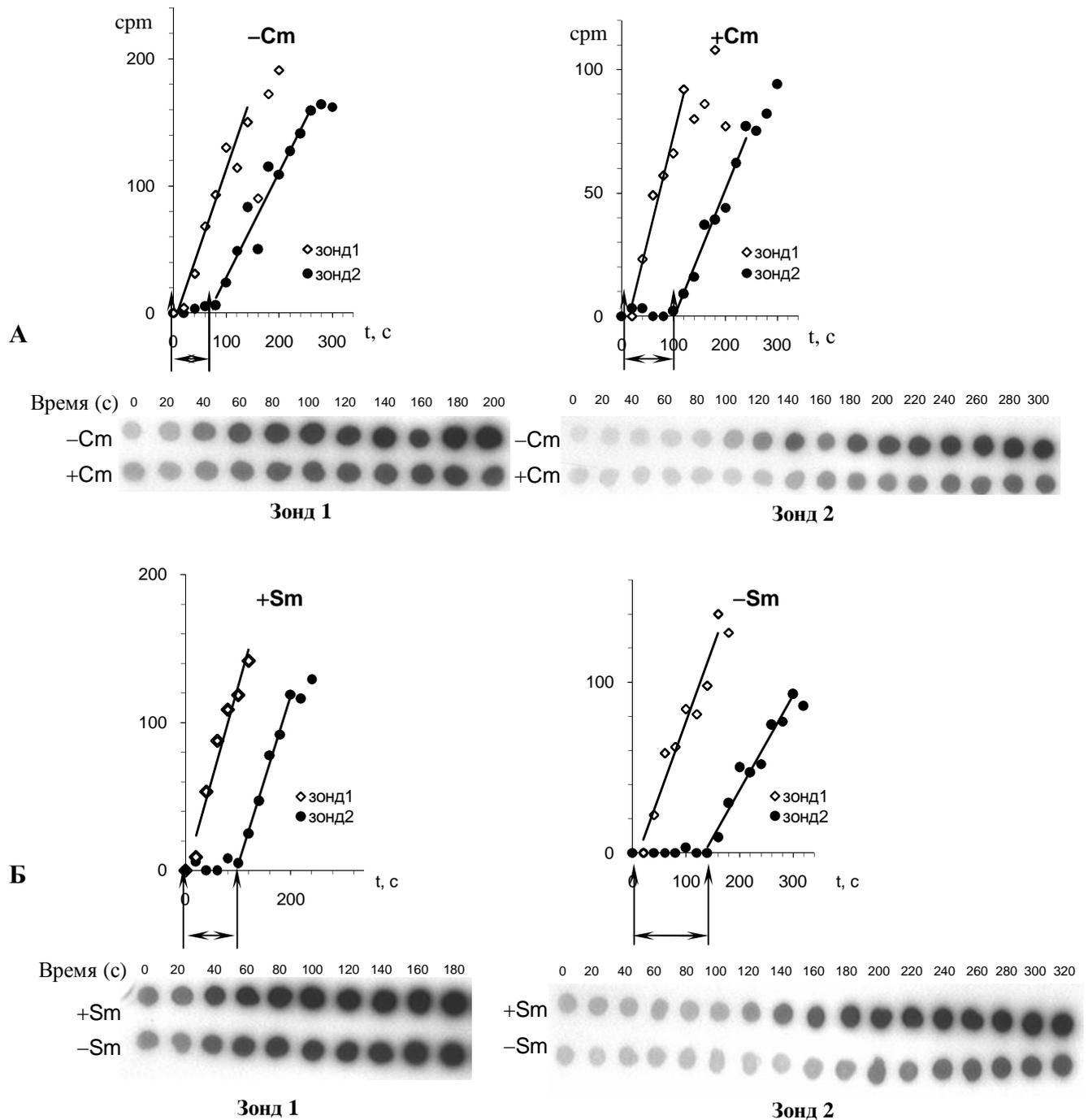


Рисунок 10. Скорость элонгации транскрипции зависит от скорости трансляции. Эффект хлорамфеникола (Cm) (А) на элонгацию транскрипции в штамме Mg1655 и стрептомицина (Sm) в штамме CN184 (Б). Представлены типичные результаты гибридизации РНК с проксимальным (1) и дистальным (2) зондом. Время отсчитывалось от момента добавления IPTG к клеткам. Скорость элонгации транскрипции определяли, используя графики зависимости приращения сигнала гибридизации от времени после индукции транскрипции *lacZ*. Значение радиоактивности на гибридизационных панелях в нулевой момент времени принималось за фон и вычиталось из всех значений в последующие моменты времени.

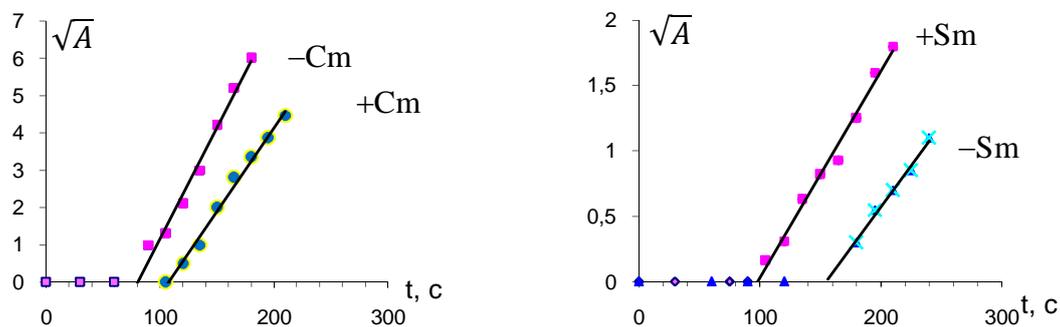


Рисунок 11. Эффект Cm и Sm на скорость элонгации трансляции. Кинетика образования о-нитрофенола представлена как функция квадратного корня из нормированных значений поглощения образцов (A) (420 нм) от времени. Время, необходимое для синтеза первых мономеров β -галактозидазы, найдено после экстраполяции функции к нулевым значениям поглощения.

Для замедления рибосом мы использовали хлорамфеникол (Cm), специфический ингибитор элонгации трансляции. Хлорамфеникол в концентрации, которую мы применяли (1 мкг/мл), оказывает лишь мягкий ингибирующий эффект на бактериальный рост. В отсутствие антибиотика скорость элонгации транскрипции гена *lacZ* в использованных условиях роста клеток в экспоненциальной фазе составила ~ 42 нуклеотида в секунду (нт/с), что точно соответствует скорости элонгации трансляции ~ 14 аминокислотных остатков в секунду (а.о./с) (рис. 10 и 11). Однако снижение скорости трансляции с помощью хлорамфеникола до 9 а.о./с повлекло соответствующее уменьшение скорости элонгации транскрипции до 27 нт/с (табл. 3, рис. 10 и 11). Для подтверждения гипотезы, что рибосома непосредственно контролирует скорость транскрипции, мы воспользовались штаммом *E. coli* с хромосомными мутациями в гене *rpsL* [167], кодирующем рибосомный белок S12. Этот штамм (CH184) характеризуется сниженной скоростью элонгации трансляции, однако стрептомицин (Sm) стимулирует почти двукратное увеличение скорости трансляции. Действительно, в отсутствие антибиотика скорость трансляции составила 6 а.о./с, а при добавлении 100 мкг/мл стрептомицина возросла до 10 а.о./с, что согласуется с описанными ранее данными [167]. Скорость элонгации транскрипции в этом штамме составила 19 нт/с, однако в присутствии стрептомицина выросла до 30 нт/с (табл. 3, рис. 10 и 11), что соответствует изменению в скорости трансляции.

Противоположный эффект трансляционных антибиотиков (Сm и Sm) на элонгацию транскрипции (замедление и ускорение рибосом) показывает, что скорость движения рибосомы по РНК определяет скорость движения РНК-полимераз по матрице ДНК. Влияние носит взаимный характер, поскольку, очевидно, что рибосома не может вести трансляцию быстрее, чем РНК-полимераза синтезирует РНК.

Таблица 3. Средняя скорость элонгации транскрипции соответствует скорости элонгации трансляции в различных условиях роста клеток. Указанные штаммы растили в среде LB до OD_{600} 0.4, если не указано иное. В стационарной фазе индукцию проводили при OD_{600} 2.5. В качестве альтернативных источников углерода также использовали глицерин (0.5%) или α -метил-глюкозид (в отношении 15:1 к глюкозе). (*) В каждом случае данные получены на основе трех-четырёх повторностей опыта. В то время как абсолютные значения сигналов гибридизации могли меняться от опыта к опыту, расчетная скорость транскрипции и трансляции воспроизводилась со стандартным отклонением не более 15%.

Штамм	Условия роста клеток	Скорость транскрипции* (нт/с)	Скорость трансляции* (а.о./с)
MG1655		42	14
MG1655	+Сm	27	9
MG1655	стационарная фаза	21	7
MG1655	глицерин	31	10
MG1655	α MG	23	8
CH184	+Sm	31	10
CH184		19	6
CH184	стационарная фаза +Sm	22	7
CH184	стационарная фаза	12	4

Мы обнаружили соответствие скоростей транскрипции и трансляции в различных условиях культивирования клеток, включая разные источники углерода и фазы роста (табл. 3, рис. 12 и 13). В стационарной фазе транскрипция и трансляция согласованно замедляются в клетках “дикого типа” (MG1655) или штамма с “медленной рибосомой” (CH184). Кроме того, Sm ускоряет и транскрипцию, и трансляцию в стационарной фазе роста в клетках CH184 до уровня, наблюдаемого в MG1655 в стационарной фазе. Таким образом, транскрипция находится под строгим трансляционным контролем в меняющихся условиях роста бактерий.

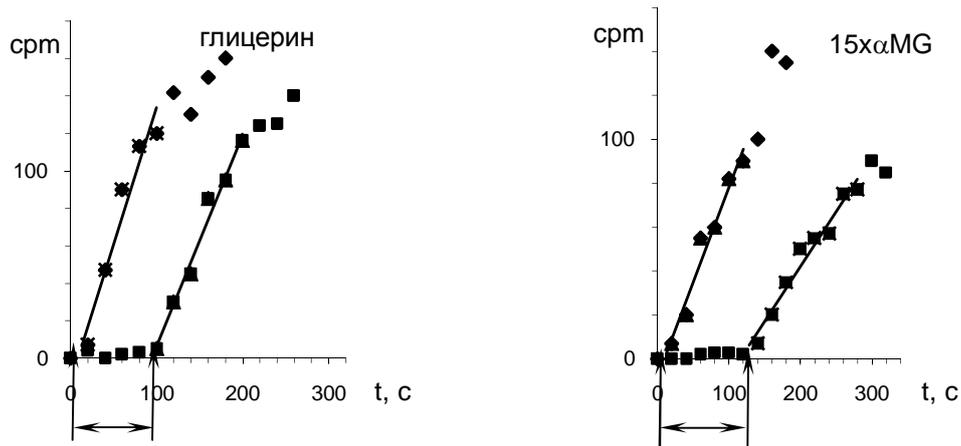


Рисунок 12. Эффект различных источников углерода на элонгацию транскрипции. Типичные графики приращения сигнала гибридизации от времени после индукции транскрипции *lacZ*.

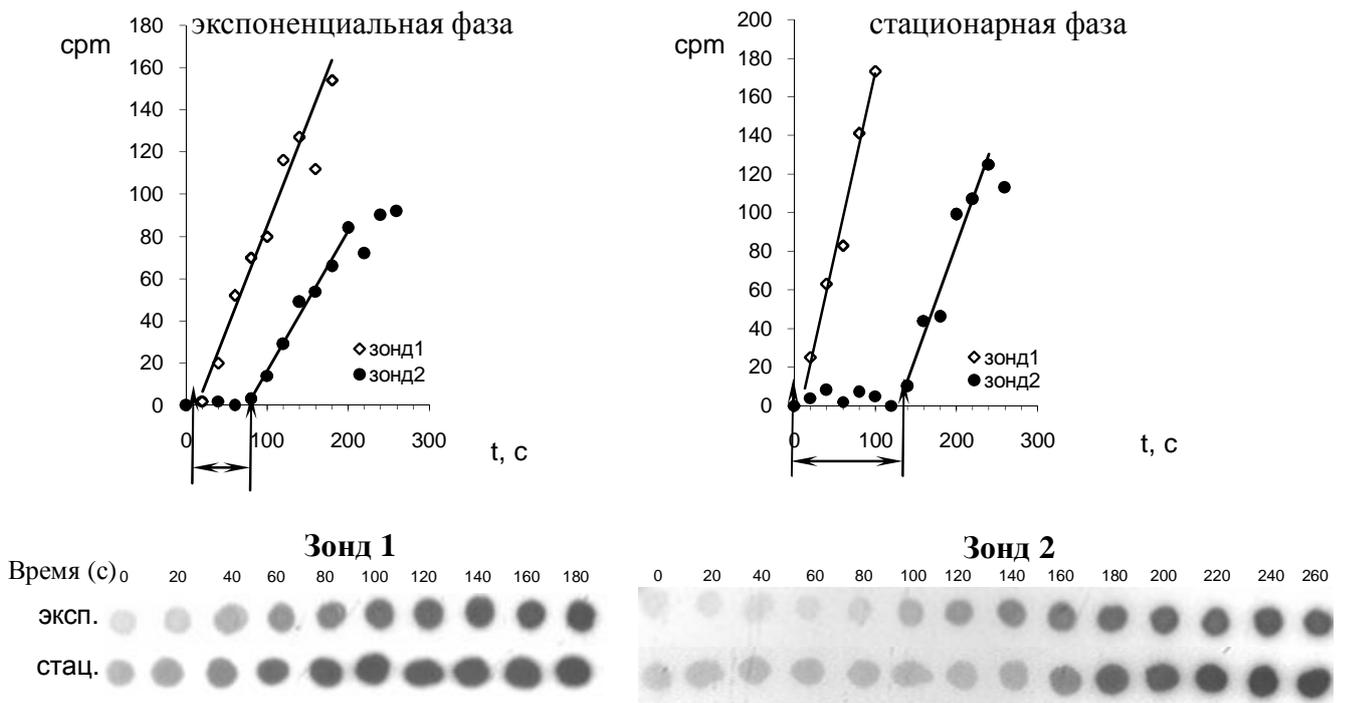


Рисунок 13. Скорость элонгации транскрипции меняется на разных фазах роста клеток. Типичные результаты гибридизации РНК с проксимальным (1) и дистальным (2) зондом в MG1655 на экспоненциальной фазе роста ($OD_{600} \sim 0.4$) и стационарной фазе ($OD_{600} \sim 2.5$).

3.1.2. Структурные изменения элонгационного комплекса РНК-полимеразы под влиянием рибосомы

В ходе транскрипции часто происходят спонтанные возвратные смещения РНК-полимеразы вдоль ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo* [21, 48, 55]. При этом 3'-конец РНК выходит из активного центра, что приводит к паузам в транскрипции или остановкам транскрипции с образованием инактивированных элонгационных комплексов. Подобного рода паузы и остановки могут задавать среднюю скорость элонгации транскрипции [162-163]. Ранее было показано, что элонгационный комплекс РНК-полимеразы способен подавлять откат впереди идущего элонгационного комплекса [162-163]. Поскольку при откате РНК-полимеразы синтезируемая РНК проходит через фермент в обратном направлении, транслирующая рибосома может ингибировать такое смещение, сдвигая элонгационный комплекс вперед. В результате, контролируя паузы и остановки транскрипции, рибосома может определять скорость транскрипции.

Для проверки этой гипотезы мы разработали модельную систему, которая позволяет детектировать влияние рибосомы на смещение РНК-полимеразы *in vivo*. За основу была взята плаزمида рАТС10 (другое название р2ЕС), на которой РНК-полимераза начинает транскрипцию с конститутивного промотора *hisR* и останавливается на расстоянии 64 нуклеотида от старта транскрипции перед Lac репрессором, связанным с последовательностью *lac* оператора [163, 175] (рис. 14). Ранее было показано, что при столкновении РНК-полимеразы с белком, связанным с ДНК, элонгационный комплекс смещается против хода транскрипции *in vitro* и *in vivo*, и такое возвратное смещение ограничивает способность РНК-полимеразы проходить через препятствие на матрице ДНК [163]. Остановка РНК-полимеразы на данной плазмиде происходит в пределах тринуклеотидного повтора (АТС)₁₀, что позволяет с высокой точностью локализовать положение элонгационного комплекса на матрице ДНК. Каждое азотистое основание этой нуклеотидной последовательности может быть модифицировано *in situ*, а регулярное повторение нуклеотидов исключает вариации в реакционной способности оснований в зависимости от специфической последовательности [55, 175].

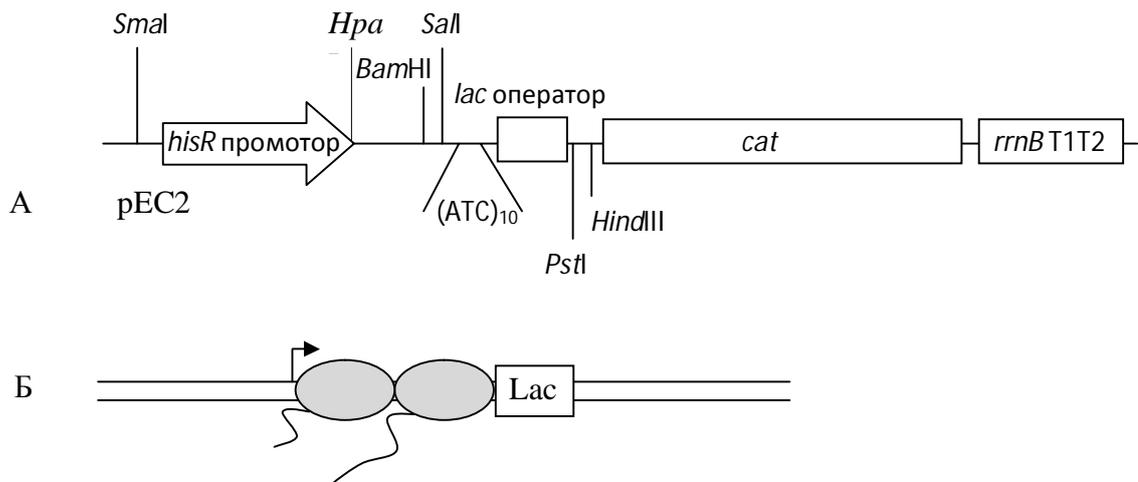


Рисунок 14. Модельная система для изучения элонгационных комплексов РНК-полимеразы *in vivo*. (А) Схема фрагмента плазмиды рЕС2 с указанием функциональных элементов и уникальных сайтов рестрикции. (Б) Схематичное изображение остановленных перед Lac репрессором РНК-полимераз. Участок плазмиды рЕС2 между *lac* оператором и *hisR* промотором вмещает два элонгационных комплекса.

Для устранения эффектов, связанных с влиянием на остановленную РНК-полимеразу следующих за ней других молекул РНК-полимераз [162-163], мы приготовили генно-инженерную конструкцию, позволившую получить *in vivo* изолированный элонгационный комплекс (рис. 15). Мы модифицировали плазмиду рЕС2, клонировав Rho-независимый терминатор транскрипции *trp* между промотором и оператором. Нуклеотидная последовательность терминатора была введена с таким расчетом, чтобы между политимидиновой последовательностью терминатора и операторным участком мог поместиться только один элонгационный комплекс РНК-полимеразы. Терминатор *trp* встроили в плазмиду рЕС2 по сайту *Bam*HI, используя синтетический дуплекс ДНК из олигонуклеотидов Ter3 и Ter4. Конструкция олигонуклеотидов позволила ввести уникальный сайт *Bam*HI между промотором и терминатором, что отличает полученную в этой работе плазмиду рЕС1 от описанной ранее плазмиды рАТС-Ter [163].

На основе рЕС1 нами также была сконструирована плазмида р^{RBS}1ЕС, содержащая последовательность Шайна-Дальгарно (SD), энхансер трансляции гена 10 бактериофага Т7 [178] и АТГ кодон на расстоянии 120 нуклеотидов от *lac*-оператора (рис. 15). Между иницирующим кодоном и *lac* оператором формируется открытая рамка считывания. Для этого

в плазмиду pEC1 по сайту *Bam*HI встроили синтетические дуплексы ДНК, составленные из олигонуклеотидов Ins1, Ins 2, SD3 и SD4. Нуклеотидная последовательность полученных плазмид pEC1 и p^{RBS}1EC между *hisR* промотором и *lac* оператором была проверена секвенированием.

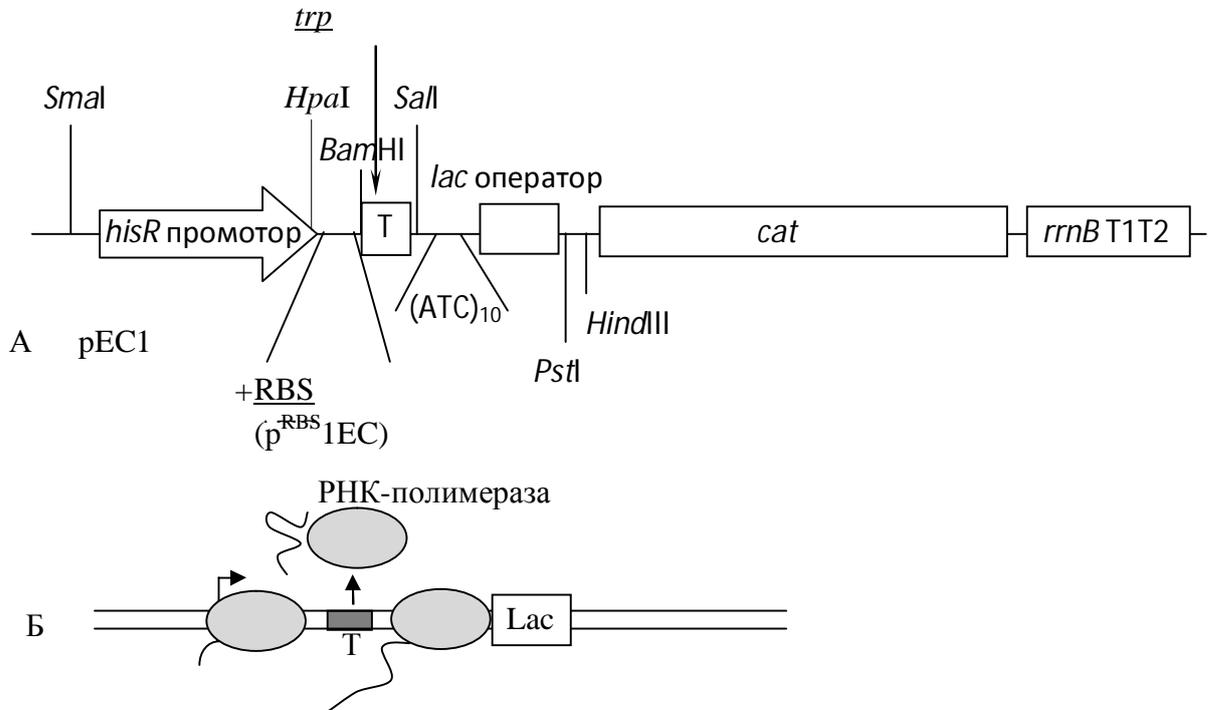


Рисунок 15. Модельная система для изучения изолированного элонгационного комплекса РНК-полимеразы и анализа влияния на него рибосомы *in vivo*. (А) Плазмида pEC1 получена на основе pEC2 добавлением терминатора *trp*. Плазмида p^{RBS}1EC – производная от pEC1, в которой закодирован сайт связывания рибосомы (RBS) и содержится открытая рамка считывания. (Б) Лидирующий элонгационный комплекс РНК-полимеразы остановлен на участке с тринуклеотидными повторами (ATC)₁₀ перед Lac репрессором. Терминатор транскрипции *trp* (Т) в плаزمиде pEC1 и p^{RBS}1EC размещен таким образом, что последующая РНК-полимераза останавливается точно на терминаторе и отделяется от матрицы.

Для определения положения элонгационного комплекса на матрице ДНК *in vivo* использовали хлорацетальдегид (САА), специфичный к одноцепочечным участкам ДНК. САА образует имидазольные кольца между положениями N3 и N4 цитозина или N1 и N6 аденина. В двухцепочной ДНК эти группы вовлечены в образование водородных связей и не реагируют с САА [179]. В элонгационном комплексе РНК-полимеразы нематричная цепь ДНК в пределах транскрипционного пузыря находится в одноцепочечной форме, что делает реакционно-способные группы гетероциклических оснований доступными для реакции с САА. Сайты модификаций в экстрагированной из клеток ДНК определяли методом достройки праймера. В

данном подходе специфический радиоактивно меченный по 5'-концу праймер гибридизуется с выделенной ДНК и удлиняется *in vitro* ДНК-полимеразой, которая прекращает синтез цепи ДНК в сайтах модификаций (рис. 16). Продукты удлинения праймера с одинаковым 5'-концом, но различающиеся по 3'-концу в соответствии с позициями модификаций, анализируют в денатурирующем полиакриламидном геле.

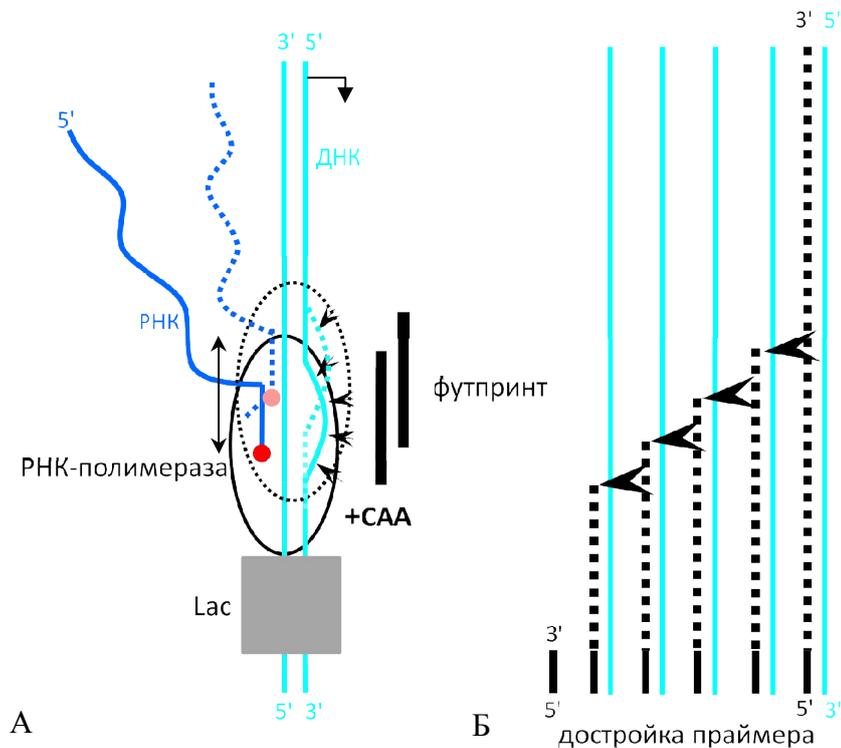


Рисунок 16. Локализация *in situ* элонгационного комплекса РНК-полимеразы на матрице ДНК с помощью хлорацетальдегида (САА). (А) Схематично показан остановленный перед репрессором элонгационный комплекс, который находится в динамическом равновесии между активированным состоянием (3'-конец РНК в активном центре фермента) и неактивным состоянием (при смещении РНК-полимеразы назад). САА модифицирует азотистые основания в одноцепочечном участке ДНК транскрипционного пузыря (схематично обозначено стрелками). (Б) Модифицированные основания ДНК устанавливаются с помощью удлинения праймера ДНК-полимеразой.

В результате анализа полученных футпринтов, как и ожидалось, на плазмиде рЕС2 было обнаружено два остановленных перед репрессором элонгационных комплекса РНК-полимеразы, а на плаزمидах рЕС1 и $p^{RBS}1EC$ – по одному (рис. 17). Однако положение РНК-полимеразы, находящейся непосредственно перед репрессором, на этих матрицах существенно отличается. Изолированная РНК-полимераза на матрице рЕС1 в большей степени смещается назад, чем соответствующая РНК-полимераза на матрице $p^{RBS}1EC$ (или рЕС2): на рЕС1 повышается чувствительность к САА оснований у верхней границы футпринта и снижается у

нижней (рис. 17). Таким образом, аналогично эффекту предшествующего элонгационного комплекса на впереди идущий комплекс (дорожка 1 на рис. 17) [163], рибосома препятствует откату РНК-полимеразы.

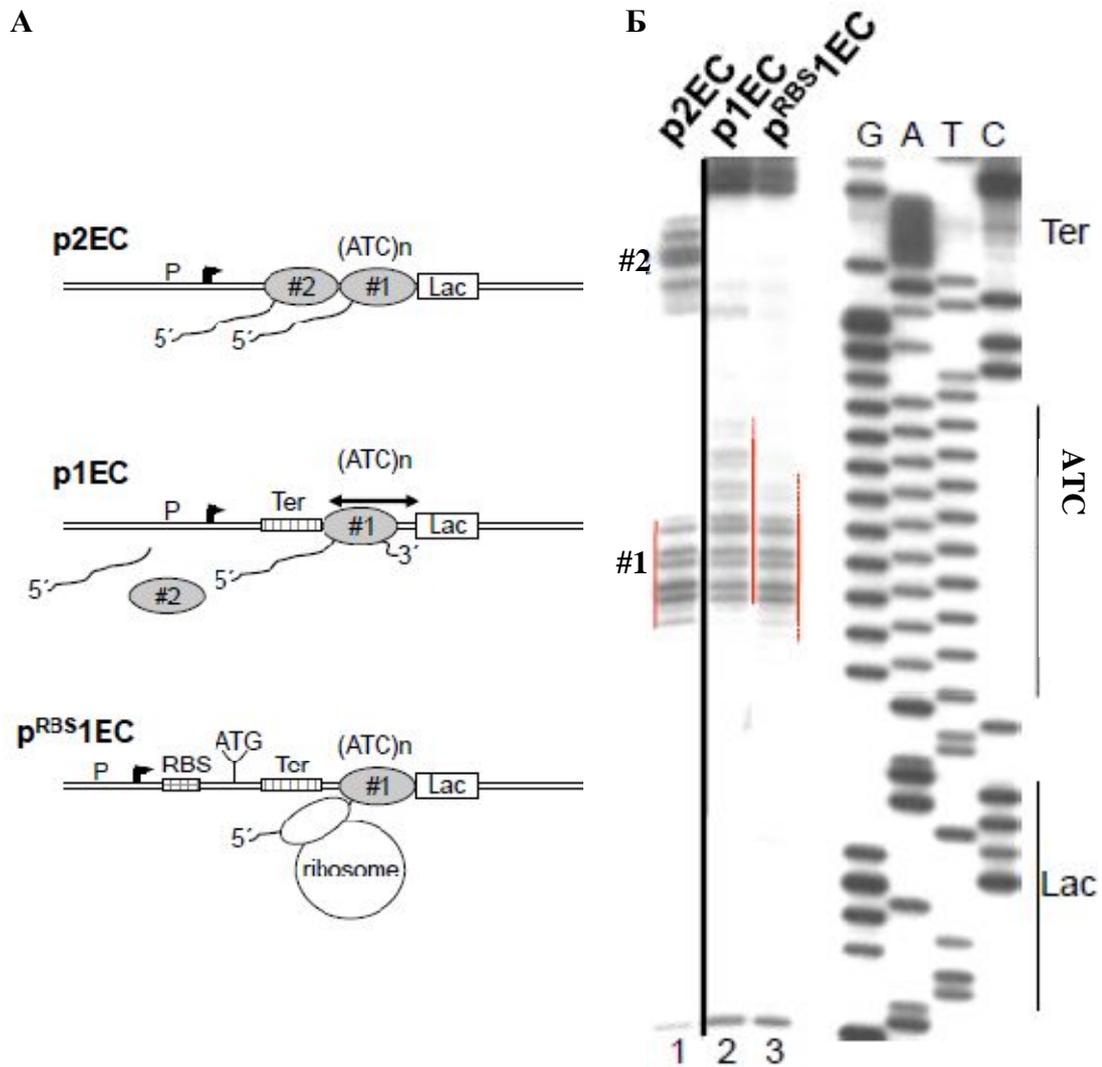


Рисунок 17. Рибосома подавляет возвратное смещение РНК-полимеразы. (А) Схема конструкций p2EC, p1EC и p^{RBS}1EC. (Б) Модификации САА *in situ* нематричной цепи ДНК в плазидах p2EC (дорожка 1), p1EC (дорожка 2) и p^{RBS}1EC (дорожка 3) проанализированы методом достройки праймера. В присутствии второй РНК-полимеразы (дорожка 1) или транскрибирующей рибосомы (дорожка 3) остановленная перед препятствием РНК-полимераза сдвигается вперед по ходу транскрипции.

Кроме подавления рибосомой пауз в транскрипции, вызванных откатом РНК-полимеразы, нельзя исключать возможность ингибирования рибосомой пауз, определяемых вторичной

структурой РНК. Однако паузы в транскрипции, зависящие от шпилечных структур синтезируемой РНК, вероятно, менее часты, чем паузы, связанные с откатом РНК-полимеразы [73]. Паузы, определяемые шпильками РНК, обнаружены только в лидерных областях некоторых метаболических генов [8, 69] и зависят от специфических нуклеотидных последовательностей впереди и позади шпильки в РНК [68]. Обычно шпилька в РНК не приводит к паузе в транскрипции, как, например, в случае стабильной шпильки Rho-независимого терминатора [72] (рис. 18). Напротив, именно политимидиновая последовательность терминатора ответственна за паузу, связанную с откатом РНК-полимеразы [72]. В то же время белковые факторы, супрессирующие откат РНК-полимеразы, (например, NusG и RfaH) увеличивают скорость элонгации транскрипции [61, 180] (рис. 18). Поэтому, вероятно, скорость элонгации в основном определяется паузами, связанными с откатом РНК-полимеразы, и стимулирующий эффект рибосомы на элонгацию транскрипции является результатом подавления пауз этого типа.

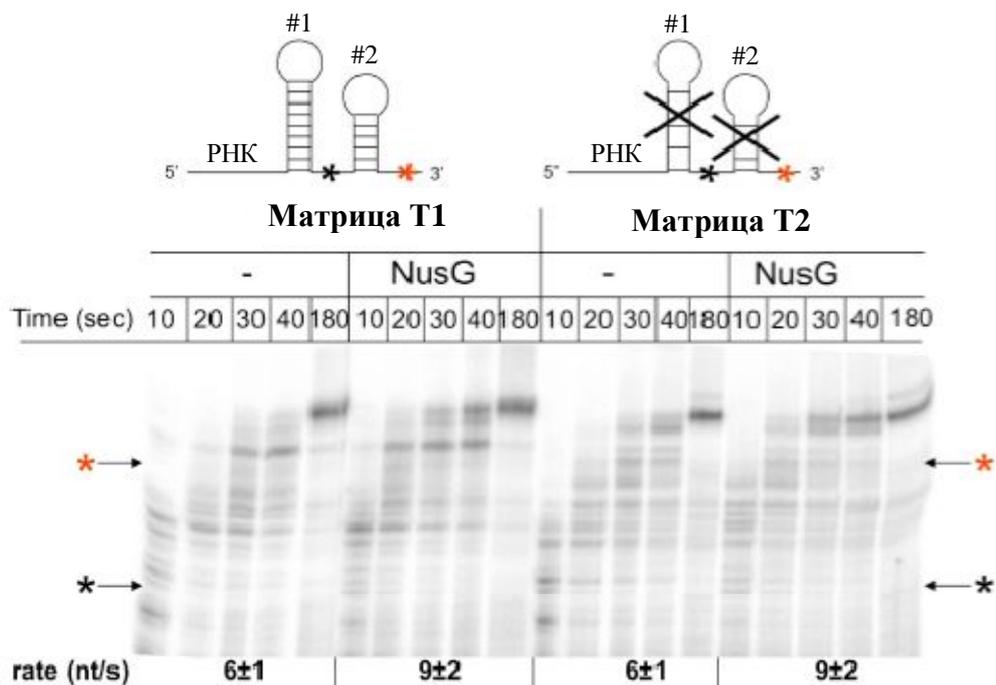
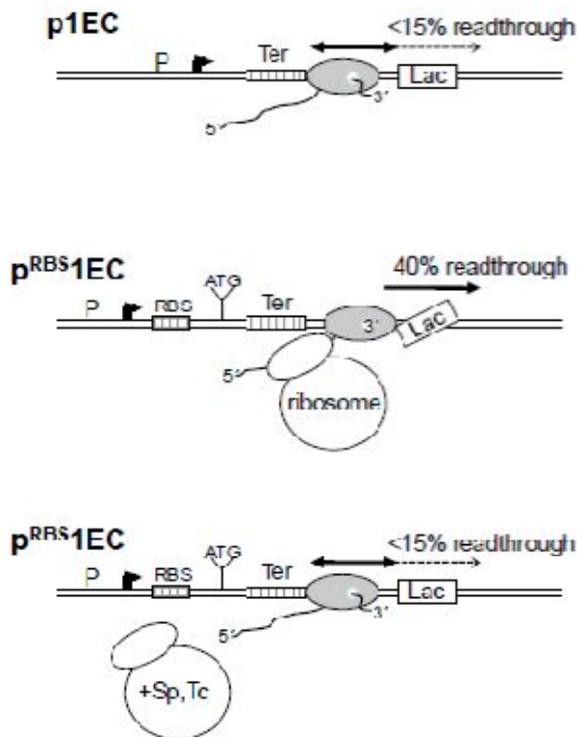


Рисунок 18. Влияние вторичной структуры РНК и фактора NusG на скорость элонгации транскрипции *in vitro*. Матрица ДНК T1 содержит G-C-богатые инвертированные повторы из 9 и 6 нуклеотидов, определяющие образование шпилек #1 и #2, соответственно, в кодируемой РНК. Матрица ДНК T2 отличается от матрицы T1 нуклеотидными заменами, предотвращающими образование этих шпилек. Звездочками отмечены положения потенциальных сайтов пауз в транскрипции на расстоянии 7-10 нуклеотидов от шпилек в РНК #1 и #2, которые не детектируются в использованных условиях *in vitro*. Элонгационный фактор NusG, супрессирующий возвратные смещения РНК-полимеразы, одинаково повышает скорость элонгации транскрипции на обеих матрицах.

3.1.3. Влияние рибосомы на прохождение РНК-полимеразой участков ДНК, связанных с белками

Поскольку ингибирование возвратных смещений облегчает прохождение РНК-полимеразой участков матрицы ДНК, связанных с белками [163], рибосома также может способствовать преодолению РНК-полимеразой этих участков. Мы напрямую проверили это предположение, сравнив количество мРНК *cat*, синтезируемой за репрессором на матрицах p1EC и p^{RBS}1EC (рис. 19). Накопление мРНК *cat* оценили с помощью обратной транскрипции, используя праймер oN3. Для нормирования проб оценивали также количество мРНК *bla*, используя праймер bla. На матрице p1EC, не кодирующей рибосом-связывающего участка, только ~10% элонгационных комплексов РНК-полимераз преодолевают связанный с матрицей ДНК Lac репрессор. Однако доля элонгационных комплексов, транскрибирующих ДНК ниже репрессора, возрастает до 40% на матрице p^{RBS}1EC, кодирующей рибосом-связывающий участок. В то же время ингибирование элонгации трансляции антибиотиками производит обратный эффект. Таким образом, функциональное взаимодействие *in vivo* между рибосомой и РНК-полимеразой облегчает прохождение РНК-полимеразой участков матрицы ДНК, связанных с белками.

А



Б

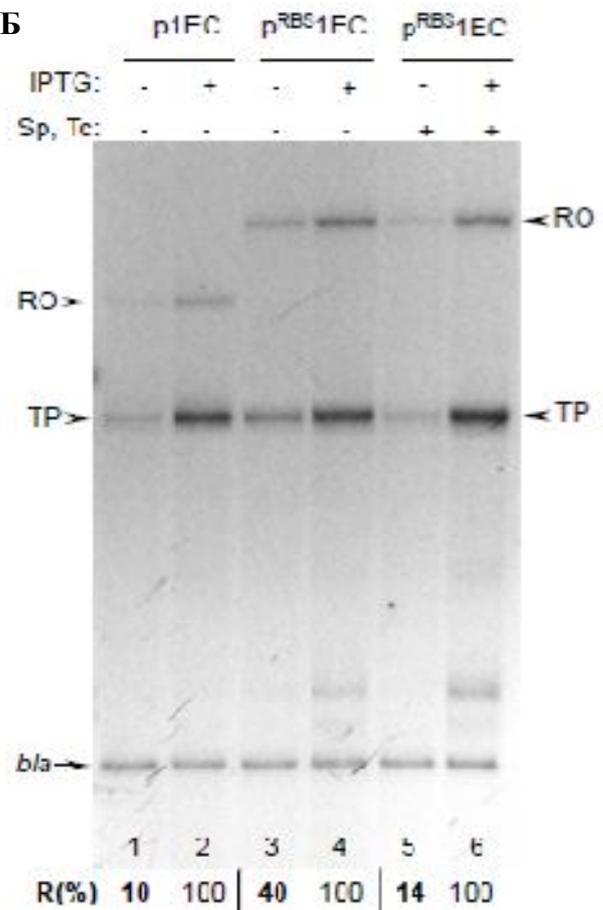


Рисунок 19. (Подпись к рисунку – на следующей странице)

Рисунок 19. Вклад рибосомы *in vivo* в преодоление РНК-полимеразой белков, связанных с ДНК. (А) Схема, описывающая кооперативный механизм. Рибосома реактивирует остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы. Каталитически компетентный элонгационный комплекс РНК-полимеразы проходит через препятствие в виде Lac-репрессора, как только произойдет диссоциация последнего и матрицы ДНК. Ингибирование элонгации трансляции антибиотиками (Sp, Tc) нарушает кооперативный механизм, снижая эффективность прохождения препятствия РНК-полимеразой. (Б) На радиоавтографе представлены продукты обратной транскрипции с ³²P-меченых праймеров, гибридизующихся с РНК-транскриптами генов *cat* или *bla* (для нормировки). Стрелками отмечена полноразмерная ДНК, полученная при обратной транскрипции мРНК *cat* (RO, runoff), и цепь ДНК, синтез которой прерван терминационной шпилькой на этой же матрице РНК (TR). За эффективность преодоления РНК-полимеразой препятствия на матрице ДНК (R, %) принята доля продуктов обратной транскрипции (RO+TR) от числа продуктов (100%) в условиях дерепрессии (+IPTG).

3.2. КООРДИНАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ И РЕПАРАЦИИ ДНК

Единственный известный у бактерий фактор, связывающий транскрипцию с репарацией, - Mfd [145, 148]. *In vitro* Mfd смещает остановленную РНК-полимеразу вперед по ходу транскрипции и в конечном итоге удаляет ее с матрицы [148]. Согласно принятой модели Mfd привлекает к поврежденному участку ДНК димер UvrA, запуская эксцизионную репарацию нуклеотидов. Далее UvrA₂ взаимодействует с димером UvrB, что приводит к сгибанию ДНК и высвобождению UvrA₂. Белок UvrC связывается с комплексом UvrB-ДНК в образованном “пузырьке” из ~13 нуклеотидов и катализирует расщепление цепи ДНК с двух сторон от повреждения. Образовавшийся олигонуклеотид вытесняется фактором UvrD и/или ДНК-полимеразой I, которая заполняет брешь, используя неповрежденную цепь ДНК в качестве матрицы. Наконец, лигаза сшивает разрывы ДНК [13].

Отдельные этапы транскрипции и репарации ДНК, такие, как узнавание РНК-полимеразой повреждений ДНК, а также вырезание поврежденного нуклеотида белками системы репарации и заполнение бреши в ДНК, изучены гораздо лучше, чем механизм связи этих двух процессов.

3.2.1. Воздействие фактора Mfd на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo*

Инактивация гена mfd E. coli

Для изучения физиологической роли фактора Mfd был получен штамм *E. coli* с инактивированным кодирующим его геном *mfd*. Для инактивации использовали метод, предложенный Даценко и Ваннером, на основе Red-зависимой рекомбинации [176]. Нуклеотидная последовательность *mfd* в хромосоме заменялась селективным маркерным геном *cat*, фланкированным сайтами λ attL и λ attR (рис. 20А). Интегрируемый фрагмент ДНК

амплифицировали с плазмиды pMW118- λ attL-Cm^R- λ attR [177] с помощью олигонуклеотидов mfd-L и mfd-R, 5'-концы которых содержат 36-нуклеотидные последовательности, гомологичные N- и С- концевым областям структурного гена *mfd*. Сайты λ attL и λ attR позволяют вырезать маркерный ген после отбора интегрантов с помощью вспомогательной плазмиды pMW-int/xis, используя Int/Xis-зависимую систему рекомбинации фага λ . Для подтверждения интеграции кассеты λ attL-Cm^R- λ attR в ген *mfd* и ее последующее выщепление провели ПЦР на матрице хромосомной ДНК с праймерами mfd1 и mfd2 (рис. 20Б).

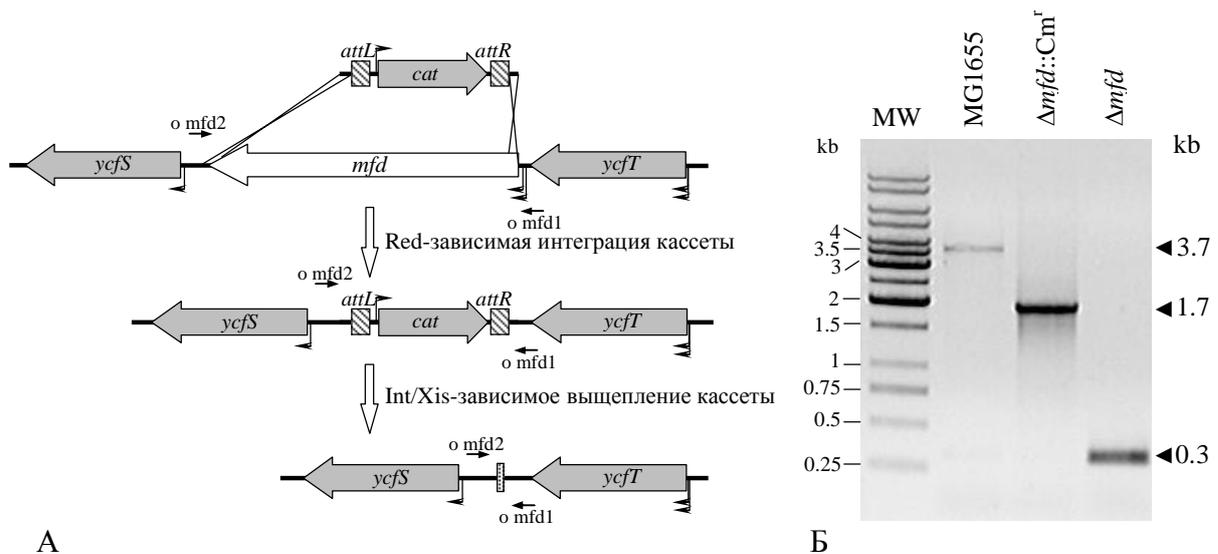


Рисунок 20. Инактивация гена *mfd*. (А) Схема интеграции кассеты attL-*cat*-attR в хромосомный локус *mfd* и ее выщепление с образованием делеции Δ *mfd*. (Б) Проверка интеграции и выщепления кассеты с помощью ПЦР с праймерами mfd1 и mfd2 на матрице хромосомной ДНК из указанных штаммов. Слева указаны длины (в т.п.о.) маркера ДНК (MW), справа - расчетные длины амплифицированных фрагментов ДНК.

Взаимодействие Mfd с остановленным элонгационным комплексом РНК-полимеразы

Для исследования влияния, которое оказывают транскрипционный фактор Mfd на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo*, мы сравнили положение остановленного элонгационного комплекса РНК-полимеразы на матрице рЕС1 в двух изогенных штаммах *E. coli*: дикого типа (MG1655) и мутанте с инактивированным геном *mfd*. Тестирование провели, используя метод футпринтинга *in situ* [55]. Для того чтобы следить за изменениями, которые происходят с элонгационным комплексом с течением времени, мы использовали рифампицин, позволяющий ингибировать новые раунды транскрипции с промотора, и через определенные

временные интервалы после добавления антибиотика проводили модификацию оснований одноцепочечных участков матрицы ДНК с помощью хлорацетальдегида (САА) (рис. 21).

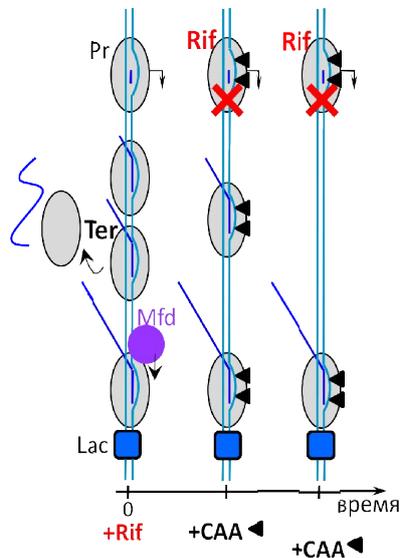


Рисунок 21. Схематичное изображение модельной системы с остановленным перед белком-репрессором элонгационным комплексом РНК-полимеразы на матрице pEC1. После прекращения новых раундов транскрипции рифампицином (+Rif) определяли положение элонгационного комплекса *in situ* с помощью хлорацетальдегида (+САА). Отмечено положение промотора (Pr), терминатора (Ter) и репрессора (Lac).

Чувствительность к САА оснований перед оператором указывает на положение остановленного элонгационного комплекса. При добавлении IPTG, в результате чего с матрицы удаляется репрессор, основания в данном сайте становятся нечувствительными к САА. Это подтверждает остановку изолированного элонгационного комплекса репрессором. Добавление рифампицина в нашем опыте блокирует новые раунды транскрипции с промотора, не давая РНК-полимеразе синтезировать РНК длиннее 2-3 нуклеотидов, что видно по увеличению реакционной способности гетероциклических оснований в районе промотора и уменьшению реакционной способности оснований в области между промотором и терминатором (рис. 22). В штамме дикого типа (MG1655) реакционная способность оснований между терминатором и *lac* оператором быстро уменьшается после добавления рифампицина, что говорит о резком сокращении числа остановленных перед препятствием на матрице элонгационных комплексов. Исчезновение остановленных элонгационных комплексов с течением времени в условиях, когда нет поступления новых комплексов с промотора, может происходить при активном удалении их с матрицы и/или прохождении ими через препятствие. По сравнению со штаммом дикого типа в

штамме с инактивированным геном *mfd* наблюдается сильное увеличение в реактивности оснований перед оператором, т.е. в области, где находится остановленный элонгационный комплекс (рис. 22). Кроме того, после ингибирования новых раундов транскрипции рифампицином уменьшение реакционной способности оснований в этом районе происходит гораздо медленнее, чем в штамме дикого типа. Таким образом, в мутантном штамме, в котором отсутствует фактор Mfd, перед препятствием на матрице накапливается большее число РНК-полимераз и они проводят там гораздо большее время по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 22).

Наши результаты, полученные *in vivo*, указывают на то, что для функционирования Mfd не обязательно наличия поврежденной ДНК, при этом действие фактора направлено на остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы, что согласуется с данными *in vitro* [145, 148]. Остановка РНК-полимеразы может стать предпосылкой к возвратным смещениям элонгационного комплекса, и транслирующие рибосомы играют ключевую роль в подавлении таких смещений [15]. Однако в условиях, когда трансляция неэффективна или отсутствует (например, в некодирующих областях), в клетке существуют альтернативные механизмы подавления избыточных возвратных смещений РНК-полимераз, один из которых основан на действии Mfd [181].

Однако генетические и биохимические данные указывают на ограниченную роль Mfd в TCR: 1) клетки *E.coli* с инактивированным геном *mfd* проявляют лишь небольшую чувствительность к ультрафиолетовому излучению [145, 182-183]; 2) некоторые типы повреждений ДНК устраняются TCR без участия Mfd [183]; 3) TCR лишь частично зависит от Mfd на активно транскрибируемых генах [184]; 4) NusA задействован в TCR независимо от Mfd [185]; 5) Mfd очень медленно терминирует транскрипцию [148, 186]. Таким образом, вероятно, существуют дополнительные факторы, связывающие транскрипцию с репарацией ДНК.

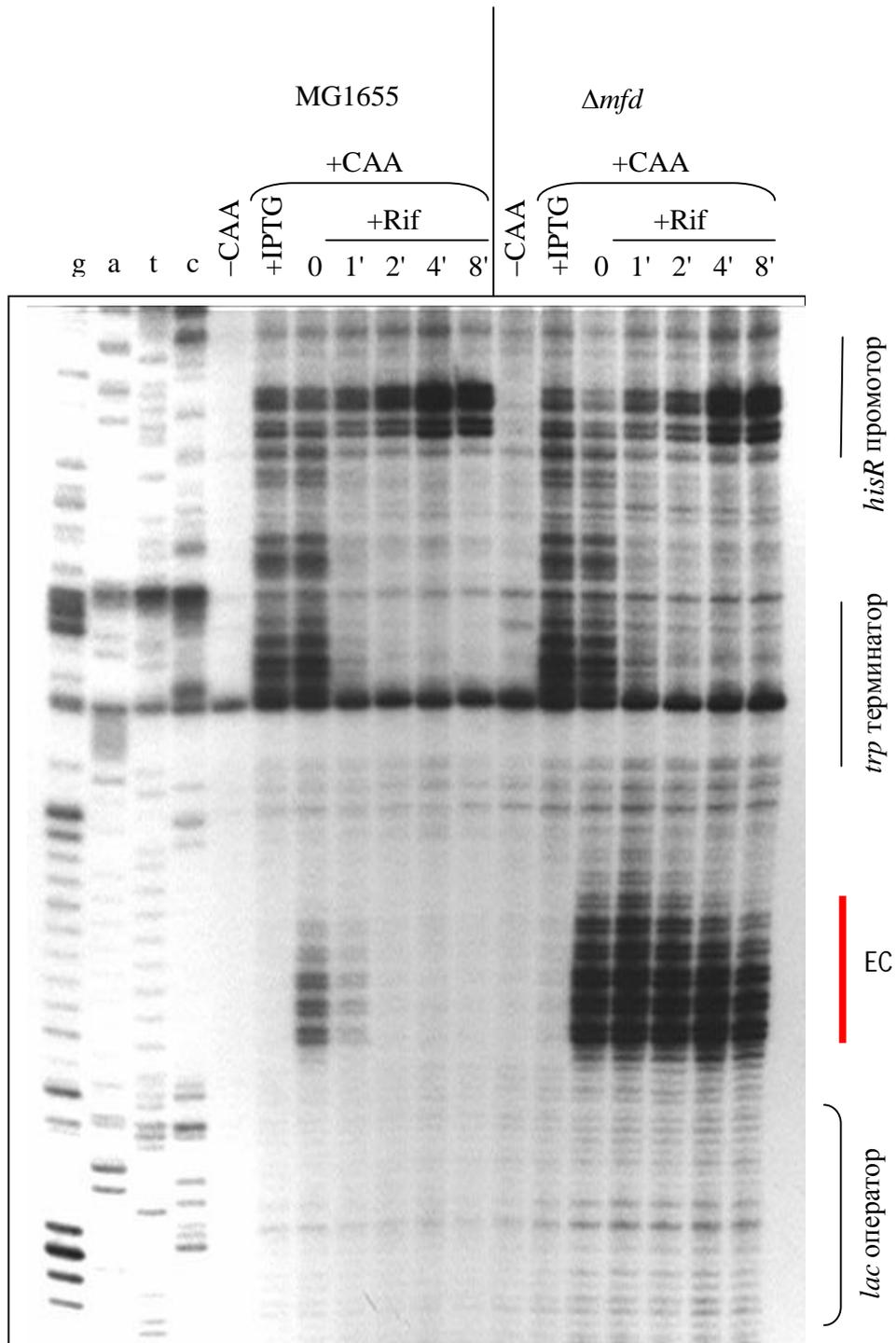


Рисунок 22. Мишенью для фактора Mfd *in vivo* служит остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы. Модификации нематричной цепи ДНК в штаммах MG1655 (wt) и MG1655 Δmfd хлорацетальдегидом (+CAA) проанализированы методом достройки праймера. Модификации проводились через указанные промежутки времени (в минутах) после добавления рифампицина (+Rif). Отмечено положение изолированного элонгационного комплекса (EC), терминатора и промотора.

3.2.2. Роль фактора UvrD в координации транскрипции и репарации ДНК

В лаборатории проф. Нудлера (Nudler, New York University) в результате протеомного анализа химически сшитых *in vivo* с РНК-полимеразой белковых комплексов было обнаружено, что белок эксцизионной репарации нуклеотидов UvrD напрямую взаимодействует с РНК-полимеразой *E.coli*. Эти данные также нашли подтверждение в опытах *in vitro* [16]. UvrD – ДНК-хеликаза суперсемейства 1 и 3'-5' транслоказа, обладающая оцДНК-зависимой АТФ-азной активностью [187-189]. В настоящей работе мы исследовали влияние фактора UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo* и его роль в сопряжении транскрипции с репарацией ДНК. Для этого мы получили экспрессионную конструкцию с геном *uvrD*, а также серию делеционных штаммов *E.coli* с инактивированными генами *uvrD*, *greA* и *greB* (табл. 2). В ходе работы мы провели анализ футпринтов *in situ* остановленных элонгационных комплексов РНК-полимераз в условиях отсутствия или повышенного уровня UvrD, а также определили чувствительность полученных штаммов *E.coli* к различным мутагенам.

Суперпродукция UvrD в клетках *E.coli*

Генно-инженерная конструкция для индуцированной суперэкспрессии *uvrD* была создана на базе вектора pZA31, содержащего регулируемый промотор P_{LtetO-1} [166]. Этот промотор сконструирован на базе промотора P_L фага λ, в котором сайты связывания репрессора cI заменены на нуклеотидные последовательности оператора 2 (*tetO2*) оперона *tet* устойчивости к тетрациклину транспозона Tn10. В результате промотор регулируется Tet репрессором, что позволяет в данной системе использовать в качестве индуктора ангидротетрациклин. В состав вектора входят также элементы, необходимые для экспрессии клонируемого гена: сайт связывания рибосомы (RBS) и два терминатора транскрипции (T1 из оперона *rrnB* и t₀ фага λ). Плазмида pZA31 содержит ориджин репликации p15a, что делает ее совместимой с плазмидами с ColE1 репликоном. Это позволяет использовать генноинженерную конструкцию на базе этого вектора в клетках вместе с плазмидой p1EC для футпринт-анализа остановленного элонгационного комплекса РНК-полимеразы (рис. 23).

Для обеспечения синтеза репрессора TetR его ген помещен под контроль конститутивного промотора P_{N25} в составе экспрессионной кассеты (Z1), несущей также ген устойчивости к спектиномицину и *lacI*. Кассета интегрирована в бактериальную хромосому по сайту интеграции фага λ и может быть перенесена трансдукцией в тестируемые штаммы *E.coli*.

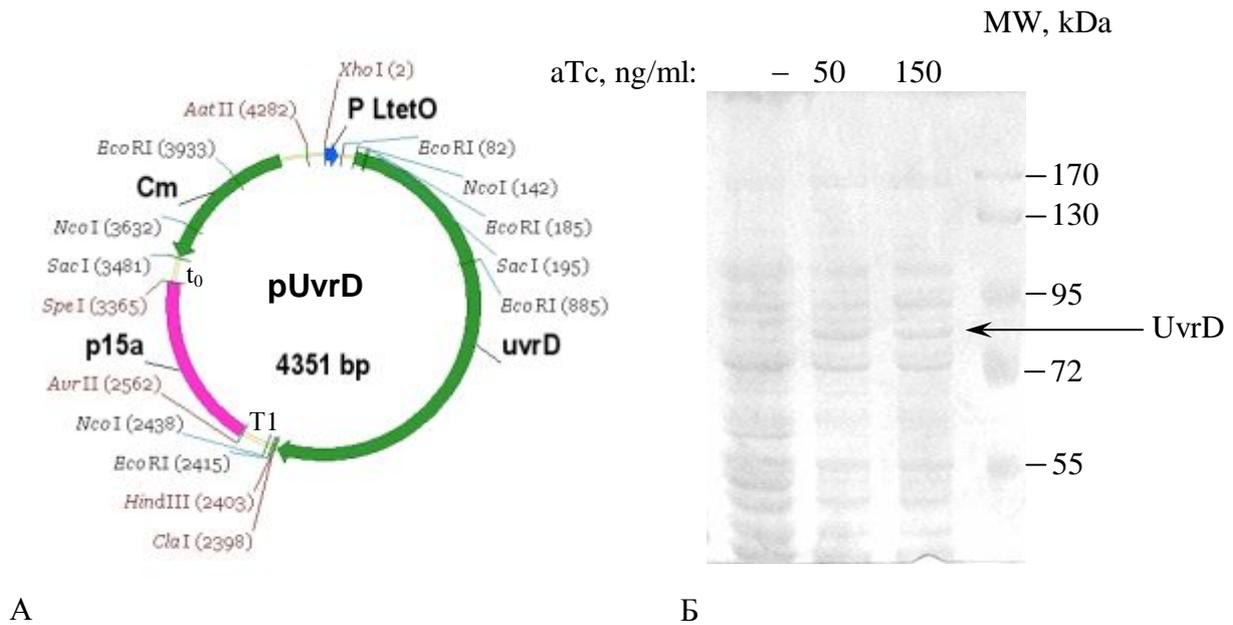


Рисунок 23. Суперпродукция UvrD в клетках *E.coli*. (А) Схема экспрессионной плазмиды pUvrD. (Б) Электрофоретическое разделение белков из клеток, несущих плазмиду pUvrD, для анализа индукции биосинтеза UvrD ангидротетрациклином.

Ген *uvrD* *E.coli* вырезали из плазмиды pETDuet-*uvrD* в составе *XhoI/XbaI*-фрагмента, а липкий конец, образованный эндонуклеазой *XbaI* достроили до тупого. Фрагмент с *uvrD* встроили в вектор pZA31, расщепленный *SalI* (образует одинаковые с *XhoI* липкие концы) и *KpnI*, предварительно удалив выступающий 3'-конец. Нуклеотидная последовательность *uvrD* была проверена секвенированием с праймера Z1. Полученная в итоге плазмида pUvrD позволяет контролировать суперэкспрессию *uvrD* (рис. 23).

Инактивация генов uvrD, greA и greB E.coli

Для инактивации генов *uvrD*, *greA* и *greB* *E.coli* применили описанный выше подход на основе Red-зависимой рекомбинации [176]. В данном случае интегрируемая кассета включала ген устойчивости к канамицину, фланкированный сайтами FRT (сайты, узнаваемые рекомбиназой FLP). Для амплификации кассеты в качестве матрицы использовали плазмиду pKD13 и олигонуклеотиды *uvrD*-L и *uvrD*-R (в случае инактивации гена *uvrD*) или *greA*-L и *greA*-R (для *greA*) или *greB*-L и *greB*-R (для *greB*). Для элиминации селективного маркера использовали вспомогательную плазмиду pCP20, кодирующую рекомбиназу FLP. Проверку

интеграции кассеты в хромосому и ее выщепление осуществляли с помощью ПЦР с праймерами *uvrD4* и *uvrD5* (для гена *uvrD*) или *greA1* и *greA2* (для *greA*) или *greB1* и *greB2* (для *greB*). Для объединения мутаций использовали трансдукцию фагом P1. Полученные в данной работе штаммы представлены в табл 2.

Влияние UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы in vivo

Для изучения влияния UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы *in vivo* мы использовали плазмиду p1EC. Штамм *E. coli* MG1655 Z1 Δ *uvrD*, содержащий p1EC, трансформировали плазмидой pUvrD или исходным вектором pZA31. Для индукции синтеза UvrD в клетках использовали ангидротетрациклин. Положение элонгационного комплекса на матрице ДНК *in vivo* установили с помощью САА. Область матрицы ДНК p1EC, где модификация оснований происходит только в отсутствие IPTG (т.е. когда Lac репрессор связан с матрицей p1EC и физически препятствует движению РНК-полимеразы), соответствует положению одиночного элонгационного комплекса, остановленного перед репрессором. Анализ полученных футпринтов (рис. 24) показал, что под влиянием UvrD *in vivo* происходит большее смещение РНК-полимеразы против хода транскрипции, чем в отсутствие фактора: у верхнего участка футпринта усиливается чувствительность гетероциклических оснований к САА, а у нижнего участка – снижается. Т.е. *in vivo* UvrD смещает остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы против хода транскрипции. Такой эффект UvrD на элонгационный комплекс может иметь большое значение для репарации повреждений в ДНК, когда РНК-полимераза останавливается на поврежденном сайте ДНК и ее необходимо сместить для доступа к повреждению репарационных белков (рис 25).

Мы протестировали чувствительность штамма с инактивированным геном *uvrD* к различным мутагенам: митомицину С, 4-нитрохинолин-1-оксиду, цисплатину и ультрафиолетовому излучению (УФ). Эти мутагены приводят к сшивкам и объемным модификациям ДНК, устраняемым белками эксцизионной репарации нуклеотидов. Клетки *uvrD(-)* оказались гораздо более чувствительны к повреждению ДНК указанными реагентами и УФ, чем клетки исходного штамма с неповрежденным геном *uvrD* (рис. 26). Кроме того, чувствительность *uvrD(-)* клеток к различным мутагенам гораздо выше, чем клеток с инактивированным геном *mfD*.

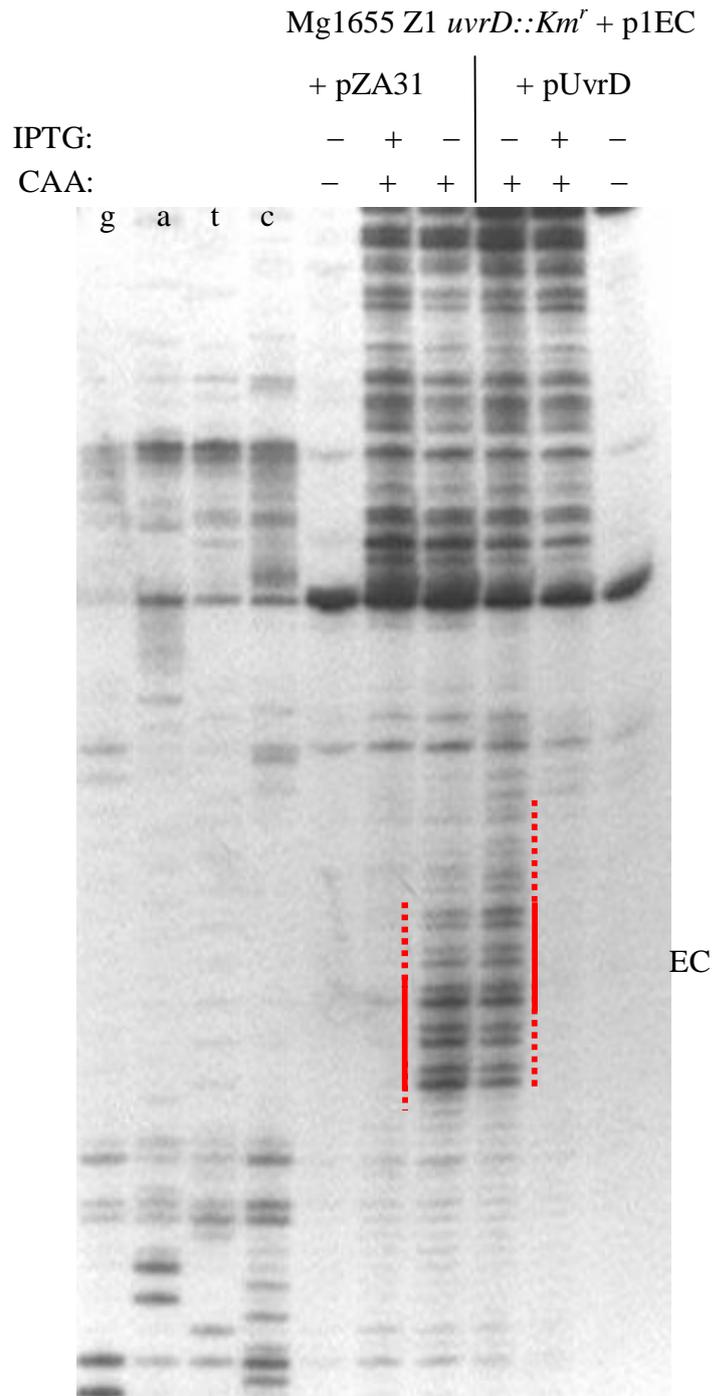


Рисунок 24. Возвратное смещение (backtracking) элонгационного комплекса (ЕС) РНК-полимеразы под действием UvrD *in vivo*. Представлен радиоавтограф футпринта *in situ* остановленного ЕС. Модификация одноцепочечного участка ДНК транскрипционного пузыря ЕС проведена хлорацетальдегидом (+CAA). В присутствии UvrD (pUvrD) ЕС смещается против хода транскрипции по сравнению с ЕС, не испытывающим действие UvrD (pZA31).

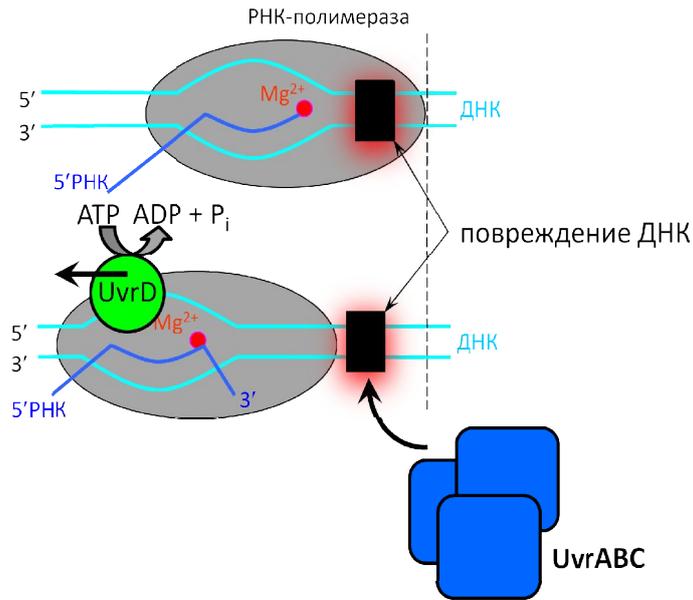
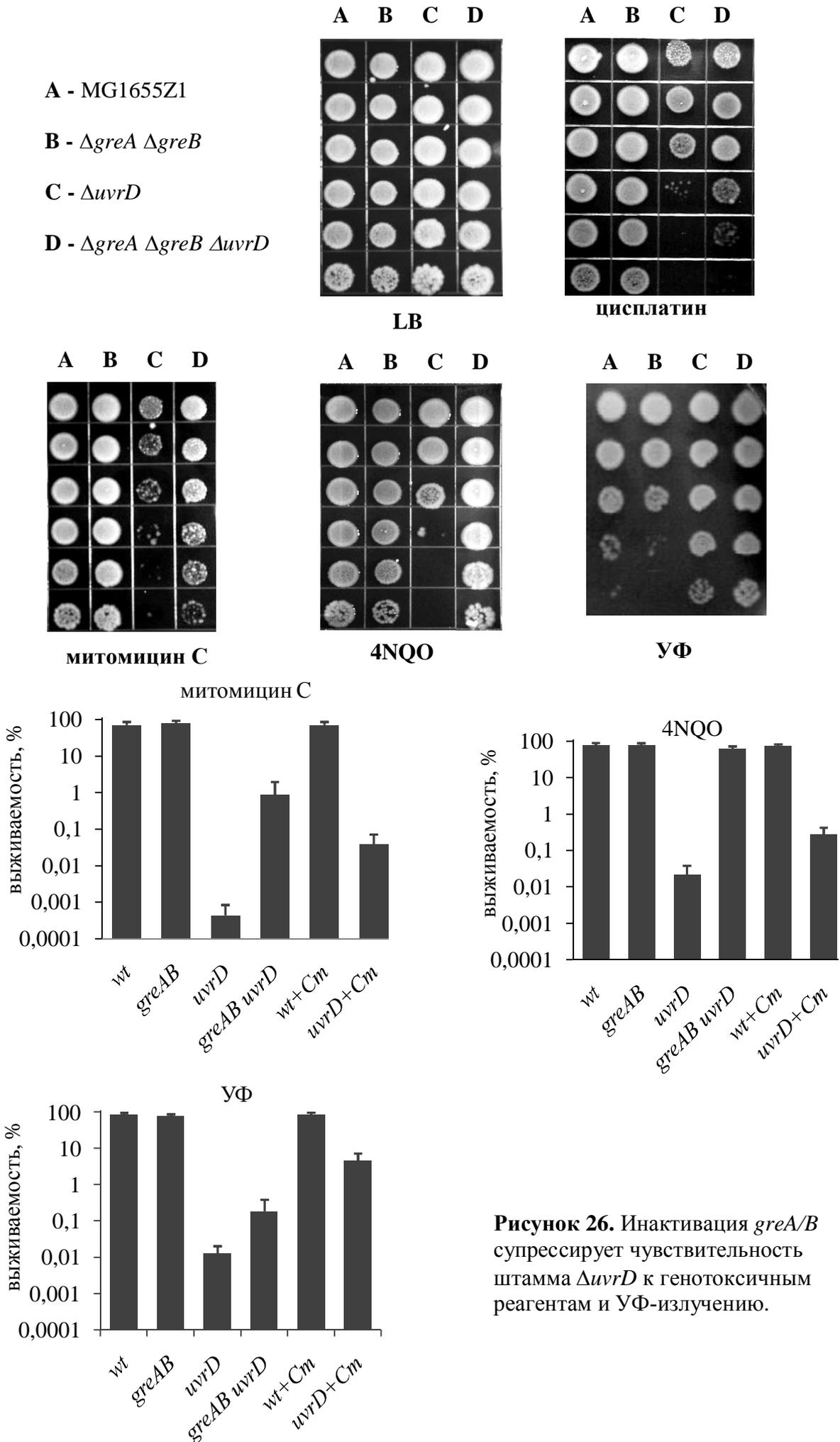


Рисунок 25. Смещение РНК-полимеразы позволяет экспонировать повреждение ДНК.

Если возвратное смещение РНК-полимеразы действительно необходимо для эффективной репарации транскрибируемой ДНК, то подавление факторов, в норме препятствующих возвратному смещению РНК-полимеразы, должно способствовать устранению повреждений в ДНК. Действительно, инактивация генов *greA/greB* супрессирует чувствительность делеционного мутанта *uvrD* ко всем протестированным нами генотоксичным реагентам и УФ (рис. 26).



Интересно, что UvrD противодействует GreA/B даже при нормальных условиях роста клеток, поскольку инактивация *uvrD* супрессирует термочувствительность двойного мутанта *greA greB* (рис. 27). Наша модель также объясняет, почему инактивация гена *dksA*, который кодирует фактор, конкурирующий с GreA/B за связывание со вторичным каналом РНК-полимеразы, увеличивает чувствительность клеток *E. coli* к митомицину С [152].

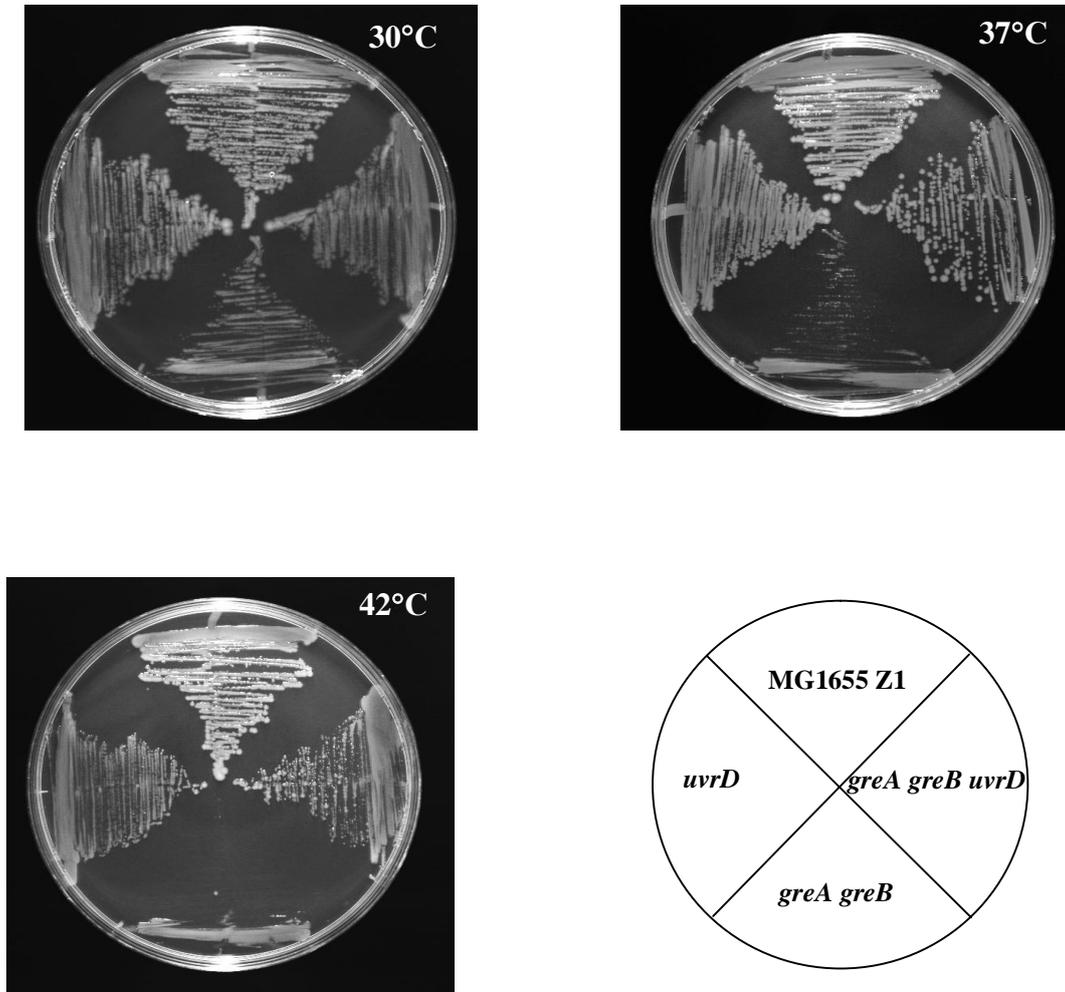


Рисунок 27. Инактивация *uvrD* супрессирует *ts*-фенотип штамма $\Delta greA/B$.

Транслирующие рибосомы подавляют спонтанные возвратные смещения РНК-полимеразы [15], а их ингибирование повышает устойчивость клеток к УФ-повреждениям [190-191]. Действительно, задержка рибосом сублетальной дозой хлорамфеникола делает клетки *uvrD*(-) более устойчивыми к митомицину С, 4-нитрохинолин-1-оксиду и УФ (рис. 26). Таким образом, для эксцизионной репарации нуклеотидов в течение генотоксичного стресса UvrD конкурирует с факторами, препятствующими откату РНК-полимеразы.

3.2.3. Участие транскрипционного фактора NusA в координации транскрипции с репарацией ДНК

Недавно на основе генетических данных было сделано предположение об участии транскрипционного фактора NusA в неохарактеризованном ранее пути эксцизионной репарации нуклеотидов, отличном от Mfd-зависимого пути [185]. Поскольку фактор NusA усиливает возвратные смещения РНК-полимеразы в элонгации транскрипции [61], NusA может играть роль в UvrD-зависимом механизме координации транскрипции с репарацией ДНК. Анализ на чувствительность к мутагенам штамма, полностью лишённого гена *nusA*, невозможен в обычном генетическом окружении из-за незаменимости этого гена для жизни *E.coli*. Однако делетирование *nusA* возможно в специально сконструированном штамме *E.coli* MDS42, из которого направлено удалены фрагменты ДНК, полученные *E.coli* горизонтальным переносом [86-87]. Действительно, штамм MDS42 $\Delta nusA$ чувствителен к УФ, митомицину С и 4-нитрохиолин-1-оксиду (рис. 28). Мы обнаружили, что инактивация гена *greB* в этом штамме приводит к супрессии чувствительности клеток *nusA(-)* к протестированным мутагенам (рис. 28). Таким образом, наши данные указывают на участие NusA в репарации ДНК и роль возвратного смещения РНК-полимеразы в этом механизме.

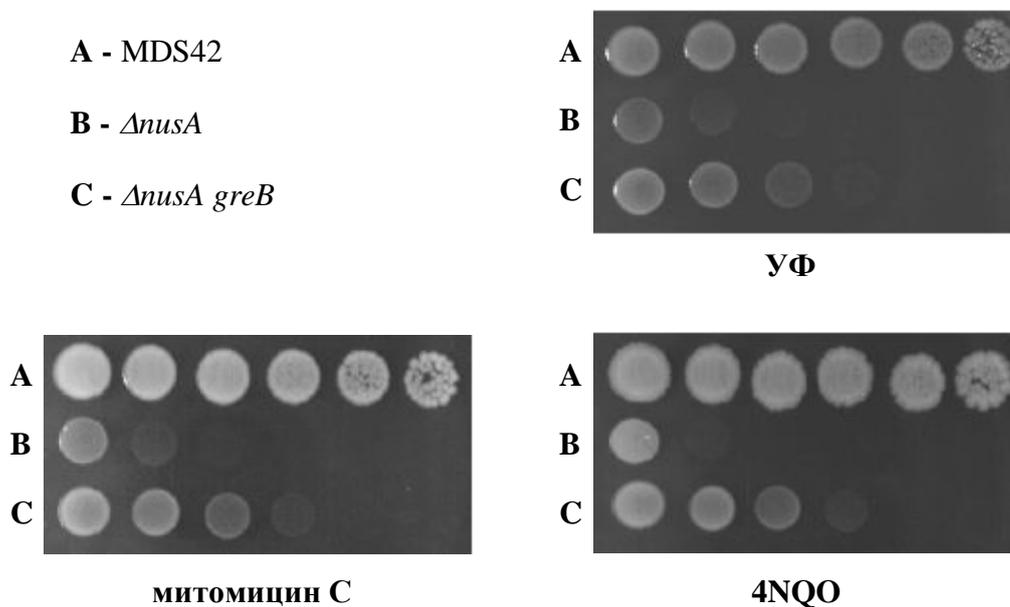


Рисунок 28. NusA участвует в репарации с использованием возвратного смещения РНК-полимеразы.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Модель координации транскрипции с трансляцией

Хотя и РНК-полимераза, и рибосома действуют по принципу броуновского хrapовика [61, 192-193], эти молекулярные машины имеют различие в своем рабочем цикле: транслокация рибосомы по РНК практически необратима, в то время как РНК-полимераза осциллирует, смещаясь вперед-назад по матрице ДНК с одновременным движением РНК относительно фермента [21, 48, 55, 61]. Равновесие между продуктивным (посттранслокационным) и непродуктивными (претранслокационным или сдвинутым назад) состояниями элонгационного комплекса определяет скорость элонгации транскрипции [61]. Транслирующая рибосома способна препятствовать спонтанному возвратному смещению РНК-полимеразы, повышая эффективность транскрипции (рис. 17 и 19). Функциональное взаимодействие рибосомы и РНК-полимеразы по своему эффекту на транскрипцию сходно с кооперативным эффектом между РНК-полимеразами [162-164, 194]. Однако взаимодействие между РНК-полимеразами, вероятно, проявляется на генах с высоким уровнем экспрессии (например, рибосомные, стресс-индуцибельные гены). Большинство же белок-кодирующих генов имеют относительно слабые промоторы, что усиливает роль эффекта рибосом на транскрипцию. Таким образом, немонотонность элонгации транскрипции играет важную роль в ее синхронизации с трансляцией. Рибосома контролирует РНК-полимеразу, позволяя подогнать синтез РНК к трансляционным потребностям клетки. Очевидно, кооперация при движении макромолекул – фундаментальный механизм регуляции генной экспрессии и адаптации бактерий к изменению внешних условий [15] (рис. 29). В отсутствие взаимодействия между макромолекулами можно ожидать продолжительные паузы в транскрипции. Действительно, на первых 50 нуклеотидах транскрибируемой области рядом с промотором часто находят остановленные элонгационные комплексы РНК-полимеразы [195]. Возможно, отчасти такие остановки РНК-полимераз связаны с тем, что рибосомы не могут связать РНК этих элонгационных комплексов и противодействовать паузам в транскрипции.

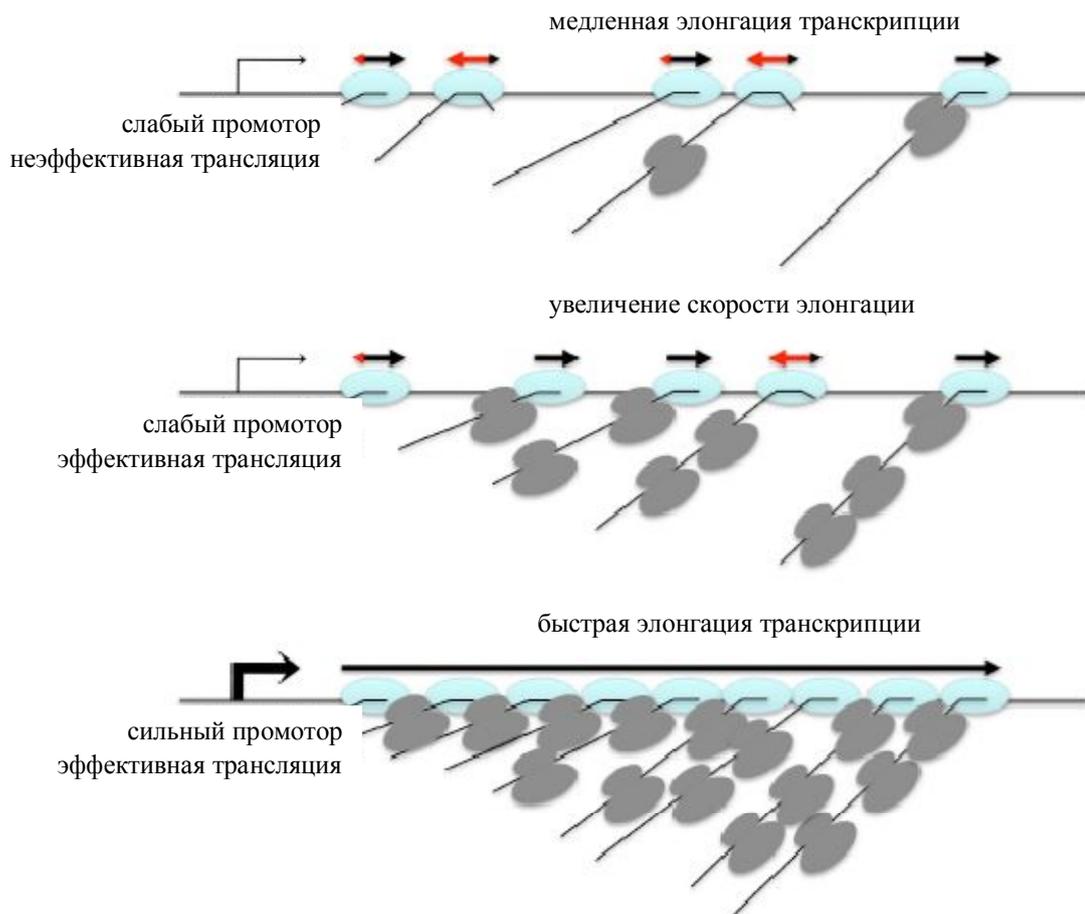


Рисунок 29. Кооперация макромолекул в регуляции генной экспрессии у бактерий [15, 162]. Предшествующая РНК-полимераза и рибосома “толкают” РНК-полимеразу вперед по ходу транскрипции, супрессируя возвратные смещения РНК-полимеразы. Координация между инициацией и элонгацией транскрипции и трансляцией обеспечивает точную подстройку уровня транскрипции к трансляционным потребностям клетки.

Интересно, что *in vivo* фактор терминации Rho локализуется вместе с РНК-полимеразой сразу после инициации транскрипции [196]. Действительно, *in vitro* было показано, что Rho может быть связан с элонгационным комплексом РНК-полимеразы на всем протяжении фазы элонгации транскрипции и не нуждается в РНК-транскрипте для начального взаимодействия с РНК-полимеразой [76]. Кроме того, связывание Rho с РНК-полимеразой достаточно сильное для того, чтобы исключить обмен молекул Rho и важно для терминации транскрипции [76]. Каким же образом транскрипция доходит до конца даже тех генов, чьи транскрипты слабо транслируются и потенциально содержат незащищенные рибосомами протяженные области-мишени Rho? Вероятно, паузы в транскрипции задерживают РНК-полимеразу, позволяя

лидирующей рибосоме догнать РНК-полимеразу и контролировать движение до конца транслируемой области, предотвращая Rho-зависимую терминацию транскрипции.

Структурные основы прямого контакта РНК-полимеразы и рибосомы предложены в работе, в которой установлено физическое взаимодействие С-концевого домена транскрипционного фактора NusG и рибосомного белка S10 малой субчастицы рибосомы [197]. Поскольку сайт связывания NusG белка S10 экспонирован на поверхности 30S субчастицы рибосомы, а N-концевой домен NusG связывается с РНК-полимеразой [198], NusG может служить линкером между рибосомой и РНК-полимеразой [197]. NusG также взаимодействует с фактором терминации транскрипции Rho и необходим для его функции *in vivo* [86, 199]. Поскольку Rho конкурирует с S10 за связывание с С-концевым доменом NusG, активация Rho возможна только в отсутствие рибосом [197].

Альтернативой NusG в механизме сопряжения транскрипции и трансляции в ряде оперонов *E.coli*, кодирующих внеклеточные факторы вирулентности, служит его паралог RfaH [198]. Взаимодействие RfaH со специфической нуклеотидной последовательностью ДНК, *ops* (*operon polarity suppressor*), приводит к переходу между двумя альтернативными конформациями белка, в результате чего N-концевой домен связывается с РНК-полимеразой, а С-концевой домен претерпевает беспрецедентный по своим масштабам рефолдинг и связывает белок S10 рибосомы [200]. Таким образом, RfaH может облегчать привлечение рибосомы к синтезируемой мРНК, как только мРНК появляется из РНК-полимеразы, связанной с фактором. Поскольку фактор RfaH остается в комплексе с РНК-полимеразой до конца оперона, он также, вероятно, способствует сопряжению транскрипции и трансляции на регулируемых им генах [200].

Для изучения взаимодействия РНК-полимеразы и рибосомы *E. coli* недавно была предложена система сопряженной транскрипции и трансляции *in vitro* из очищенных компонентов [201]. В отличие от разработанных ранее систем бесклеточной трансляции, которые нацелены главным образом на продукцию белков *in vitro* [202-204], новый подход позволяет пошагово контролировать движение РНК-полимеразы и рибосомы. В результате показано, что рибосома, транслирующая мРНК непосредственно за РНК-полимеразой, меняет продолжительность пауз в транскрипции *in vitro* [201]. Принимая во внимание отсутствие стабильной вторичной структуры использованной РНК, этот эффект может являться следствием прямого взаимодействия между молекулярными машинами, что согласуется с предложенной ранее нашей гипотезой [15].

Недавние исследования показали, что обнаруженный нами эффект подавления рибосомой спонтанных возвратных смещений РНК-полимеразы *in vivo* связывает трансляцию с геномной нестабильностью у бактерий [181]. Частые столкновения РНК-полимеразы и репликативной вилки в попутном направлении неизбежны, поскольку скорость репликации на порядок выше скорости транскрипции [205]. Выяснилось, что такие столкновения реплисома со сдвинутым назад элонгационным комплексом РНК-полимеразы приводят к двухцепочечным разрывам ДНК, при ошибочной репарации которых возникают мутации [181]. Транслирующие рибосомы играют важную роль в поддержании целостности белок-кодирующих генов, предотвращая откат РНК-полимеразы. Поскольку рибосомы – основной сенсор клеточного метаболизма и стресса, сопряжение транскрипции и трансляции обеспечивает связь между условиями роста бактерий, мутагенезом и клеточной адаптацией к изменению окружающей среды.

4.2. Модель координации транскрипции с репарацией ДНК

Клеточные РНК-полимеразы очень чувствительны к отклонениям в структуре матричной цепи ДНК, и в случае повреждения ДНК транскрипция на этом месте временно или постоянно блокируется [10-11]. Таким образом, РНК-полимераза может служить сенсором, осуществляющим контроль качества ДНК во время транскрипции. Совместно с лабораторией Нудлера нами предложена модель координации транскрипции и репарации, ключевым компонентом которой является UvrD (рис. 30) [16]. Мы обнаружили, что *in vivo* UvrD сдвигает остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы против хода транскрипции (рис. 24). Эта активность необходима для эксцизионной репарации нуклеотидов *in vitro* и *in vivo* [16]. Выполненные нами в ходе этой работы генетические эксперименты с инактивацией факторов, препятствующих откату РНК-полимеразы, также подтверждают новую роль UvrD в механизме сопряжения транскрипции с репарацией ДНК.

Двойная спираль ДНК с одноцепочечным участком является предпочтительным сайтом связывания UvrD, проявляющего активность хеликазы/транслоказы [206-207]. Подобная структура с экспонированным одноцепочечным участком нематричной цепи ДНК присутствует в транскрипционном пузырьке и, следовательно, служит потенциальной мишенью для UvrD. Действительно, наши коллеги экспериментально установили, что в составе элонгационного комплекса РНК-полимеразы UvrD локализуется у верхней границы транскрипционного пузырька в районе домена “заслонка” β-субъединицы РНК-полимеразы [16]. Примечательно, что UvrD и NusA связываются в непосредственной близости друг от друга на поверхности РНК-полимеразы, что может объяснить участие NusA в эксцизионной репарации нуклеотидов [185]. Действительно, NusA кооперирует с UvrD *in vitro* [16] и роль NusA в репарации связана с

возвратным смещением элонгационного комплекса (рис. 28). Кроме того, UvrD и NusA взаимодействуют с UvrB и UvrA, соответственно [185, 208-210]. Возможно, UvrD и NusA помимо синергетического эффекта по смещению РНК-полимеразы, в результате которого экспонируется поврежденный участок ДНК, также способствуют привлечению UvrAB к этому месту.

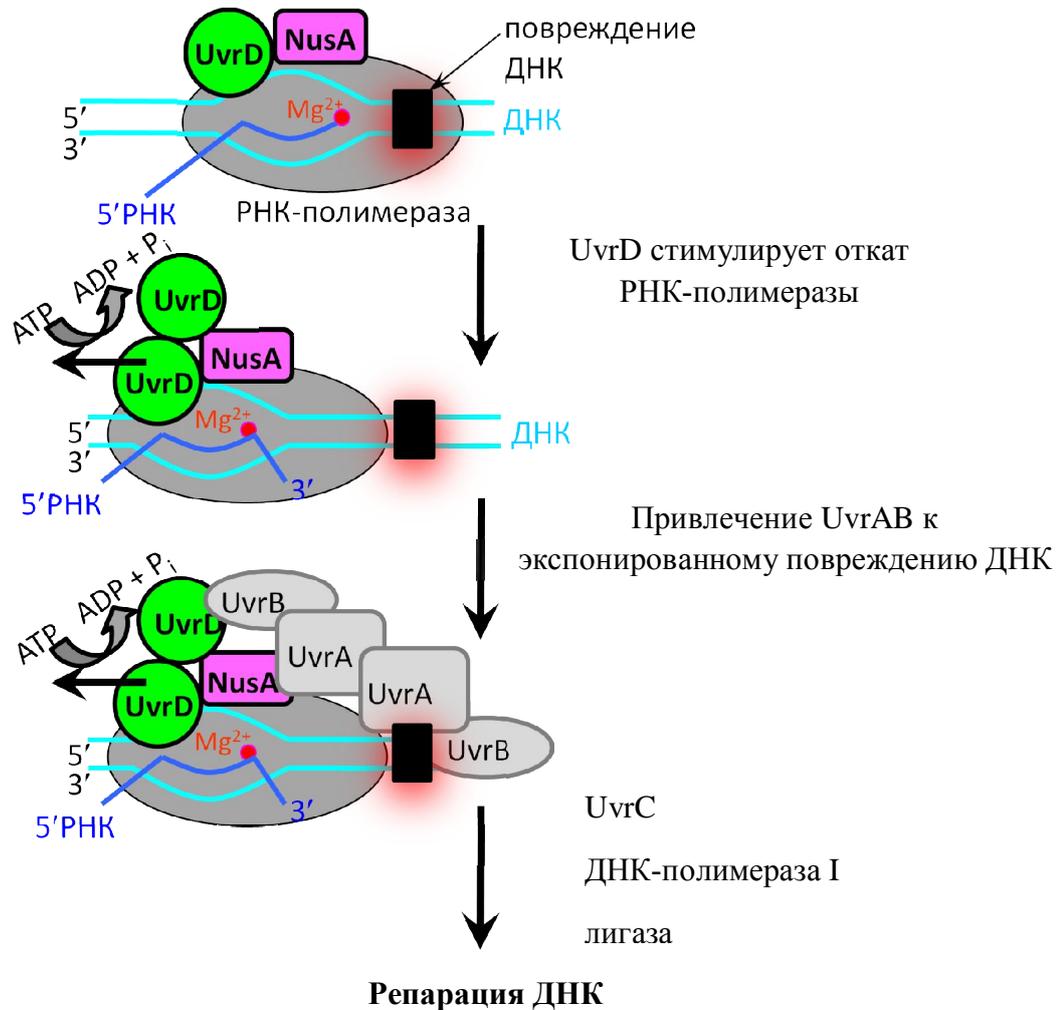


Рисунок 30. Модель координации транскрипции и репарации.

В условиях отсутствия клеточного стресса UvrD содержится в эквимольном количестве по отношению к РНК-полимеразе (около 3×10^3 молекул на клетку) [211]. Однако при SOS-ответе внутриклеточный уровень UvrD увеличивается примерно втрое [187], что может способствовать димеризации фактора. Вероятно, именно димер UvrD является активной хеликазой/транслоказой [206] и его образование необходимо для UvrD-зависимого отката РНК-полимеразы [16]. Такие возвратные смещения РНК-полимераз в ходе элонгации транскрипции

может нарушать целостность генома в клетках, восстанавливающихся от генотоксичного стресса и возобновляющих репликацию, т.к. частые столкновения в попутном направлении между реплисомой и тупиковыми элонгационными комплексами приводят к двуцепочечным разрывам ДНК [181]. Сдвигая тупиковые комплексы РНК-полимеразы вперед, Mfd подавляет появление двуцепочечных разрывов ДНК, вызванных подобными столкновениями, и, следовательно, снижает высокую частоту мутаций, связанных с репарацией этих разрывов. Данная модель согласуется с фенотипом *mfd(-)* (“mutation frequency decline”) *E.coli*, высокой УФ-мутабельностью, небольшой чувствительностью к УФ и сниженной способностью к восстановлению транскрипции после УФ-облучения [182-183]. Вероятно, основную роль Mfd может играть в восстановлении клетки после избыточных возвратных смещений РНК-полимераз, связанных с SOS-ответом.

5. ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что лидирующая рибосома препятствует спонтанному возвратному смещению РНК-полимеразы в ходе транскрипции *in vivo* и способствует повышению эффективности преодоления белковых препятствий на матрице ДНК.
2. Предложена модель контроля транскрипции транслирующими рибосомами.
3. Получены экспериментальные данные *in vivo*, показывающие, что остановленный элонгационный комплекс РНК-полимеразы служит мишенью для фактора Mfd.
4. Установлено, что фактор UvrD смещает элонгационный комплекс РНК-полимеразы против хода транскрипции *in vivo*.
5. На основании экспериментальных данных построена модель координации транскрипции с репарацией ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NTP – нуклеозидтрифосфат

п.о. – пара оснований

нт. – нуклеотид

BH – α -спиральный мостик (bridge helix)

TL – триггерная петля (trigger loop)

FL – F-петля (F-loop)

ppGpp – гуанозин -3'-дифосфат 5'-дифосфат (гуанозинтетрафосфат)

а.о. – аминокислотный остаток

ПААГ – полиакриламидный гель

TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

ПЦР – полимеразная цепная реакция

EDTA – этилендиаминтетраацетат

DTT – дитиотреит

PEG – полиэтиленгликоль

SDS – додецилсульфат натрия

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан

4-NQO – 4-нитрохиолин-1-оксид

ONPG – орто-нитрофенил- β -D-галактозид

IPTG – изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид

α MG – α -метил-глюкозид

CAA – хролацетальдегид

Cm – хлорамфеникол

Sm – стрептомицин

Sp – спектиномицин

Tc – тетрациклин

aTc – ангидротетрациклин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vassylyev, D. G. Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks // *Curr Opin Struct Biol.* - 2009. - V. 19. - P. 691-700.
2. Nudler, E. RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription // *Annu Rev Biochem.* - 2009. - V. 78. - P. 335-361.
3. Roberts, J. W., Shankar, S., Filter, J. J. RNA polymerase elongation factors // *Annu Rev Microbiol.* - 2008. - V. 62. - P. 211-233.
4. Прошкин, С.А., Миронов, А.С. Регуляция элонгации транскрипции у бактерий // *Молекулярная биология.* - 2011. - Т. 45. - С. 395-415.
5. Nudler, E. RNA polymerase backtracking in gene regulation and genome instability // *Cell.* - 2012. - V. 149. - P. 1438-1445.
6. Adhya, S., Gottesman, M. Control of transcription termination // *Annu Rev Biochem.* - 1978. - V. 47. - P. 967-996.
7. Richardson, J. P. Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor // *Cell.* - 1991. - V. 64. - P. 1047-1049.
8. Yanofsky, C. Attenuation in the control of expression of bacterial operons // *Nature.* - 1981. - V. 289. - P. 751-758.
9. Vogel, U., Jensen, K. F. The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate // *J Bacteriol.* - 1994. - V. 176. - P. 2807-2813.
10. Selby, C. P., Sancar, A. Transcription preferentially inhibits nucleotide excision repair of the template DNA strand *in vitro* // *J Biol Chem.* - 1990. - V. 265. - P. 21330-21336.
11. Tornaletti, S. Transcription arrest at DNA damage sites // *Mutat Res.* - 2005. - V. 577. - P. 131-145.
12. Mellon, I., Hanawalt, P. C. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand // *Nature.* - 1989. - V. 342. - P. 95-98.
13. Ganesan, A., Spivak, G., Hanawalt, P.C. Transcription-coupled DNA repair in prokaryotes // *Prog Mol Biol Transl Sci.* - 2012. - V. 110. - P. 25-40.
14. Gaillard, H., Aguilera, A. Transcription coupled repair at the interface between transcription elongation and mRNP biogenesis // *Biochim Biophys Acta.* - 2013. - V. 1829. - P. 141-150.
15. Proshkin, S., Rahmouni, A.R., Mironov, A., Nudler, E. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation // *Science.* - 2010. - V. 328. - P. 504-508.

16. Epshtein, V., Kamarthapu, V., McGary, K., Svetlov, V., Ueberheide, B., Proshkin, S., Mironov, A., Nudler, E. UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards // *Nature*. - 2014. - V. 505. - P. 372-377.
17. Zaychikov, E., Martin, E., Denissova, L., Kozlov, M., Markovtsov, V., Kashlev, M., Heumann, H., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Mustaev, A. Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center // *Science*. - 1996. - V. 273. - P. 107-109.
18. Markovtsov, V., Mustaev, A., Goldfarb, A. Protein-RNA interactions in the active center of transcription elongation complex // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1996. - V. 93. - P. 3221-3226.
19. Mustaev, A., Kozlov, M., Markovtsov, V., Zaychikov, E., Denissova, L., Goldfarb, A. Modular organization of the catalytic center of RNA polymerase // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1997. - V. 94. - P. 6641-6645.
20. Nudler, E., Avetisova, E., Markovtsov, V., Goldfarb, A. Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex // *Science*. - 1996. - V. 273. - P. 211-217.
21. Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., Goldfarb, A. The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase // *Cell*. - 1997. - V. 89. - P. 33-41.
22. Nudler, E., Gusarov, I., Avetisova, E., Kozlov, M., Goldfarb, A. Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli* // *Science*. - 1998. - V. 281. - P. 424-428.
23. Sidorenkov, I., Komissarova, N., Kashlev, M. Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription // *Mol Cell*. - 1998. - V. 2. - P. 55-64.
24. Kireeva, M. L., Komissarova, N., Waugh, D. S., Kashlev, M. The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex // *J Biol Chem*. - 2000. - V. 275. - P. 6530-6536.
25. Nudler, E. Transcription elongation: structural basis and mechanisms // *J Mol Biol*. - 1999. - V. 288. - P. 1-12.
26. Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S. A. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution // *Cell*. - 1999. - V. 98. - P. 811-824.
27. Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Darst, S. A. A structural model of transcription elongation // *Science*. - 2000. - V. 289. - P. 619-625.
28. Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., Kornberg, R. D. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism // *Science*. - 2000. - V. 288. - P. 640-649.

29. Cramer, P., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution // *Science*. - 2001. - V. 292. - P. 1863-1876.
30. Vassylyev, D.G., Vassylyeva, M.N., Perederina, A., Tahirov, T.H., Artsimovitch, I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase // *Nature*. - 2007. - V. 448. - P. 157-162.
31. Vassylyev, D.G., Vassylyeva, M.N., Zhang, J., Palangat, M., Artsimovitch, I., Landick, R. Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase // *Nature*. - 2007. - V. 448. - P. 163-168.
32. Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., Kornberg, R.D. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution // *Science*. - 2001. - V. 292. - P. 1876-1882.
33. Kettenberger, H., Armache, K. J., Cramer, P. Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS // *Mol Cell*. - 2004. - V. 16. - P. 955-965.
34. Westover, K. D., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center // *Cell*. - 2004. - V. 119. - P. 481-489.
35. Kashkina, E., Anikin, M., Brueckner, F., Lehmann, E., Kochetkov, S. N., McAllister, W. T., Cramer, P., Temiakov, D. Multisubunit RNA polymerases melt only a single DNA base pair downstream of the active site // *J Biol Chem*. - 2007. - V. 282. - P. 21578-21582.
36. Touloukhonov, I., Landick, R. The role of the lid element in transcription by *E. coli* RNA polymerase // *J Mol Biol*. - 2006. - V. 361. - P. 644-658.
37. Kent, T., Kashkina, E., Anikin, M., Temiakov, D. Maintenance of RNA-DNA hybrid length in bacterial RNA polymerases // *J Biol Chem*. - 2009. - V. 284. - P. 13497-13504.
38. Westover, K. D., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II // *Science*. - 2004. - V. 303. - P. 1014-1016.
39. Naryshkina, T., Kuznedelov, K., Severinov, K. The role of the largest RNA polymerase subunit lid element in preventing the formation of extended RNA-DNA hybrid // *J Mol Biol*. - 2006. - V. 361. - P. 634-643.
40. Kuznedelov, K., Korzheva, N., Mustaev, A., Severinov, K. Structure-based analysis of RNA polymerase function: the largest subunit's rudder contributes critically to elongation complex stability and is not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length // *EMBO J*. - 2002. - V. 21. - P. 1369-1378.
41. King, R. A., Markov, D., Sen, R., Severinov, K., Weisberg, R.A. A conserved zinc binding domain in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase modulates intrinsic

- transcription termination and antitermination but does not stabilize the elongation complex // J Mol Biol. - 2004. - V. 342. - P. 1143-1154.
42. Epshtein, V., Cardinale, C. J., Ruckenstein, A. E., Borukhov, S., Nudler, E. An allosteric path to transcription termination // Mol Cell. - 2007. - V. 28. - P. 991-1001.
 43. Touloukhonov, I., Landick, R. The flap domain is required for pause RNA hairpin inhibition of catalysis by RNA polymerase and can modulate intrinsic termination // Mol Cell. - 2003. - V. 12. - P. 1125-1136.
 44. Darst, S. A., Opalka, N., Chacon, P., Polyakov, A., Richter, C., Zhang, G., Wriggers, W. Conformational flexibility of bacterial RNA polymerase // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2002. - V. 99. - P. 4296-4301.
 45. Lane, W. J., Darst, S. A. Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis // J Mol Biol. - 2010. - V. 395. - P. 686-704.
 46. Opalka, N., Brown, J., Lane, W. J., Twist, K. A., Landick, R., Asturias, F. J., Darst, S. A. Complete structural model of *Escherichia coli* RNA polymerase from a hybrid approach // PLoS Biol. - 2010. - V. 8. - e1000483.
 47. Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., Goldfarb, A. Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase // EMBO J. - 2003. - V. 22. - P. 2234-2244.
 48. Komissarova, N., Kashlev, M. RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA // J Biol Chem. - 1997. - V. 272. - P. 15329-15338.
 49. Komissarova, N., Kashlev, M. Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1997. - V. 94. - P. 1755-1760.
 50. Borukhov, S., Sagitov, V., Goldfarb, A. Transcript cleavage factors from *E. coli* // Cell. - 1993. - V. 72. - P. 459-466.
 51. Vassylyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M.N., Borukhov, S., Yokoyama, S. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution // Nature. - 2002. - V. 417. - P. 712-719.
 52. Laptenko, O., Lee, J., Lomakin, I., Borukhov, S. Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase // EMBO J. - 2003. - V. 22. - P. 6322-6334.

53. Opalka, N., Chlenov, M., Chacon, P., Rice, W. J., Wriggers, W., Darst, S. A. Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase // *Cell*. - 2003. - V. 114. - P. 335-345.
54. Sosunova, E., Sosunov, V., Kozlov, M., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Mustaev, A. Donation of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor Gre // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2003. - V. 100. - P. 15469-15474.
55. Toulme, F., Guerin, M., Robichon, N., Leng, M., Rahmouni, A. R. *In vivo* evidence for back and forth oscillations of the transcription elongation complex // *EMBO J*. - 1999. - V. 18. - P. 5052-5060.
56. Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis // *Cell*. - 2006. - V. 127. - P. 941-954.
57. Kulbachinskiy, A., Bass, I., Bogdanova, E., Goldfarb, A., Nikiforov, V. Cold sensitivity of thermophilic and mesophilic RNA polymerases // *J Bacteriol*. - 2004. - V. 186. - P. 7818-7820.
58. Miropolskaya, N., Artsimovitch, I., Klimasauskas, S., Nikiforov, V., Kulbachinskiy, A. Allosteric control of catalysis by the F loop of RNA polymerase // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2009. - V. 106. - P. 18942-18947.
59. Miropolskaya, N., Esyunina, D., Klimasauskas, S., Nikiforov, V., Artsimovitch, I., Kulbachinskiy, A. Interplay between the trigger loop and the F loop during RNA polymerase catalysis // *Nucleic Acids Res*. - 2014. - V. 42. - P. 544-552.
60. Epshtein, V., Mustaev, A., Markovtsov, V., Bereshchenko, O., Nikiforov, V., Goldfarb, A. Swing-gate model of nucleotide entry into the RNA polymerase active center // *Mol Cell*. - 2002. - V. 10. - P. 623-634.
61. Bar-Nahum, G., Epshtein, V., Ruckenstein, A. E., Rafikov, R., Mustaev, A., Nudler, E. A ratchet mechanism of transcription elongation and its control // *Cell*. - 2005. - V. 120. - P. 183-193.
62. Tuske, S., Sarafianos, S. G., Wang, X., Hudson, B., Sineva, E., Mukhopadhyay, J., Birktoft, J. J., Leroy, O., Ismail, S., Clark, A. D., Jr., Dharia, C., Napoli, A., Laptenko, O., Lee, J., Borukhov, S., Ebright, R. H., Arnold, E. Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation // *Cell*. - 2005. - V. 122. - P. 541-552.
63. Touloukhonov, I., Zhang, J., Palangat, M., Landick, R. A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing // *Mol Cell*. - 2007. - V. 27. - P. 406-419.

64. Brueckner, F., Cramer, P. Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation // *Nat Struct Mol Biol.* - 2008. - V. 15. - P. 811-818.
65. Campbell, E. A., Pavlova, O., Zenkin, N., Leon, F., Irschik, H., Jansen, R., Severinov, K., Darst, S. A. Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase // *EMBO J.* - 2005. - V. 24. - P. 674-682.
66. Brueckner, F., Ortiz, J., Cramer, P. A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle // *Curr Opin Struct Biol.* - 2009. - V. 19. - P. 294-299.
67. Artsimovitch, I., Landick, R. Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2000. - V. 97. - P. 7090-7095.
68. Chan, C. L., Landick, R. Dissection of the his leader pause site by base substitution reveals a multipartite signal that includes a pause RNA hairpin // *J Mol Biol.* - 1993. - V. 233. - P. 25-42.
69. Henkin, T. M., Yanofsky, C. Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions // *Bioessays.* - 2002. - V. 24. - P. 700-707.
70. Touloukhonov, I., Artsimovitch, I., Landick, R. Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins // *Science.* - 2001. - V. 292. - P. 730-733.
71. Weixlbaumer, A., Leon, K., Landick, R., Darst, S. A. Structural basis of transcriptional pausing in bacteria // *Cell.* - 2013. - V. 152. - P. 431-441.
72. Gusarov, I., Nudler, E. The mechanism of intrinsic transcription termination // *Mol Cell.* - 1999. - V. 3. - P. 495-504.
73. Depken, M., Galburt, E. A., Grill, S. W. The origin of short transcriptional pauses // *Biophys J.* - 2009. - V. 96. - P. 2189-2193.
74. Tadigotla, V. R., D, O. M., Sengupta, A. M., Epshtein, V., Ebright, R. H., Nudler, E., Ruckenstein, A. E. Thermodynamic and kinetic modeling of transcriptional pausing // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2006. - V. 103. - P. 4439-4444.
75. Cheung, A. C., Cramer, P. Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation // *Nature.* - 2011. - V. 471. - P. 249-253.
76. Epshtein, V., Dutta, D., Wade, J., Nudler, E. An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination // *Nature.* - 2010. - V. 463. - P. 245-249.
77. Komissarova, N., Becker, J., Solter, S., Kireeva, M., Kashlev, M. Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination // *Mol Cell.* - 2002. - V. 10. - P. 1151-1162.

78. Yarnell, W. S., Roberts, J. W. Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination // *Science*. - 1999. - V. 284. - P. 611-615.
79. Santangelo, T. J., Roberts, J. W. Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator // *Mol Cell*. - 2004. - V. 14. - P. 117-126.
80. Peters, J. M., Vangeloff, A. D., Landick, R. Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles // *Journal of Molecular Biology*. - 2011. - V. 412. - P. 793-813.
81. Roberts, J. W. Termination factor for RNA synthesis // *Nature*. - 1969. - V. 224. - P. 1168-1174.
82. Skordalakes, E., Berger, J. M. Structural insights into RNA-dependent ring closure and ATPase activation by the Rho termination factor // *Cell*. - 2006. - V. 127. - P. 553-564.
83. Richardson, J. P. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination // *Biochim Biophys Acta*. - 2002. - V. 1577. - P. 251-260.
84. Schwartz, A., Margeat, E., Rahmouni, A. R., Boudvillain, M. Transcription termination factor Rho can displace streptavidin from biotinylated RNA // *J Biol Chem*. - 2007. - V. 282. - P. 31469-31476.
85. Park, J. S., Roberts, J. W. Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2006. - V. 103. - P. 4870-4875.
86. Cardinale, C. J., Washburn, R. S., Tadigotla, V. R., Brown, L. M., Gottesman, M. E., Nudler, E. Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli* // *Science*. - 2008. - V. 320. - P. 935-938.
87. Posfai, G., Plunkett, G., 3rd, Feher, T., Frisch, D., Keil, G. M., Umenhoffer, K., Kolisnychenko, V., Stahl, B., Sharma, S. S., de Arruda, M., Burland, V., Harcum, S. W., Blattner, F. R. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli* // *Science*. - 2006. - V. 312. - P. 1044-1046.
88. Peters, J. M., Mooney, R. A., Grass, J. A., Jessen, E. D., Tran, F., Landick, R. Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli* // *Genes Dev*. - 2012. - V. 26. - P. 2621-2633.
89. Ingham, C. J., Dennis, J., Furneaux, P. A. Autogenous regulation of transcription termination factor Rho and the requirement for Nus factors in *Bacillus subtilis* // *Mol Microbiol*. - 1999. - V. 31. - P. 651-663.
90. Merino, E., Yanofsky, C. Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria // *Trends Genet*. - 2005. - V. 21. - P. 260-264.
91. Landick, R., Turnbough, C. L. J., Yanofsky, C. Transcription attenuation // in: Neidhardt, F. C. (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. - Washington: ASM Press, 1996. - pp. 1263-1286.

92. Babitzke, P., Stults, J. T., Shire, S. J., Yanofsky, C. TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*, is a multisubunit complex that appears to recognize G/UAG repeats in the trpEDCFBA and trpG transcripts // *Journal of Biological Chemistry*. - 1994. - V. 269. - P. 16597-16604.
93. Amster-Choder, O., Wright, A. Modulation of the dimerization of a transcriptional antiterminator protein by phosphorylation // *Science*. - 1992. - V. 257. - P. 1395-1398.
94. Grundy, F. J., Henkin, T. M. tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis* // *Cell*. - 1993. - V. 74. - P. 475-482.
95. Grundy, F. J., Henkin, T. M. Regulation of gene expression by effectors that bind to RNA // *Current Opinion in Microbiology*. - 2004. - V. 7. - P. 126-131.
96. Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A., Nudler, E. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria // *Cell*. - 2002. - V. 111. - P. 747-756.
97. Winkler, W., Nahvi, A., Breaker, R. R. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression // *Nature*. - 2002. - V. 419. - P. 952-956.
98. Nudler, E., Mironov, A. S. The riboswitch control of bacterial metabolism // *Trends Biochem Sci*. - 2004. - V. 29. - P. 11-17.
99. Mandal, M., Breaker, R. R. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator // *Nature Structural & Molecular Biology*. - 2004. - V. 11. - P. 29-35.
100. Лобанов, К.В., Королькова, Н.В., Еремина, С.Ю., Эррайс Лопес, Л., Прошкин, С.А., Миронов, А.С. Мутации, приводящие к изменению специфичности сенсорной РНК, кодируемой геном *pbuE Bacillus subtilis* // *Генетика*. - 2007. - Т. 43. - С. 1-5.
101. Hollands, K., Proshkin, S., Sklyarova, S., Epshtein, V., Mironov, A., Nudler, E., Groisman, E. A. Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2012. - V. 109. - P. 5376-5381.
102. Roth, A., Breaker, R. R. The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches // *Annual Review of Biochemistry*. - 2009. - V. 78. - P. 305-334.
103. Gong, F., Ito, K., Nakamura, Y., Yanofsky, C. The mechanism of tryptophan induction of tryptophanase operon expression: tryptophan inhibits release factor-mediated cleavage of TnaC-peptidyl-tRNA(Pro) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2001. - V. 98. - P. 8997-9001.
104. Weisberg, R. A., Gottesman, M. E. Processive antitermination // *Journal of Bacteriology*. - 1999. - V. 181. - P. 359-367.

105. Stebbins, C. E., Borukhov, S., Orlova, M., Polyakov, A., Goldfarb, A., Darst, S. A. Crystal structure of the GreA transcript cleavage factor from *Escherichia coli* // Nature. - 1995. - V. 373. - P. 636-640.
106. Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., Vassylyev, D. G. Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription // Cell. - 2004. - V. 118. - P. 297-309.
107. Symersky, J., Perederina, A., Vassylyeva, M. N., Svetlov, V., Artsimovitch, I., Vassylyev, D. G. Regulation through the RNA polymerase secondary channel. Structural and functional variability of the coiled-coil transcription factors // J Biol Chem. - 2006. - V. 281. - P. 1309-1312.
108. Степанова, Е.В., Шевелев, А.Б., Борухов, С.И., Северинов, К.В. Физико-химические механизмы действия транскрипционных факторов, связывающихся с РНК-полимеразой, но не связывающихся с ДНК // Биофизика. - 2009. - Т. 54. - С. 773-790.
109. Marr, M. T., Roberts, J. W. Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site // Mol Cell. - 2000. - V. 6. - P. 1275-1285.
110. Toulme, F., Mosrin-Huaman, C., Sparkowski, J., Das, A., Leng, M., Rahmouni, A. R. GreA and GreB proteins revive backtracked RNA polymerase *in vivo* by promoting transcript trimming // EMBO J. - 2000. - V. 19. - P. 6853-6859.
111. Hsu, L. M., Vo, N. V., Chamberlin, M. J. *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression *in vivo* and *in vitro* // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1995. - V. 92. - P. 11588-11592.
112. Stepanova, E., Lee, J., Ozerova, M., Semenova, E., Datsenko, K., Wanner, B. L., Severinov, K., Borukhov, S. Analysis of promoter targets for *Escherichia coli* transcription elongation factor GreA *in vivo* and *in vitro* // J Bacteriol. - 2007. - V. 189. - P. 8772-8785.
113. Stepanova, E., Wang, M., Severinov, K., Borukhov, S. Early transcriptional arrest at *Escherichia coli* *rplN* and *ompX* promoters // J Biol Chem. - 2009. - V. 284. - P. 35702-35713.
114. Erie, D. A., Hajiseyedjavadi, O., Young, M. C., von Hippel, P. H. Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription // Science. - 1993. - V. 262. - P. 867-873.
115. Koulich, D., Orlova, M., Malhotra, A., Sali, A., Darst, S. A., Borukhov, S. Domain organization of *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB // J Biol Chem. - 1997. - V. 272. - P. 7201-7210.
116. Kettenberger, H., Armache, K. J., Cramer, P. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage // Cell. - 2003. - V. 114. - P. 347-357.

117. Roghanian, M., Yuzenkova, Y., Zenkin, N. Controlled interplay between trigger loop and Gre factor in the RNA polymerase active centre // *Nucleic Acids Res.* - 2011. - V. 39. - P. 4352-4359.
118. Vassilyeva, M. N., Svetlov, V., Dearborn, A. D., Klyuyev, S., Artsimovitch, I., Vassilyev, D. G. The carboxy-terminal coiled-coil of the RNA polymerase beta'-subunit is the main binding site for Gre factors // *EMBO Rep.* - 2007. - V. 8. - P. 1038-1043.
119. Hogan, B. P., Hartsch, T., Erie, D. A. Transcript cleavage by *Thermus thermophilus* RNA polymerase. Effects of GreA and anti-GreA factors // *J Biol Chem.* - 2002. - V. 277. - P. 967-975.
120. Laptenko, O., Borukhov, S. Biochemical assays of Gre factors of *Thermus thermophilus* // *Methods Enzymol.* - 2003. - V. 371. - P. 219-232.
121. Lamour, V., Hogan, B. P., Erie, D.A., Darst, S.A. Crystal structure of *Thermus aquaticus* Gfh1, a Gre-factor paralog that inhibits rather than stimulates transcript cleavage // *J Mol Biol.* - 2006. - V. 356. - P. 179-188.
122. Laptenko, O., Kim, S.S., Lee, J., Starodubtseva, M., Cava, F., Berenguer, J., Kong, X.P., Borukhov, S. pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation // *EMBO J.* - 2006. - V. 25. - P. 2131-2141.
123. Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., Gourse, R. L. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP // *Cell.* - 2004. - V. 118. - P. 311-322.
124. Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., Vassilyev, D. G. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp // *Cell.* - 2004. - V. 117. - P. 299-310.
125. Vrentas, C. E., Gaal, T., Berkmen, M. B., Rutherford, S. T., Haugen, S. P., Vassilyev, D. G., Ross, W., Gourse, R. L. Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation // *J Mol Biol.* - 2008. - V. 377. - P. 551-564.
126. Rutherford, S. T., Villers, C. L., Lee, J. H., Ross, W., Gourse, R. L. Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA // *Genes Dev.* - 2009. - V. 23. - P. 236-248.
127. Tehranchi, A.K., Blankschien, M.D., Zhang, Y., Halliday, J.A., Srivatsan, A., Peng, J., Herman, C., Wang, J.D. The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery // *Cell.* - 2010. - V. 141. - P. 595-605.

128. Lamour, V., Rutherford, S. T., Kuznedelov, K., Ramagopal, U. A., Gourse, R. L., Severinov, K., Darst, S. A. Crystal structure of *Escherichia coli* Rnk, a new RNA polymerase-interacting protein // J Mol Biol. - 2008. - V. 383. - P. 367-379.
129. Blankschien, M. D., Potrykus, K., Grace, E., Choudhary, A., Vinella, D., Cashel, M., Herman, C. TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription // PLoS Genet. - 2009. - V. 5. - P. e1000345.
130. Pinto, U. M., Winans, S. C. Dimerization of the quorum-sensing transcription factor TraR enhances resistance to cytoplasmic proteolysis // Mol Microbiol. - 2009. - V. 73. - P. 32-42.
131. Gopal, B., Haire, L. F., Gamblin, S. J., Dodson, E. J., Lane, A. N., Papavinasundaram, K. G., Colston, M. J., Dodson, G. Crystal structure of the transcription elongation/anti-termination factor NusA from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.7 Å resolution // Journal of Molecular Biology. - 2001. - V. 314. - P. 1087-1095.
132. Worbs, M., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., Wahl, M. C. An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA // Molecular Cell. - 2001. - V. 7. - P. 1177-1189.
133. Shin, D. H., Nguyen, H. H., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R., Kim, S. H. Crystal structure of NusA from *Thermotoga maritima* and functional implication of the N-terminal domain // Biochemistry. - 2003. - V. 42. - P. 13429-13437.
134. Beuth, B., Pennell, S., Arnvig, K. B., Martin, S. R., Taylor, I. A. Structure of a *Mycobacterium tuberculosis* NusA-RNA complex // EMBO J. - 2005. - V. 24. - P. 3576-3587.
135. Mah, T. F., Kuznedelov, K., Mushegian, A., Severinov, K., Greenblatt, J. The alpha subunit of *E. coli* RNA polymerase activates RNA binding by NusA // Genes Dev. - 2000. - V. 14. - P. 2664-2675.
136. Yang, X., Molimau, S., Doherty, G. P., Johnston, E. B., Marles-Wright, J., Rothnagel, R., Hankamer, B., Lewis, R. J., Lewis, P. J. The structure of bacterial RNA polymerase in complex with the essential transcription elongation factor NusA // EMBO Reports. - 2009. - V. 10. - P. 997-1002.
137. Ha, K. S., Touloukhanov, I., Vassylyev, D. G., Landick, R. The NusA N-Terminal Domain Is Necessary and Sufficient for Enhancement of Transcriptional Pausing via Interaction with the RNA Exit Channel of RNA Polymerase // J Mol Biol. - 2010. - V. 401. - P. 708-725.
138. Gusarov, I., Nudler, E. Control of intrinsic transcription termination by N and NusA: the basic mechanisms // Cell. - 2001. - V. 107. - P. 437-449.
139. Shankar, S., Hatoum, A., Roberts, J. W. A transcription antiterminator constructs a NusA-dependent shield to the emerging transcript // Mol Cell. - 2007. - V. 27. - P. 914-927.

140. Yakhnin, A. V., Yakhnin, H., Babitzke, P. Function of the *Bacillus subtilis* transcription elongation factor NusG in hairpin-dependent RNA polymerase pausing in the trp leader // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2008. - V. 105. - P. 16131-16136.
141. Sevostyanova, A., Artsimovitch, I. Functional analysis of *Thermus thermophilus* transcription factor NusG // Nucleic Acids Research. - 2010. - V. - P.
142. Artsimovitch, I., Landick, R. The transcriptional regulator RfaH stimulates RNA chain synthesis after recruitment to elongation complexes by the exposed nontemplate DNA strand // Cell. - 2002. - V. 109. - P. 193-203.
143. Mooney, R. A., Schweimer, K., Rosch, P., Gottesman, M., Landick, R. Two structurally independent domains of *E. coli* NusG create regulatory plasticity via distinct interactions with RNA polymerase and regulators // J Mol Biol. - 2009. - V. 391. - P. 341-358.
144. Belogurov, G. A., Vassilyeva, M. N., Svetlov, V., Klyuyev, S., Grishin, N. V., Vassilyev, D. G., Artsimovitch, I. Structural basis for converting a general transcription factor into an operon-specific virulence regulator // Mol Cell. - 2007. - V. 26. - P. 117-129.
145. Selby, C. P., Sancar, A. Molecular mechanism of transcription-repair coupling // Science. - 1993. - V. 260. - P. 53-58.
146. Selby, C. P., Sancar, A. Structure and function of transcription-repair coupling factor. I. Structural domains and binding properties // J Biol Chem. - 1995. - V. 270. - P. 4882-4889.
147. Deaconescu, A. M., Chambers, A. L., Smith, A. J., Nickels, B. E., Hochschild, A., Savery, N. J., Darst, S. A. Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair // Cell. - 2006. - V. 124. - P. 507-520.
148. Park, J. S., Marr, M. T., Roberts, J. W. *E. coli* Transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation // Cell. - 2002. - V. 109. - P. 757-767.
149. Pomerantz, R. T., O'Donnell, M. Direct restart of a replication fork stalled by a head-on RNA polymerase // Science. - 2010. - V. 327. - P. 590-592.
150. Zalieckas, J. M., Wray, L. V., Jr., Ferson, A. E., Fisher, S. H. Transcription-repair coupling factor is involved in carbon catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *hut* and *gnt* operons // Mol Microbiol. - 1998. - V. 27. - P. 1031-1038.
151. Washburn, R. S., Wang, Y., Gottesman, M. E. Role of *E. coli* transcription-repair coupling factor Mfd in Nun-mediated transcription termination // J Mol Biol. - 2003. - V. 329. - P. 655-662.

152. Trautinger, B. W., Jaktaji, R. P., Rusakova, E., Lloyd, R. G. RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription // *Mol Cell*. - 2005. - V. 19. - P. 247-258.
153. Sukhodolets, M. V., Jin, D. J. RapA, a novel RNA polymerase-associated protein, is a bacterial homolog of SWI2/SNF2 // *Journal of Biological Chemistry*. - 1998. - V. 273. - P. 7018-7023.
154. Muzzin, O., Campbell, E. A., Xia, L., Severinova, E., Darst, S. A., Severinov, K. Disruption of *Escherichia coli hepA*, an RNA polymerase-associated protein, causes UV sensitivity // *J Biol Chem*. - 1998. - V. 273. - P. 15157-15161.
155. Shaw, G., Gan, J., Zhou, Y. N., Zhi, H., Subburaman, P., Zhang, R., Joachimiak, A., Jin, D. J., Ji, X. Structure of RapA, a Swi2/Snf2 protein that recycles RNA polymerase during transcription // *Structure*. - 2008. - V. 16. - P. 1417-1427.
156. Sukhodolets, M. V., Cabrera, J. E., Zhi, H., Jin, D. J. RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription // *Genes & Development*. - 2001. - V. 15. - P. 3330-3341.
157. Yawn, B., Zhang, L., Mura, C., Sukhodolets, M. V. RapA, the SWI/SNF subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, promotes the release of nascent RNA from transcription complexes // *Biochemistry*. - 2009. - V. 48. - P. 7794-7806.
158. Skordalakes, E., Berger, J. M. Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading // *Cell*. - 2003. - V. 114. - P. 135-146.
159. Pavco, P. A., Steege, D. A. Elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase is blocked in vitro by a site-specific DNA binding protein // *J Biol Chem*. - 1990. - V. 265. - P. 9960-9969.
160. Izban, M. G., Luse, D. S. Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing // *Genes Dev*. - 1991. - V. 5. - P. 683-696.
161. Orlova, M., Newlands, J., Das, A., Goldfarb, A., Borukhov, S. Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1995. - V. 92. - P. 4596-4600.
162. Epshtein, V., Nudler, E. Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation // *Science*. - 2003. - V. 300. - P. 801-805.
163. Epshtein, V., Toulme, F., Rahmouni, A. R., Borukhov, S., Nudler, E. Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation // *EMBO J*. - 2003. - V. 22. - P. 4719-4727.
164. Jin, J., Bai, L., Johnson, D. S., Fulbright, R. M., Kireeva, M. L., Kashlev, M., Wang, M. D. Synergistic action of RNA polymerases in overcoming the nucleosomal barrier // *Nat Struct Mol Biol*. - 2010. - V. 17. - P. 745-752.

165. Kashlev, M., Lee, J., Zalenskaya, K., Nikiforov, V., Goldfarb, A. Blocking of the initiation-to-elongation transition by a transdominant RNA polymerase mutation // *Science*. - 1990. - V. 248. - P. 1006-1009.
166. Lutz, R., Bujard, H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements // *Nucleic Acids Research*. - 1997. - V. 25. - P. 1203-1210.
167. Ruusala, T., Andersson, D., Ehrenberg, M., Kurland, C. G. Hyper-accurate ribosomes inhibit growth // *EMBO J*. - 1984. - V. 3. - P. 2575-2580.
168. Ortlepp, S. A. An improved boiling method for the preparation of bacterial plasmid and phage DNA // *Gene Anal Tech*. - 1989. - V. 6. - P. 93-96.
169. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. // CSH: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
170. Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. - 1990. - V. 96. - P. 23-28.
171. Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // *Nucleic Acids Res*. - 1988. - V. 16. - P. 6127-6145.
172. Nudler, E., Gusarov, I., Bar-Nahum, G. Methods of walking with the RNA polymerase // *Methods Enzymol*. - 2003. - V. 371. - P. 160-169.
173. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Anal Chem*. - 1996. - V. 68. - P. 850-858.
174. Bohman, K., Ruusala, T., Jelenc, P. C., Kurland, C. G. Kinetic impairment of restrictive streptomycin-resistant ribosomes // *Mol Gen Genet*. - 1984. - V. 198. - P. 90-99.
175. Guerin, M., Leng, M., Rahmouni, A. R. High resolution mapping of *E. coli* transcription elongation complex in situ reveals protein interactions with the non-transcribed strand // *EMBO J*. - 1996. - V. 15. - P. 5397-5407.
176. Datsenko, K. A., Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2000. - V. 97. - P. 6640-6645.
177. Каташкина, Ж.И., Скороходова, А.Ю., Зименков, Д.В., Гулевич, А.Ю., Минаева, Н.И., Дорошенко, В.Г., Бирюкова, И. В., Машко, С. В. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме // *Мол биология*. - 2005. - Т. 39. - С. 823-831.

178. Olins, P. O., Rangwala, S. H. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli* // J Biol Chem. - 1989. - V. 264. - P. 16973-16976.
179. Dayn, A., Malkhosyan, S., Mirkin, S. M. Transcriptionally driven cruciform formation *in vivo* // Nucleic Acids Res. - 1992. - V. 20. - P. 5991-5997.
180. Svetlov, V., Belogurov, G. A., Shabrova, E., Vassilyev, D. G., Artsimovitch, I. Allosteric control of the RNA polymerase by the elongation factor RfaH // Nucleic Acids Res. - 2007. - V. 35. - P. 5694-5705.
181. Dutta, D., Shatalin, K., Epshtein, V., Gottesman, M. E., Nudler, E. Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli* // Cell. - 2011. - V. 146. - P. 533-543.
182. Witkin, E. M. Radiation-induced mutations and their repair // Science. - 1966. - V. 152. - P. 1345-1353.
183. Schalow, B. J., Courcelle, C. T., Courcelle, J. Mfd is required for rapid recovery of transcription following UV-induced DNA damage but not oxidative DNA damage in *Escherichia coli* // J Bacteriol. - 2012. - V. 194. - P. 2637-2645.
184. Kunala, S., Brash, D. E. Intragenic domains of strand-specific repair in *Escherichia coli* // J Mol Biol. - 1995. - V. 246. - P. 264-272.
185. Cohen, S. E., Lewis, C. A., Mooney, R. A., Kohanski, M. A., Collins, J. J., Landick, R., Walker, G. C. Roles for the transcription elongation factor NusA in both DNA repair and damage tolerance pathways in *Escherichia coli* // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2010. - V. 107. - P. 15517-15522.
186. Howan, K., Smith, A. J., Westblade, L.F., Joly, N., Grange, W., Zorman, S., Darst, S.A., Savery, N.J., Strick, T.R. Initiation of transcription-coupled repair characterized at single-molecule resolution // Nature. - 2012. - V. 490. - P. 431-434.
187. Kumura, K., Sekiguchi, M. Identification of the *uvrD* gene product of *Escherichia coli* as DNA helicase II and its induction by DNA-damaging agents // J Biol Chem. - 1984. - V. 259. - P. 1560-1565.
188. Matson, S. W., George, J. W. DNA helicase II of *Escherichia coli*. Characterization of the single-stranded DNA-dependent NTPase and helicase activities // J Biol Chem. - 1987. - V. 262. - P. 2066-2076.
189. Lee, J. Y., Yang, W. UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke // Cell. - 2006. - V. 127. - P. 1349-1360.

190. Doudney, C. O., Rinaldi, C. N. Chloramphenicol-promoted increase in resistance to UV damage in *Escherichia coli* B/r WP2 trpE65: development of the capacity for successful repair of otherwise mutagenic or lethal lesions in DNA // *Mutat Res.* - 1985. - V. 143. - P. 29-34.
191. Hanawalt, P. C. The U.V. sensitivity of bacteria: its relation to the DNA replication cycle // *Photochem Photobiol.* - 1966. - V. 5. - P. 1-12.
192. Ramakrishnan, V. Ribosome structure and the mechanism of translation // *Cell.* - 2002. - V. 108. - P. 557-572.
193. Spirin, A. S. The ribosome as a conveying thermal ratchet machine // *J Biol Chem.* - 2009. - V. 284. - P. 21103-21119.
194. Saeki, H., Svejstrup, J. Q. Stability, flexibility, and dynamic interactions of colliding RNA polymerase II elongation complexes // *Mol Cell.* - 2009. - V. 35. - P. 191-205.
195. Hatoum, A., Roberts, J. Prevalence of RNA polymerase stalling at *Escherichia coli* promoters after open complex formation // *Mol Microbiol.* - 2008. - V. 68. - P. 17-28.
196. Peters, J. M., Mooney, R. A., Kuan, P. F., Rowland, J. L., Keles, S., Landick, R. Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - V. 106. - P. 15406-15411.
197. Burmann, B. M., Schweimer, K., Luo, X., Wahl, M. C., Stitt, B. L., Gottesman, M. E., Rosch, P. A NusE:NusG complex links transcription and translation // *Science.* - 2010. - V. 328. - P. 501-504.
198. Belogurov, G. A., Mooney, R. A., Svetlov, V., Landick, R., Artsimovitch, I. Functional specialization of transcription elongation factors // *EMBO J.* - 2009. - V. 28. - P. 112-122.
199. Sullivan, S. L., Gottesman, M. E. Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination // *Cell.* - 1992. - V. 68. - P. 989-994.
200. Burmann, B. M., Knauer, S. H., Sevostyanova, A., Schweimer, K., Mooney, R. A., Landick, R., Artsimovitch, I., Rosch, P. An alpha helix to beta barrel domain switch transforms the transcription factor RfaH into a translation factor // *Cell.* - 2012. - V. 150. - P. 291-303.
201. Castro-Roa, D., Zenkin, N. *In vitro* experimental system for analysis of transcription-translation coupling // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - V. 40. - P. e45.
202. Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., Alakhov, Y.B. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield // *Science.* - 1988. - V. 242. - P. 1162-1164.
203. Martin, G.A., Kawaguchi, R., Lam, Y., DeGiovanni, A., Fukushima, M., Mutter, W. High-yield, *in vitro* protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/ translation system // *Biotechniques.* - 2001. - V. 31. - P. 948-950, 952-943.

204. Shirokov, V.A., Kommer, A., Kolb, V.A., Spirin, A.S. Continuous-exchange protein-synthesizing systems // *Methods Mol Biol.* - 2007. - V. 375. - P. 19-55.
205. Kornberg, A. DNA replication // *Biochim Biophys Acta.* - 1988. - V. 951. - P. 235-239.
206. Maluf, N. K., Fischer, C. J., Lohman, T. M. A Dimer of *Escherichia coli* UvrD is the active form of the helicase *in vitro* // *J Mol Biol.* - 2003. - V. 325. - P. 913-935.
207. Yang, W. Lessons learned from UvrD helicase: mechanism for directional movement // *Annu Rev Biophys.* - 2010. - V. 39. - P. 367-385.
208. Butland, G., Peregrin-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J., Emili, A. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli* // *Nature.* - 2005. - V. 433. - P. 531-537.
209. Ahn, B. A physical interaction of UvrD with nucleotide excision repair protein UvrB // *Mol Cells.* - 2000. - V. 10. - P. 592-597.
210. Manelyte, L., Guy, C. P., Smith, R. M., Dillingham, M. S., McGlynn, P., Savery, N. J. The unstructured C-terminal extension of UvrD interacts with UvrB, but is dispensable for nucleotide excision repair // *DNA Repair (Amst).* - 2009. - V. 8. - P. 1300-1310.
211. Arthur, H. M., Eastlake, P. B. Transcriptional control of the *uvrD* gene of *Escherichia coli* // *Gene.* - 1983. - V. 25. - P. 309-316.