

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

На правах рукописи

Агапов Алексей Александрович

**Роль Gre-подобных факторов бактерий рода *Deinococcus* в
регуляции работы РНК-полимеразы**

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Андрей Владимирович Кульбачинский

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление	2
Список сокращений	6
1. Введение	7
2. Обзор литературы.....	11
2.1. Биология бактерии <i>D. radiodurans</i>	11
2.1.1. Особенности морфологии и стрессоустойчивость	11
2.1.2. Пути репарации ДНК	12
2.1.2.1. Эксцизионная репарация.....	12
2.1.2.2. Репарация ошибочно спаренных оснований.....	13
2.1.2.3. Репарация двунитевых разрывов	13
2.1.2.4. Уникальные белки репарации <i>D. radiodurans</i>	16
2.1.2.5. Репарация межнитевых сшивок.....	17
2.1.2.6. ДНК-полимеразы в репарации	18
2.1.3. Механизмы устойчивости к окислительному стрессу	19
2.1.3.1. <i>D. radiodurans</i> устойчив к окислительному стрессу.....	19
2.1.3.2. Ферментативные антиоксидантные системы	19
2.1.3.3. Неферментативные антиоксидантные системы	20
2.1.3.4. Утилизация и ресинтез поврежденных молекул.....	21
2.1.4. Регуляция экспрессии генов у <i>D. radiodurans</i>	222
2.2. Бактериальная транскрипция	25
2.2.1. РНК-полимеразы	25
2.2.2. Структура промотора и инициация транскрипции	25
2.2.3. Структура кор-фермента и элонгация транскрипции	26
2.2.4. Транскрипционные паузы	30
2.2.5. Терминация транскрипции.....	31
2.2.6. Роль транскрипционного фактора NusA в паузах и терминации транскрипции.....	32
2.2.7. Конформационные состояния РНКП	33
2.2.8. Транскрипция поврежденной ДНК бактериальной РНК-полимеразой.....	34
2.2.9. Сопряженная с транскрипцией репарация ДНК.....	34
2.2.10. Регуляция транскрипции факторами, взаимодействующими с РНКП через вторичный канал	36
2.2.10.1. Структура и функции Gre-факторов	36
2.2.10.2. Структура и функции Rnk	39
2.2.10.3. Структура и функции DksA	39
2.2.10.4. Структура и функции TraR	40
2.2.10.5. Транскрипционные свойства белка Rv3788.....	41
2.2.10.6. Структура и функции Gfh1.....	41
2.2.11. РНК-полимераза <i>D. radiodurans</i>	43

3. Материалы и методы	45
3.1. Бактериальные штаммы, плазмиды, среды.....	45
3.1.1. Штаммы.....	45
3.1.2. Плазмиды.....	45
3.1.3. Питательные среды и антибиотики	46
3.2. Методы работы с ДНК	47
3.2.1. Электрофоретическое разделение молекул ДНК	47
3.2.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	47
3.2.3. Очистка ПЦР-продуктов	47
3.2.4. Рестрикция ДНК	47
3.2.5. Выделение ДНК из геля	47
3.2.6. Измерение концентрации ДНК	47
3.2.7. Лигирование	48
3.2.8. Трансформация	48
3.2.9. Выделение плазмидной ДНК	48
3.2.10. Секвенирование ДНК	49
3.3. Получение матриц для реакций транскрипции <i>in vitro</i>	49
3.3.1. Получение матрицы T7A1cons для исследования инициации транскрипции	49
3.3.2. Получение матрицы для исследования скорости элонгации	49
3.3.3. Получение матрицы <i>galP1 tr2</i> для исследования эффективности терминации	49
3.4. ПЦР-мутагенез и клонирование	50
3.5. Выделение белков.....	50
3.5.1. Белки, использованные в реакциях транскрипции <i>in vitro</i>	50
3.5.2. Электрофорез в денатурирующем геле	51
3.5.3. Измерение концентрации белков	52
3.5.4. Суперпродукция и очистка Gfh-факторов	52
3.5.5. Суперпродукция и очистка рекомбинантной РНКП <i>D. radiodurans</i>	53
3.5.6. Выделение РНКП из клеток <i>D. radiodurans</i>	54
3.5.7. Суперпродукция и очистка белка Mfd <i>D. radiodurans</i>	55
3.5.8. Суперпродукция и очистка белка NusA <i>D. radiodurans</i>	56
3.5.9. Суперпродукция и очистка белка σ A R167C <i>D. radiodurans</i>	57
3.5.10. Суперпродукция и очистка белка Sig1 <i>D. radiodurans</i>	58
3.6. Транскрипция <i>in vitro</i>	59
3.6.1. Электрофорез нуклеиновых кислот в денатурирующем геле	59
3.6.2. Буферы, использованные для проведения реакций транскрипции <i>in vitro</i>	60
3.6.3. Тест по определению эффективности синтеза коротких РНК на стадии инициации транскрипции.....	60
3.6.4. Измерение кинетических характеристик синтеза коротких РНК в зависимости от присутствия Gfh-факторов	61
3.6.5. Тест по определению влияния Gfh-факторов на скорость образования полноразмерного продукта в реакции синтеза РНК.....	62

3.6.6. Получение искусственных элонгационных комплексов для исследования расщепления РНК	62
3.6.7. Тест по определению зависимости эндонуклеазной активности РНКП от Gre-подобных факторов.....	63
3.6.8. Измерение времени полужизни <i>his</i> -паузы	63
3.6.9. Получение искусственных элонгационных комплексов для исследования паузирования РНКП	64
3.6.10. Анализ пауз транскрипции в ИЭК	65
3.6.11. Получение минимальных искусственных элонгационных комплексов для исследования синтеза РНК на поврежденных матрицах	66
3.6.12. Получение искусственных элонгационных комплексов с длинной матрицей для исследования синтеза РНК на поврежденной ДНК	68
3.6.13. Тест на точность работы РНКП <i>D. radiodurans</i> при транскрипции поврежденных матриц	69
3.6.14. Тест на эффективность транскрипции поврежденной ДНК РНКП <i>D. radiodurans</i> ..	69
3.6.15. Тесты по влиянию транслоказы Mfd и Gfh-факторов <i>D. radiodurans</i> на транскрипцию поврежденных матриц.....	70
3.6.16. Тест на активность Mfd в диссоциации паузированных элонгационных комплексов на поврежденных матрицах.....	71
3.6.17. Тест по измерению эффективности терминации	71
3.6.18. Метод молекулярных маячков	71
4. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ	74
4.1. Влияние Gfh-факторов на активность РНКП на стадии инициации транскрипции .	75
4.2. Анализ мутантных вариантов Gfh-факторов <i>D. radiodurans</i> в реакции инициации транскрипции	77
4.3. Действие Gfh-факторов на холоферменты РНКП, содержащие главную и альтернативную σ -субъединицы	77
4.4. Влияние Gfh-факторов на аффинность РНКП к каталитическим ионам в реакции синтеза коротких РНК	78
4.5. Влияние Gfh-факторов на аффинность РНКП к инициаторным субстратам	78
4.6. Влияние Gfh-факторов на стабильность промоторных комплексов и скорость перехода от инициации к элонгации транскрипции	79
4.7. Влияние Gfh-факторов <i>D. radiodurans</i> на эндонуклеазную активность РНКП	82
4.8. Влияние Gfh-факторов на синтез полноразмерной РНК	82
4.9. Влияние Gfh-факторов <i>D. radiodurans</i> на продолжительность транскрипционных пауз.....	85
4.9.1. Влияние Gfh-факторов на шпилькозависимые паузы	86
4.9.2. Совместное влияние факторов Gfh и NusA <i>D. radiodurans</i> на продолжительность <i>his</i> -паузы	88

4.9.3. Активность факторов Gfh1 и NusA <i>D. radiodurans</i> в стимуляции других типов пауз	89
4.10. Активность факторов Gfh и NusA <i>D. radiodurans</i> в терминации транскрипции	92
4.11. Транскрипция поврежденной ДНК РНКП <i>D. radiodurans</i>	93
4.12. Точность синтеза РНКП <i>D. radiodurans</i> на поврежденных матрицах	94
4.13. Влияние Gfh на РНКП <i>D. radiodurans</i> при транскрипции поврежденных матриц	97
4.14. Влияние факторов Gfh и Mfd <i>D. radiodurans</i> на транскрипцию поврежденных матриц	100
4.15. Транскрипционные свойства Gfh-факторов <i>D. peraridilitoris</i>	103
5. Обсуждение результатов	105
5.1. Gfh-факторы <i>D. radiodurans</i> не являются анти-Gre-факторами	105
5.2. Влияние Gfh-факторов <i>D. radiodurans</i> на инициацию транскрипции	105
5.3. Влияние Gfh-факторов <i>D. radiodurans</i> на паузы и терминацию транскрипции	107
5.4. Влияние Gfh-факторов <i>D. radiodurans</i> на транскрипцию поврежденных матриц	108
5.5. Транскрипционные свойства Gfh-факторов <i>D. peraridilitoris</i>	110
5.6. Заключение	110
6. Выводы	111
7. Благодарности	112
8. Список литературы	113
Приложение	133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АП (АР)-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт,
АТФ – аденозинтрифосфат,
ГТФ – гуанозинтрифосфат,
дАТФ – дезоксирибоаденозинтрифосфат,
ДТТ – дитиотреитол,
ИЭК – искусственный элонгационный комплекс,
НТФ – нуклеозидтрифосфат,
ПААГ – полиакриламидный гель,
ПЦР – полимеразная цепная реакция,
РНКП – РНК-полимераза,
ТМР – тетраметилродамин,
УТФ – уридинтрифосфат,
ЦТФ – цитидинтрифосфат,
ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтетраацетат,
А – аденин,
BER – base excision repair – эксцизионная репарация оснований,
С – цитозин,
С-КД – С-концевой домен,
ESDSA – extended synthesis-dependent strand annealing,
G – гуанин,
IPTG – изопропил-β-тио-D-галактопиранозид,
N-КД – N-концевой домен,
NER – nucleotide excision repair – эксцизионная репарация нуклеотидов,
PIPES – пиперазин-N,N'-бис(2-этаносульфоновая кислота),
PMSF – фенилметилсульфонилфторид,
SDS – додецилсульфат натрия,
SSA – single strand annealing – выравнивание одностранных ДНК
Т – тимин,
TEMED – N, N, N',N'-тетраметилэтилендиамин,
U – урацил.

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Стрессоустойчивые бактерии способны быстро переключать экспрессию генов в ответ на неблагоприятные факторы. Важную роль в этом процессе играет транскрипция. Бактериальная транскрипция сложным образом регулируется, в том числе с участием белковых факторов, взаимодействующих с РНК-полимеразой (РНКП). Особый интерес среди этих белков представляют Gre-подобные факторы, связывающиеся во вторичном канале РНКП. Классические Gre-факторы есть у большинства бактерий, и они стимулируют эндонуклеазное расщепление РНК в активном центре РНКП, что важно для исправления ошибок транскрипции и реактивации остановленных элонгационных комплексов. Геномы бактерий филума *Deinococcus-Thermus* кодируют гомологи Gre-факторов – белки Gfh. В частности, у известной своей устойчивостью к радиоактивному облучению *D. radiodurans* есть два фактора Gfh: Gfh1 и Gfh2. Известно, что концентрация Gfh1 в клетках этой бактерии повышается при стрессе, что может косвенно свидетельствовать о влиянии Gfh-факторов на активность РНКП в этих условиях.

Несмотря на существование большого числа работ, посвященных изучению репарации ДНК и антиоксидантных систем *D. radiodurans* и других представителей этого рода бактерий, регуляция экспрессии генов этих стрессоустойчивых организмов только начинает изучаться. Эти исследования в основном используют полнотранскриптомные методы, при этом особенности организации транскрипционной машинерии остаются малоисследованными.

Степень разработанности темы. Gfh1-фактор термофильной бактерии *Thermus thermophilus* был подробно изучен как биохимическими, так и структурными методами. Как и другие Gre-подобные факторы, он состоит из двух доменов: глобулярный С-концевой связывается на поверхности РНКП, а сложенный из двух спиралей и соединяющей их неструктурированной петли N-концевой домен проникает во вторичный канал и петля N-концевого домена располагается вблизи активного центра фермента. Было показано, что Gfh1 ингибирует как синтез, так и расщепление РНК в активном центре РНКП, причем действует гораздо эффективнее при пониженных значениях pH. Было предположено, что различия в структуре петли N-концевого домена играют решающую роль в проявлении противоположных свойств Gre и Gfh-факторов. Бактерии рода *Deinococcus* также кодируют Gfh-факторы, причем их количество варьирует у разных видов бактерий. Так, *D. radiodurans* обладает двумя белками Gfh, а *D. peraridilitoris* – четырьмя. Транскрипционные свойства этих белков оставались неизвестны.

Представители *Deinococcus* проявляют устойчивость к радиации, обезвоживанию и окислительному стрессу. Способность переносить эти воздействия обусловлена целым комплексом приспособлений и сложным образом регулируется. Одно из ключевых событий

– повышение концентрации ионов марганца в клетках бактерий, что приводит к активации антиоксидантных систем клетки. Кроме того, во время стресса в ДНК возникает множество повреждений, которые становятся препятствиями для транскрипции. У модельного объекта молекулярной биологии *Escherichia coli* описан механизм сопряжения транскрипции с репарацией, в котором РНК-полимераза выполняет функцию сенсора повреждений в ДНК. Предполагается, что в этом процессе принимает участие транслоказа Mfd, функция которой заключается в удалении РНКП, остановленной на поврежденном участке ДНК, и последующем привлечении факторов репарации. Однако ни особенности работы самой РНКП на поврежденной ДНК, ни вовлеченность в такую транскрипцию дополнительных белков у бактерий рода *Deinococcus* изучены не были.

Цель и задачи исследования. Цель работы: изучить влияние Gfh-факторов бактерий *D. radiodurans* и *D. peraridilitoris* на активность РНК-полимеразы *in vitro*, в том числе, при транскрипции поврежденной ДНК. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на инициацию, элонгацию и терминацию транскрипции в системе *in vitro*.
- 2) Изучить активность РНКП *D. radiodurans* на матрицах ДНК, содержащих поврежденные нуклеотиды.
- 3) Установить, как Gfh-факторы и Mfd-транслоказа бактерии *D. radiodurans* влияют на транскрипцию ДНК-матриц, содержащих различные типы повреждений.
- 4) Исследовать действие Gfh-факторов *D. peraridilitoris* на РНК-полимеразу на различных стадиях транскрипционного цикла *in vitro*.

Научная новизна. В работе описан феномен Mn^{2+} -зависимого ингибиторного эффекта Gfh-факторов *D. radiodurans* на активность РНКП. Показано, что на стадии элонгации этот эффект вызван усилением транскрипционных пауз, причем универсальный элонгационный фактор NusA способен его стимулировать. Впервые исследована точность и эффективность синтеза РНК-полимеразой *D. radiodurans* на поврежденных ДНК-матрицах и установлено, что Gfh-факторы увеличивают продолжительность транскрипционных пауз на поврежденной ДНК. Это может способствовать действию белка Mfd на остановленные транскрипционные комплексы. Впервые получены и исследованы Gfh-факторы *D. peraridilitoris*, показано, что один из них также усиливает паузы транскрипции, в то время как ингибиторное действие остальных трех факторов гораздо слабее или полностью отсутствует.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обнаруженное в работе явление Mn^{2+} -зависимого ингибирования РНКП Gfh-факторами вкупе с уже известными фактами о повышении концентрации как Gfh1, так и ионов Mn^{2+} в клетках *D. radiodurans* при

стрессовых воздействиях позволяет предполагать, что этот процесс активируется стрессом. По-видимому, в условиях большого количества повреждений в ДНК Gfh-факторы могут активировать сопряжение транскрипции с репарацией. Тот факт, что Gfh-факторы работают подобным образом у разных представителей рода *Deinococcus*, может указывать на широкую распространенность такой зависимой от стресса активации репарации среди бактерий филума *Deinococcus-Thermus*, многие из которых проявляют стрессоустойчивость. Полученные результаты дополняют представления о механизмах регуляции транскрипции у бактерий. Кроме того, ингибиторы РНКП, по механизму действия аналогичные Gfh-белкам, в перспективе могут использоваться в качестве антибактериальных агентов.

Методология и методы исследования. Для получения препаратов белков, исследуемых в работе (Gfh-факторы, NusA и Mfd *D. radiodurans* и *D. peraridilitoris*, а также их варианты с аминокислотными заменами), были сконструированы экспрессионные векторы, содержащие соответствующие гены под контролем индуцибельных промоторов. После наработки этих белков в экспрессионных штаммах *E. coli* препараты очищали хроматографическими методами. Для изучения процесса синтеза РНК на стадии инициации и элонгации транскрипции, а также для определения эффективности терминации проводили реакции транскрипции *in vitro* с использованием ДНК-матриц, содержащих в своем составе промоторные элементы. Для измерения скорости эндонуклеазной реакции, продолжительности транскрипционных пауз, а также изучения активности РНКП на поврежденных матрицах получали искусственные элонгационные комплексы с использованием синтетических олигонуклеотидов.

Положения, выносимые на защиту:

- Gfh-факторы *D. radiodurans* подавляют инициацию транскрипции холоферментами РНК-полимеразы, содержащими различные σ -субъединицы, повышая $K_{M,app}$ для инициаторных субстратов;
- Gfh-факторы *D. radiodurans* усиливают паузы и терминацию транскрипции в присутствии ионов Mn^{2+} , вероятно, стабилизируя неактивную конформацию РНК-полимеразы, но не действуют на активные транскрипционные комплексы;
- транскрипционный фактор NusA *D. radiodurans* усиливает шпилькозависимые паузы и терминацию транскрипции и стимулирует действие Gfh-факторов в присутствии ионов Mn^{2+} ;
- присутствие в матрице ДНК поврежденных нуклеотидов снижает точность и эффективность работы РНК-полимеразы *D. radiodurans*;
- Gfh1-фактор *D. radiodurans* в присутствии ионов Mn^{2+} усиливает транскрипционные паузы на поврежденных матрицах и может способствовать работе Mfd-транслоказы, которая приводит к диссоциации остановленных транскрипционных комплексов;

- факторы Gfh1 α и Gfh2 β *D. peraridilitoris* ингибируют инициацию транскрипции, а фактор Gfh1 α *D. peraridilitoris* усиливает шпилькозависимые паузы и терминацию транскрипции в присутствии ионов Mn²⁺;

- белки Gfh являются филум-специфическими ингибиторами транскрипции у бактерий рода *Deinococcus* и могут стимулировать работу систем репарации в стрессовых условиях.

Личный вклад соискателя. Соискатель принимал непосредственное участие в постановке задач, планировании и выполнении экспериментов, обработке данных. Диссертация написана самостоятельно.

Степень достоверности результатов. Результаты были получены с использованием современных методик и качественных расходных материалов на исправно работающем оборудовании. Все результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы.

Апробация результатов. Основные положения и выводы диссертационного исследования в полной мере изложены в 4 научных работах, в том числе в 4 публикациях в рецензируемых научных изданиях, определенных в п. 2.3 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова: Биохимия, PNAS, Biochemical journal, FEBS letters. Результаты работы также были представлены на международных и всероссийских конференциях: 43-й Конгресс FEBS, Чешская республика, Прага, 2018; 42-й Конгресс FEBS Израиль, Иерусалим, 2017; 29th Annual UK Polymerase Workshop, Великобритания, Ньюкасл, 2017; Зимняя молодёжная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, 2017; VII Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике “Геномика и биология живых систем”, Звенигород, 2016; V съезд биохимиков России, Сочи, 2016; 41-й Конгресс FEBS (заочно), 2016; 19- и 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных “Биология Наука XXI века”, Пущино, 2015, 2016. На конференции “Биология Наука XXI века” в 2015 году был получен приз за лучшее постерное сообщение в секции “Молекулярная биология”, а в 2016 в той же секции был признан лучшим устный доклад.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, благодарности, список литературы и приложение. Работа изложена на 134 страницах, содержит 28 рисунков и 11 таблиц.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Биология бактерии *D. radiodurans*

2.1.1. Особенности морфологии и стрессоустойчивость

D. radiodurans – грам-положительная мезофильная аэробная непатогенная бактерия. Клетки *D. radiodurans* имеют кокковидную форму со средним диаметром 1 мкм, часто образуют диады и тетрады. Колонии розовые. Бактерии вида *D. radiodurans* впервые были выделены из мясных консервов, стерилизованных с помощью γ -излучения (Anderson *et al*, 1956). Культура *D. radiodurans* переносит облучение в 10000 Гр без гибели клеток, что делает её в 1000 раз устойчивее культуры клеток человека и в 30 – *E. coli* (Daly *et al*, 1994). Кроме того, *D. radiodurans* устойчив к повышенным дозам ультрафиолетового облучения, высоким концентрациям митомицина С, перекиси водорода и обезвоживанию (обзор (Slade & Radman, 2011)).

Поразительную стрессоустойчивость *D. radiodurans* изучали на протяжении нескольких десятилетий. За этот период выдвигались различные объяснения. На данный момент принято считать, что устойчивость этой бактерии к различным стрессовым воздействиям могут обеспечивать сразу несколько факторов: 1) особенности строения клеточной оболочки, 2) особенности упаковки генома, 3) эффективная работа систем репарации ДНК, 4) защита протеома от окисления, 5) удаление из клеток поврежденных соединений, 6) эффективная регуляция экспрессии генов в стрессовых условиях.

Клеточная оболочка *D. radiodurans* имеет сложное многослойное строение: две мембраны разделены слоем пептидогликана, над внешней мембраной расположены белковый S-слой и углеводная оболочка. Эти три слоя объединяют под названием «розовая оболочка» из-за того, что именно в ней локализуются каротиноиды (Baumeister *et al*, 1986). Геном *D. radiodurans* кодирует 13 генов синтеза каротиноидов (Makarova *et al*, 2001). Предположительно, они функционируют как антиоксиданты и предотвращают окисление мембран. Однако делеции этих генов не приводят к существенному снижению устойчивости бактерий к ионизирующему облучению (Tian *et al*, 2007). В то же время, была показана важная роль белка DR_2577, связывающего в S-слое уникальный для *Deinococcus* каротиноид дейноксантин, в защите от ультрафиолетового облучения (Farci *et al*, 2016). Таким образом, роль каротиноидов клеточной оболочки в защите от стресса у *D. radiodurans* остается дискуссионным вопросом.

Геном *D. radiodurans* состоит из двух кольцевых хромосом и двух плазмид общей длиной 3.3 миллиона пар нуклеотидов (White *et al*, 1999). При этом количество ДНК в клетках варьирует в зависимости от условий. Показано, что на экспоненциальной стадии роста *D.*

radiodurans может содержать до 10 копий генома, а на стационарной фазе не меньше двух (Driedger, 1970). Это позволяет *D. radiodurans* проводить репарацию повреждений ДНК, в первую очередь двунитевых разрывов, путем гомологичной рекомбинации. ДНК в *D. radiodurans* сильно компактизована и уложена в нуклеоид торроидальной формы (Levin-Zaidman *et al*, 2003). Предполагалось, что такая плотная упаковка может защитить её от повреждений, однако было показано, что ионизирующее облучение приводит к сравнимому уровню разрывов в ДНК *D. radiodurans* и *E. coli* (Gérard *et al*, 2001). Была выдвинута гипотеза, что копии генома в нуклеоиде *D. radiodurans* выровнены друг с другом, чтобы облегчить протекание гомологичной рекомбинации сразу же после обнаружения повреждения в ДНК (Minton, 1994). Последние исследования показали, что это не так: выравнивание хромосом действительно происходит, но уже после повреждающего воздействия (Passot *et al*, 2015). В таком случае плотная упаковка всё же может быть полезна для удержания концов двунитевых разрывов поблизости друг от друга для облегчения их последующей репарации.

2.1.2. Пути репарации ДНК

D. radiodurans обладает стандартным для прокариот набором механизмов репарации ДНК: BER (base excision repair – эксцизионная репарация оснований), NER (nucleotide excision repair – эксцизионная репарация нуклеотидов), MMR (mismatch repair – репарация ошибочно спаренных оснований) и пути репарации двунитевых разрывов. Большинство белков, принимающих участие в этих процессах, консервативны для всех бактерий. Не является исключением и *D. radiodurans*. Однако при более внимательном анализе путей репарации ДНК у этой бактерии обнаружились некоторые отличия от чувствительных к стрессу бактерий, а также оказалось, что геном *D. radiodurans* кодирует несколько уникальных белков, вовлеченных в репарацию либо защиту ДНК от повреждений (обзор (Timmins & Мое, 2016)).

2.1.2.1. Эксцизионная репарация

ДНК-гликозилазы – ключевые ферменты эксцизионной репарации оснований. У *D. radiodurans* обнаружены гены 12 ДНК-гликозилаз, специфичных к некомплементарным парам G-U, G-A и G-T, поврежденному гуанину, тимин-гликолю, урацилу, метиладенину, формамидопиримидину (White *et al*, 1999; Makarova *et al*, 2001), в то время как геном *E. coli* кодирует 8 ДНК-гликозилаз (Жарков, 2007).

У *D. radiodurans* есть две системы эксцизионной репарации нуклеотидов: UvrABC и UvsE. UvrABC, по-видимому, функционирует так же, как у других бактерий. Кроме обычного белка UvrA *D. radiodurans* обладает дополнительным белком UvrA второго класса, также известным как UvrA2 (White *et al*, 1999; Eisen & Wu, 2002). Это не уникальная

особенность *Deinococcus*, но интересно, что UvrA2 встречается у бактерий, обитающих в экстремальных условиях. По строению этот белок очень похож на UvrA1, но у него отсутствует сайт для взаимодействия с UvrB (Eisen & Wu, 2002). Роль UvrA2 в репарации пока не установлена, но было показано, что он важен для стрессоустойчивости (Eisen & Wu, 2002).

UvsE – Mn^{2+} -зависимая эндонуклеаза, специфичная к пиримидиновым димерам (Earl *et al*, 2002b). Таким образом, у *D. radiodurans* есть дополнительная система для репарации этого повреждения. Возможно, с этим связано отсутствие необходимости в фотолиазе, которую геном *D. radiodurans* не кодирует (Makarova *et al*, 2001).

2.1.2.2. Репарация ошибочно спаренных оснований

В репарации ошибочно спаренных оснований у *D. radiodurans* ключевую роль играют белки MutS и MutL. Показано, что MutS более специфичен и аффинен к неспаренным основаниям, чем аналогичные белки модельного объекта молекулярной биологии *E. coli* и хорошо изученной родственной *D. radiodurans* бактерии *T. thermophilus* (Eisen & Wu, 2002). Тем не менее, частота спонтанных мутаций за деление у *D. radiodurans* выше, чем у *E. coli*, что свидетельствует о низкой эффективности работы системы MMR. Следует также отметить, что на данный момент остается неизвестным механизм различения материнской цепи ДНК от дочерней, так как в геноме *D. radiodurans* не закодирована Dam-метилаза (Mennecier *et al*, 2004; Makarova *et al*, 2001). Интересно, что геном *D. radiodurans* также содержит гомолог MutS – MutS2, не принимающий участия в MMR. Этот белок демонстрирует Mn^{2+} -зависимую эндонуклеазную активность и каким-то образом участвует в RecA-независимой репарации окислительных повреждений в ДНК (Zhang *et al*, 2014).

2.1.2.3. Репарация двунитевых разрывов

Для репарации двунитевых разрывов ДНК бактерии используют две стратегии: негомологичное сшивание концов (NHEJ – nonhomologous end joining) и гомологичную рекомбинацию. У *D. radiodurans* не обнаружено эффективной системы NHEJ, при этом он способен восстанавливать целостность ДНК после 200 двунитевых разрывов на одну копию генома (Daly & Minton, 1996). Это указывает на значительный вклад гомологичной рекомбинации в репарацию таких повреждений.

Важнейший этап гомологичной рекомбинации – связывание белка RecA с одонитевым участком ДНК. Для этого ДНК вблизи разрыва подвергается процессированию с образованием выступающего одонитевого участка ДНК на 3'-конце цепи. У *E. coli*

хеликаза RecQ расплетает дуплекс ДНК со стороны разрыва, после чего экзонуклеаза RecJ отщепляет нуклеотиды с 5'-конца молекулы и оставляет участок одноцепочечной ДНК (Morimatsu & Kowalczykowski, 2014). Считается, что функцию RecQ у *D. radiodurans* выполняет белок NER UvrD (Bentchikou *et al*, 2010). С одонитевым участком ДНК связываются белки SSB, которые должны быть удалены перед связыванием ключевого белка гомологичной рекомбинации – RecA (рис. 2.1). Функцию удаления SSB и загрузки RecA у бактерий могут выполнять системы RecBCD и RecFOR. Поскольку у *D. radiodurans* отсутствуют белки RecB и RecC, эту роль выполняет RecFOR. У *D. radiodurans* мутация в RecO, нарушающая его взаимодействие с SSB, приводит к очень слабому эффекту на репарацию через путь RecFOR, что может указывать на наличие альтернативы RecO в этом процессе (Cheng *et al*, 2014). Недавно был обнаружен белок DR1088, участвующий во взаимодействии с SSB и с RecF. Предполагается, что он может дублировать RecO и, возможно, участвовать в других генетических процессах за счет способности связывать ДНК и выравнивать одонитевые молекулы. Важно отметить, что в отличие от других генов, кодирующих белки пути RecFOR, делеция *dr1088* летальна (Cheng *et al*, 2017).

Дополнительным подтверждением участия RecFOR-пути в гомологичной рекомбинации выступают данные о сходстве эффектов делеций генов, кодирующих этот комплекс, и *recA*: повышение чувствительности к облучению и снижение уровня репаративного синтеза ДНК (Bentchikou *et al*, 2010).

RecA *D. radiodurans* по сравнению с RecA *E. coli* обладает большим сродством к ДНК, в особенности двунитевой (Warfel & LiCata, 2015; Kim & Cox, 2002; Kim *et al*, 2002). Установлено, что активность RecA *D. radiodurans* регулируется фосфорилированием по остаткам тирозина и треонина: у фосфорилированного RecA дополнительно повышена

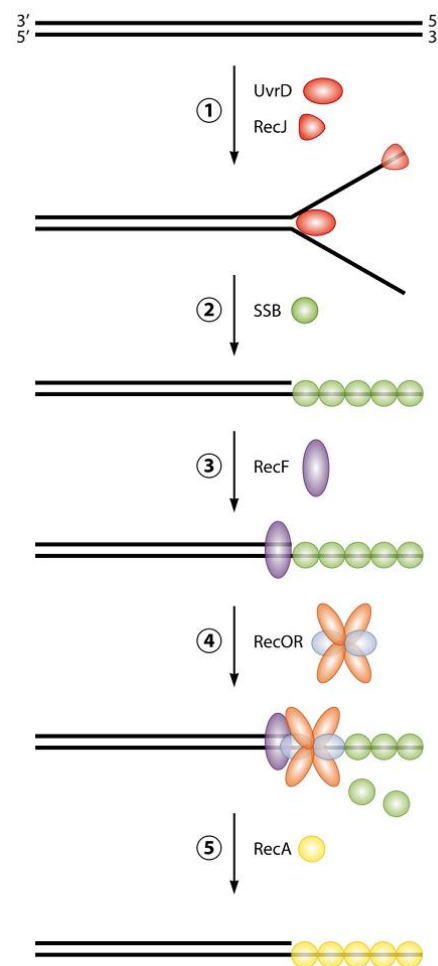


Рисунок 2.1 Схема RecFOR пути процессирования концов двунитевого разрыва у *D. radiodurans*. 1. UvrD расплетает двойную спираль и RecJ укорачивает 5'-конец ДНК. 2. SSB связываются с одонитевым участком ДНК. 3. RecF связывается на стыке одонитевого и двуцепочечного участков ДНК. 4. Происходит сборка RecOR комплекса. 5. RecOR вытесняет SSB, место которых занимают белки RecA (из (Slade & Radman, 2011)).

аффинность к двунитевой ДНК. При этом активность серин/треониновой/тирозиновой протеинкиназы RqkA, задействованной в этом процессе, повышается при повреждении ДНК (Rajpurohit *et al*, 2016). Таким образом, RecA *D. radiodurans*, по-видимому, привлекается к двунитевым разрывам после стрессового воздействия и начинает инвазию 3'-конца одонитевой ДНК в гомологичную хромосому сразу же после процессирования концов ДНК системой RecFOR. Геном *D. radiodurans* также кодирует белок RadA – гомолог RecA, принимающий участие в репарации: мутанты, лишённые *radA*, более чувствительны к ионизирующему облучению (Zhou *et al*, 2006).

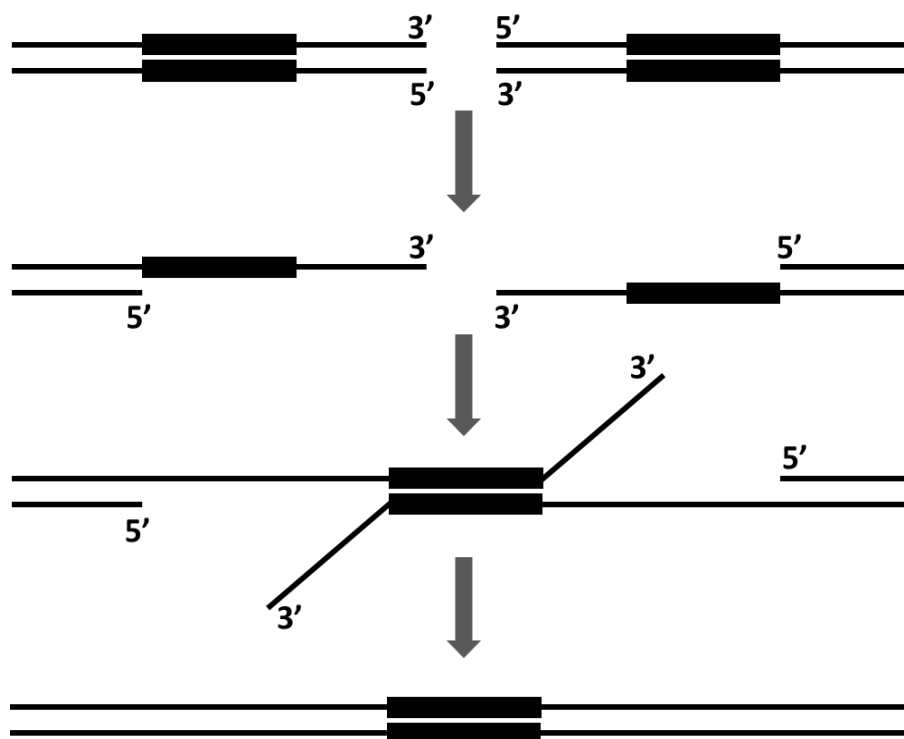


Рисунок 2.2 Репарация двунитевого разрыва путем выравнивания одонитевых ДНК (SSA). ДНК укорачивается с 5'-концов в области разрыва, гомологичные участки выравниваются, недостающая ДНК достраивается, брешь лигируется.

Недавно была обнаружена важная роль процесса выравнивания одонитевых ДНК (SSA – single strand annealing) в репарации двунитевых разрывов у *D. radiodurans*. Этот процесс начинается с укорачивания ДНК с 5'-конца экзонуклеазой (рис. 2.2). Далее гомологичные участки одонитевой ДНК, находящиеся по разные стороны от разрыва, отжигаются друг с другом, после чего удаляются некомплементарные 3'-концевые фрагменты, недостающие участки ДНК синтезируются полимеразы, одонитевые разрывы сшиваются лигазами (Fishman-Lobell *et al*, 1992). При этом репарация разрыва может сопровождаться делецией участка между двумя гомологичными фрагментами ДНК внутри одной хромосомы. Оказалось, что за счет SSA возможна сборка генома после обработки клеток *D. radiodurans* ионизирующим облучением даже в отсутствие RecA и RecF, причем облучение стимулирует работу SSA (Ithurbide *et al*, 2015). Предполагается, что в условиях многочисленных разрывов

в ДНК после воздействия ионизирующего облучения SSA-путь предшествует гомологичной рекомбинации и облегчает сборку генома.

2.1.2.4. Уникальные белки репарации *D. radiodurans*

Было продемонстрировано, что нуклеоид *D. radiodurans* этой бактерии после облучения обогащается целым рядом белков, среди которых ферменты гомологичной рекомбинации RecA, UvrD, RecJ, RecQ, субъединицы ДНК-гиразы *gyrA* и *gyrB*, а также уникальные белки DdrA, DdrB, DdrD (de la Tour *et al*, 2013), DdrC (Bouthier de la Tour *et al*, 2017), PprA (Devigne *et al*, 2013).

PprA – ДНК-связывающий белок, обладающий сродством к концевым участкам двунитевой ДНК. Кинетика репарации двунитевых разрывов ДНК у *D. radiodurans* с делецией гена *pprA* свидетельствует об участии этого белка в RecA-зависимом пути репарации. Кроме того, PprA необходим для правильного распределения ДНК в дочерние клетки после деления (Devigne *et al*, 2013). Анализ белок-белковых взаимодействий обнаружил среди белков-партнеров PprA обе субъединицы ДНК-гиразы, которая может разрешать катенаны и создавать супервитки ДНК. Оказалось, что PprA стимулирует первую и ингибирует вторую активность ДНК-гиразы (Kota *et al*, 2016; Devigne *et al*, 2016). Таким образом, роль PprA, видимо, заключается в регуляции работы ДНК-гиразы, необходимой для разделения копий ДНК после репарации множественных двунитевых разрывов, а также после репликации.

DdrB – ещё один уникальный белок *D. radiodurans*. Он связывает однонитевую ДНК и является, таким образом, функциональным аналогом SSB, не проявляя, однако, гомологии с классическими бактериальными SSB (Norais *et al*, 2009). Делеция DdrB приводит к снижению устойчивости клеток к ионизирующему облучению (Tanaka *et al*, 2004). Генетический подход и анализ структуры комплекса DdrB с ДНК показали его ключевую роль в SSA-пути репарации разрывов ДНК: именно DdrB, связанный с двумя гомологичными фрагментами однонитевой ДНК, обеспечивает их отжиг (Bouthier de la Tour *et al*, 2011; Sugiman-Marangos *et al*, 2016). В этом же пути задействован DdrA – гомолог эукариотического Rad52. DdrA *in vitro* связывается с 3'-концами однонитевой ДНК. Скорее всего, в клетке он может выполнять функцию защиты ДНК от нуклеаз в период сразу после облучения (Harris *et al*, 2004). DdrC – ещё один белок, связывающий ДНК с предпочтением к однонитевой форме, и, возможно, принимающий участие в защите ДНК от деградации. DdrC способствует отжигу гомологичных однонитевых ДНК. Делеция *ddrC* приводит к повышению чувствительности бактерий к ионизирующему облучению (Bouthier de la Tour *et al*, 2017). Для DdrD пока был проведен только генетический анализ, который показал участие

этого белка в репарации разрывов ДНК (Selvam *et al*, 2013). Роль DdrD в клетке и механизм его действия ещё только предстоит выяснить.

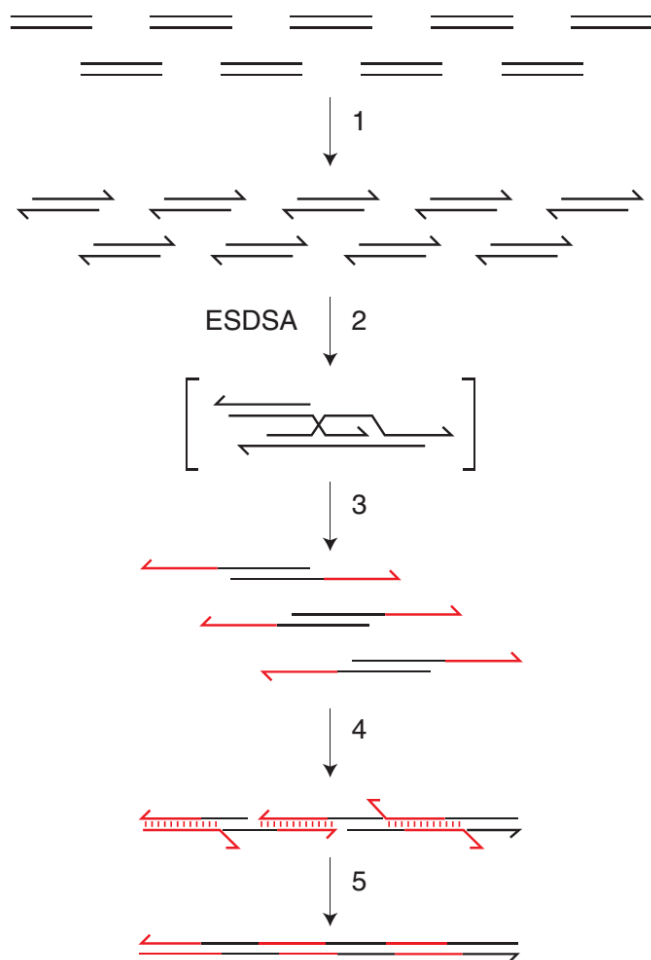


Рисунок 2.3 Схема ESDSA пути репарации двунитевых разрывов ДНК у *D. radiodurans*. 1. Процессирование концов разрыва. 2. Образование D-петель. 3. Репаративный синтез ДНК (новосинтезированные участки показаны красным). 4. Образование комплементарных связей между фрагментами хромосомы. 5. Ковалентное сшивание фрагментов (из (Krisko & Radman, 2010)).

На настоящий момент сложилась следующая картина репарации двунитевых разрывов ДНК *D. radiodurans* после ионизирующего облучения. Непосредственно после повреждающего воздействия в нуклеоид привлекаются уникальные белки *D. radiodurans*, связывающие ДНК и защищающие её от дальнейшей деградации. Затем концы двунитевых разрывов процессируются и начинается фаза отжига однонитевых гомологичных фрагментов – SSA. Затем белки RecA и RadA обеспечивают узнавание гомологичных участков между разными копиями генома, образуются D-петли и происходит синтез недостающих участков ДНК на основе неповрежденных матриц. Репарация, сопровождающаяся активным синтезом ДНК, получила название SDSA-пути (synthesis-dependent strand

annealing). Главной особенностью этого процесса в клетках *D. radiodurans* является его массовость и, как следствие, возможность восстанавливать ДНК из множества фрагментов, образовавшихся в результате разрывов в разных копиях хромосомы (рис. 2.3). За эту особенность такой механизм получил название ESDSA (extended synthesis-dependent strand annealing), т.е. обширный SDSA (обзоры (Krisko & Radman, 2010; Timmins *et al*, 2009)).

2.1.2.5. Репарация межнитевых сшивок

Ещё один тип повреждений, в репарации которых задействована гомологичная рекомбинация – межнитевые сшивки в ДНК, возникающие, например, под действием митомицина С. Основная опасность межнитевых сшивок – блокирование репликации. *D. radiodurans* обладает повышенной устойчивостью к митомицину С. Показано участие

продуктов генов *ugjD* и *yeaZ* в репарации этих повреждений, однако механизм их действия пока не установлен (Onodera *et al*, 2013).

2.1.2.6. ДНК-полимеразы в репарации

Ключевые ферменты репаративного синтеза ДНК – ДНК-полимеразы. *D. radiodurans* обладает тремя ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами: PolI (она же PolA), PolIII и PolX (Makarova *et al*, 2001). Полимеразы PolI и PolIII гомологичны соответствующим ферментам *E. coli* и выполняют у *D. radiodurans* сходные функции. В репарации в основном задействована PolI, причем её активность модулируется ионами Mn^{2+} , накапливающимися в клетках *D. radiodurans* при стрессе (см. ниже): в присутствии Mn^{2+} точность синтеза PolI падает и повышается способность к прохождению поврежденных участков ДНК (Heinz & Marx, 2007). Это может иметь важное физиологическое значение из-за отсутствия у *D. radiodurans* полимераз Y-семейства, участвующих в SOS-репарации (Makarova *et al*, 2001). В ESDSA-пути большую часть ДНК синтезирует PolIII, экспрессия отдельных субъединиц которой возрастает после облучения (Liu *et al*, 2003). PolX *D. radiodurans*, как и другие полимеразы этого семейства, активируется ионами Mn^{2+} , что, как и в случае с PolI, может иметь физиологический эффект. Кроме того, делеция *polX* делает бактерий более чувствительными к ионизирующему излучению и замедляет репарацию двунитевых разрывов в ДНК (Lecoindre *et al*, 2004). Разные научные группы сообщали, что помимо ДНК-полимеразной активности, PolX *D. radiodurans* проявляет 5'-дезоксирибозофосфатлиазную активность, что указывает на её участие в BER (Khairnar & Misra, 2009), а также 3'-5'-экзонуклеазную активность, нехарактерную для ДНК-полимераз этого семейства (Blasius *et al*, 2006).

После ESDSA в ДНК *D. radiodurans* остаются пробелы, которые, видимо, застраиваются ДНК-полимеразами PolI и/или PolX. Существует гипотеза, согласно которой они способны включать в цепь не только дезоксирибонуклеотиды, но и рибонуклеотиды. Это предположение основано на том, что РНК-лигаза Rnl, катализирующая образование связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом в том случае, если на 3'-конце находится минимум два рибонуклеотида, привлекается в нуклеоид через 12-24 часа после облучения, а делеция *rnl* снижает стрессоустойчивость *D. radiodurans* (Schmier *et al*, 2017).

У *D. radiodurans* был обнаружен белок HD-Pnk, обладающий двумя ферментативными активностями: фосфоэстеразной и полинуклеотидкиназной. За счет этих активностей HD-Pnk способен удалять фосфаты с 3'-конца ДНК и кинировать 5'-концевые гидроксильные группы. Таким образом, по-видимому, решается проблема возникающих вследствие разрыва непригодных для дальнейшего процессинга концов ДНК. Поскольку экспрессия HD-Pnk возрастает примерно через 15 часов после облучения, когда основная часть генома уже собрана из фрагментов, скорее всего этот белок способствует сшиванию оставшихся однострунчатых

разрывов в ДНК. Потеря активности HD-Pnk приводит к снижению устойчивости *D. radiodurans* к облучению и обработке митомицином C (Schmier & Shuman, 2018).

2.1.3. Механизмы устойчивости к окислительному стрессу

2.1.3.1. *D. radiodurans* устойчив к окислительному стрессу

Анализ систем репарации *D. radiodurans* не дает окончательного ответа на вопрос о природе радиоустойчивости. В эволюционном эксперименте с *E. coli* была показана возможность приспособления этой бактерии к высоким дозам радиации, однако наследственные изменения затронули не только системы репарации (Harris *et al*, 2009). В настоящее время накоплено достаточно доказательств для того, чтобы считать адаптацию *D. radiodurans* к высоким дозам радиации побочным продуктом приобретения устойчивости к окислительному стрессу (обзор (Slade & Radman, 2011)). При окислительном стрессе в клетках образуются активные формы кислорода: перекись водорода, супероксид-радикалы и гидроксил-радикалы. Гидроксил-радикалы могут получаться в результате радиолиза воды и в реакции Фентона перекиси водорода с ионами железа. Гидроксил-радикалы атакуют макромолекулы с выделением перекиси водорода и супероксид-радикалов, в результате чего из железосерных кластеров белков высвобождаются ионы железа, которые вступают в реакцию Фентона (Imlay, 2006). Таким образом, между образованием активных форм кислорода формируется положительная обратная связь.

Было показано, что бактерии, устойчивые к ионизирующему облучению и к обезвоживанию, обладают высокой устойчивостью к окислительному стрессу (Fredrickson *et al*, 2008). По-видимому, в результате этих воздействий основной вред клетке наносится не напрямую, а через образование активных форм кислорода (Fredrickson *et al*, 2008; Ghosal *et al*, 2005). Причем устойчивые к этим видам стресса бактерии защищают в первую очередь не ДНК, а протеом: была показана обратная корреляция между уровнем карбонилирования белков и устойчивостью к стрессу (Krisko & Radman, 2010). Для защиты белков от повреждений *D. radiodurans* обладает эффективными антиоксидантными системами, избирательно защищает некоторые белки от окисления и активно выводит из клетки поврежденные молекулы (см. обзор Slade & Radman, 2011).

2.1.3.2. Ферментативные антиоксидантные системы

Геном *D. radiodurans* кодирует три каталазы, две пероксидазы, четыре супероксиддисмутазы, два белка Dps. Следует отметить, что перечисленные ферменты ещё не исследованы в полной мере, и вклад каждого из них в противостояние окислительному стрессу ещё предстоит установить. Так, например, недавно было показано, что один из трех белков, аннотированных как каталазы, у *D. radiodurans* не катализирует распад перекиси водорода (Jeong *et al*, 2016a). Тем не менее, активность клеточных экстрактов *D. radiodurans*

в антиоксидантных реакциях гораздо выше, чем у *E. coli* (Tian *et al*, 2004). Белки Dps – компоненты нуклеоида, они защищают ДНК от окисления, хелатируя железо и участвуя в восстановлении перекиси водорода (Martinez & Kolter, 1997). Следует отметить, что делеции генов *katA* и *sodA*, кодирующих пероксидазу и супероксиддисмутазу соответственно, не приводят к значительному снижению стрессоустойчивости (Markillie *et al*, 1999). Возможно, это объясняется дублированием их функций другими ферментами либо существенным вкладом неферментативных систем в антиоксидантную защиту *D. radiodurans*.

2.1.3.3. Неферментативные антиоксидантные системы

Одним из таких механизмов является изменение соотношения концентраций железа и марганца в клетке. Недавно были получены данные о роли белка DR1440 в экспорте ионов железа из клеток *D. radiodurans* при стрессе (Dai *et al*, 2018). В то же время, концентрация ионов марганца в клетках *D. radiodurans* при стрессе возрастает до миллимолярной (Leibowitz *et al*, 1976). Скорее всего, за повышение концентрации Mn^{2+} в клетках ответственен ABC-транспортер, которого становится больше после облучения (Luan *et al*, 2014; Omelchenko *et al*, 2005). Такое повышение концентрации марганца на фоне снижения количества внутриклеточного железа приводит к замещению последнего первым в активных центрах многих ферментов. Это может быть важно для предотвращения образования гидроксид-радикалов в реакции Фентона и деградации белков. Сравнительный анализ показал повышенное соотношение Mn/Fe в клетках радиоустойчивых бактерий, обитающих в пустынях: такая комбинация условий, видимо, делает необходимой высокую устойчивость к окислительному стрессу (Paulino-Lima *et al*, 2016).

Однако роль марганца в стрессоустойчивости *D. radiodurans* не сводится к вытеснению железа из комплексов с белками: ионы Mn^{2+} участвуют в регуляции активности многих ферментов: ДНК-полимераз, супероксиддисмутазы. Кроме того, комплексы ионов марганца с ортофосфатом, нуклеотидами, аминокислотами и пептидами проявляют антиоксидантную активность (Daly *et al*, 2010). О важности такого способа защиты от активных форм кислорода косвенно свидетельствует повышение активности нуклеаз и протеаз в клетках *D. radiodurans* при стрессе, а также факт снижения стрессоустойчивости у делетантов по генам, кодирующим эти ферменты. Вероятно, они служат для генерации органических компонентов марганцевых комплексов, проявляющих антиоксидантные свойства (Berlett & Levine, 2014; Li *et al*, 2013). Было показано, что пептиды из *D. radiodurans*, образующие марганцевые комплексы, повышают устойчивость мышей к ионизирующему облучению (Gupta *et al*, 2016). Наибольший антиоксидантный эффект проявляют комплексы Mn^{2+} с двумя декапептидами DP1 и DP2, причем для их активности важен не только аминокислотный состав, но и последовательность (Peana *et al*, 2016). В одной из работ было проанализировано

распределение марганца в клетках различных бактерий. Оказалось, что по сравнению со стрессочувствительными организмами у *D. radiodurans* большая часть марганца связана в пептидных комплексах (Bruch *et al*, 2015). Авторы более масштабного исследования распределения марганца в клетках также обнаружили, что преимущественное образование марганцем комплексов с ортофосфатом и пептидами обеспечивает защиту от окислительного стресса (Sharma *et al*, 2017). Биоинформатический анализ обнаруживает большее количество марганец-связывающих белков у радиоустойчивых бактерий, чем у радиочувствительных (Peana *et al*, 2018).

Содержание солей марганца в культуральной среде влияет на рост *D. radiodurans*: было показано, что в богатых средах именно Mn^{2+} является лимитирующим фактором роста для этой бактерии (Borsetti *et al*, 2018; Chou & Tan, 1990). Предполагается, что Mn^{2+} снимает блок клеточного цикла, вызываемый некоторым секретируемым в среду низкомолекулярным фактором (Lee *et al*, 2014).

2.1.3.4. Утилизация и ресинтез поврежденных молекул

Репарация повреждений в клетках *D. radiodurans* ведет к высвобождению поврежденных нуклеотидов из ДНК. Кроме того, окисляться могут и свободные нуклеозидтрифосфаты. Для предотвращения их включения в состав нуклеиновых кислот *D. radiodurans* обладает 23 Nudix-гидролазами (nucleoside diphosphate linked to some other moiety X), отщепляющими пирофосфат от поврежденных нуклеотидов. Транскрипция генов 5 Nudix-гидролаз активируется при стрессе (Liu *et al*, 2003).

Гомологи Lon-протеаз у *D. radiodurans* участвуют в деградации поврежденных белков, однако делеции кодирующих их генов не приводят к снижению стрессоустойчивости. Зато к этому эффекту приводит делеция гена, кодирующего протеазу ClpXP. Предполагается её участие в деградации белков до пептидов, проявляющих антиоксидантные свойства в марганцевых комплексах (Servant *et al*, 2007).

Значительная часть белков в клетках *D. radiodurans* при стрессовых воздействиях подвергается расщеплению. Многие из них активно синтезируются заново. К таким белкам относятся некоторые шапероны, ферменты цикла Кребса. Другие белки избегают деградации и, видимо, каким-то образом защищены от воздействия активных форм кислорода. Это трансляционные факторы, некоторые сериновые протеазы, а также β и β' -субъединицы РНКП (Joshi *et al*, 2004). Конкретные механизмы избирательной защиты этих белков от окисления неизвестны, но очевидно, что сохранение транскрипционной и трансляционной систем необходимо для быстрой регуляции экспрессии генов при стрессе и последующем восстановлении жизнедеятельности клетки.

2.1.4. Регуляция экспрессии генов у *D. radiodurans*

Из сказанного выше следует, что в радиоустойчивости *D. radiodurans* задействованы разнообразные системы защиты и репарации ДНК, но не меньшее значение имеет резистентность к окислительному стрессу. Комплексный ответ на стресс у *D. radiodurans* включает индукцию экспрессии множества белков и некодирующих РНК, что приводит к изменению метаболизма и активности определенных молекулярно-генетических путей.

Транскриптомный анализ показал значительное изменение профиля экспрессии генов у *D. radiodurans* под воздействием стресса: γ -облучение, по разным данным, приводит к усилению транскрипции ~ 100-1000 генов (Tanaka *et al*, 2004; Liu *et al*, 2003). Это гены, кодирующие белки репарации ДНК, системы утилизации поврежденных биополимеров, антиоксидантные системы. Стресс индуцирует транскрипцию не только мРНК, но и некодирующих РНК, в том числе антисмысловых РНК и тРНК (Luan *et al*, 2014).

Такой анализ был проведен и для других видов стресса: осмотического (Im *et al*, 2013a) и кадмиевого (Joe *et al*, 2011). В обоих случаях было зафиксировано изменение экспрессии сотен генов, причем часть из этих генов – те же, уровень экспрессии которых изменяется при облучении. Это свидетельствует о наличии общих механизмов адаптации к этим стрессовым воздействиям.

Дифференциальный анализ протеома после облучения также демонстрирует значительные изменения в составе белков клеток *D. radiodurans*: концентрация десятков белков возрастает под действием стресса, среди них факторы репарации, репликации, транскрипции и трансляции, белки, вовлеченные в метаболизм и трансмембранный транспорт ионов, углеводов и нуклеотидов, а также некоторые шапероны (Zhang *et al*, 2005).

Промоторы многих оперонов, активирующихся окислительным стрессом, содержат регуляторный элемент RDRM (radiation/desiccation response motif). В норме с этой последовательностью связан белок-репрессор DdrO. При стрессе DdrO расщепляется Mn^{2+} -зависимой протеазой PprI (он же IrtE), что стимулирует экспрессию десятков генов, включая RecA, SSB, DdrB и др. (Wang *et al*, 2015). PprI – уникальная цинковая протеаза рода *Deinococcus* (Blanchard *et al*, 2017). PprI регулирует экспрессию минимум 31 гена у *D. radiodurans*, и её делеция снижает устойчивость бактерии к стрессу (Earl *et al*, 2002a). Этот белок выполняет свои регуляторные функции посредством различных механизмов. Во-первых, за счет инактивации репрессора DdrO, причем этот же регуляторный путь приводит к запуску клеточной смерти способом, напоминающим апоптоз эукариот (Devigne *et al*, 2015). Во-вторых, PprI участвует в пост-трансляционной модификации (вероятно, протеолизе) транскрипционного фактора PprM, регулирующем экспрессию PprA и одной из каталаз KatE1 (Ohba *et al*, 2009; Jeong *et al*, 2016b). Было показано, что экспрессия PprI *D.*

radiodurans в клетках *E. coli* повышает их устойчивость к осмотическому шоку, индуцируя широкий спектр генов, ответственных за метаболизм (Zhao *et al*, 2015). Кроме того, были получены крайне интересные результаты подобных опытов с эукариотическими клетками, из которых следует, что экспрессия PprI в клетках человека и мыши повышает их устойчивость к облучению (Wen *et al*, 2016; Shi *et al*, 2016). Объяснение этому явлению пока найти не удалось.

К другим транскрипционным факторам, задействованным во множественной регуляции экспрессии генов при стрессе, относятся DrRRA (Wang *et al*, 2008), OxyR (Chen *et al*, 2008), IrrI (Lu *et al*, 2011) и DdrI (Meyer *et al*, 2018). Каждый из них контролирует экспрессию десятков генов, а штаммы, лишенные этих регуляторов, демонстрируют снижение стрессоустойчивости. Функции этих и других описанных к настоящему моменту регуляторов экспрессии генов у *D. radiodurans* суммированы в таблице.

Таблица 2.1. Исследованные факторы, участвующие в регуляции транскрипции у *D. radiodurans*

Фактор	Функция
DdrO	Репрессия оперонов, содержащих RDRM, в частности, генов <i>ddrA</i> , <i>ddrB</i> , <i>ddrD</i> (Wang <i>et al</i> , 2015)
PprI (IrrE)	Регуляция синтеза 31 белка, в том числе, активация некоторых белков репарации (Blanchard <i>et al</i> , 2017; Wang <i>et al</i> , 2015)
PprM	PprI-зависимая регуляция, подавление экспрессии <i>pprA</i> и, предположительно, других белков (Ohba <i>et al</i> , 2009; Jeong <i>et al</i> , 2016b)
DrRRA	Активация транскрипции десятков генов, в том числе, тех, продукты которых вовлечены в ответ на стрессовые условия (Wang <i>et al</i> , 2008)
OxyR	Активация и репрессия генов в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала цитоплазмы (Chen <i>et al</i> , 2008)
IrrI (DR0171)	Активация более 100 белков, в том числе, вовлеченных в ответ на стрессовые условия (Lu <i>et al</i> , 2011)
DdrI	цАМФ-зависимый регулятор экспрессии сотен генов, в том числе тех, продукты которых участвуют в ответе на стресс (Meyer <i>et al</i> , 2018)
Mur	Активация транскрипции генов, продукты которых участвуют в транспорте ионов металлов через клеточную мембрану (Ul-Hussain Shah <i>et al</i> , 2014)

RecX	Подавление экспрессии генов, продукты которых участвуют в постиррадиационном восстановлении (Sheng <i>et al</i> , 2005, 2009)
LexA2	Подавление экспрессии <i>pprA</i> (Sato <i>et al</i> , 2006)
CsoR	Репрессия оперона, кодирующего гены устойчивости к ионам меди (Zhao <i>et al</i> , 2014)
HucR	Репрессия синтеза урат-оксидазы (Wilkinson & Grove, 2004)
HspR	Репрессия генов белков теплового шока (Schmid <i>et al</i> , 2005a)
Гистидиновые киназы, регулирующие транскрипционные факторы	Регуляция транскрипции генов, продукты которых задействованы в ответе на стресс (Im <i>et al</i> , 2013b)
NO	Стимуляция роста и деления клеток после облучения (Patel <i>et al</i> , 2009), участие в регуляции синтеза каротиноидов (Hansler <i>et al</i> , 2016)
FMN-рибо-переключатель	Регуляция синтеза рибофлавина; участие в защите клеток от окислительного стресса (Yang <i>et al</i> , 2014)

Большая часть известных способов регуляции экспрессии генов у *D. radiodurans* осуществляется на стадии транскрипции. Несмотря на имеющиеся данные по изменению транскриптома в различных условиях и на фоне делеций некоторых генов, транскрипционная машинерия *D. radiodurans* только начинает изучаться. Для понимания механизмов переключения экспрессии генов при стрессе необходимо накопить сведения об особенностях строения и регуляции ключевого фермента транскрипции – РНК-полимеразы.

2.2. Бактериальная транскрипция

2.2.1. РНК-полимеразы

ДНК-зависимые РНК-полимеразы синтезируют молекулы РНК на матрице ДНК; этот процесс называется транскрипцией. Все РНК-полимеразы делятся на два класса: односубъединичные и многосубъединичные. Односубъединичные РНК-полимеразы задействованы в транскрипции геномов некоторых вирусов, митохондрий и пластид. Многосубъединичные РНК-полимеразы транскрибируют большинство клеточных генов. Структура этих ферментов и механизм их работы высоко консервативны у бактерий и эукариот. Бактериальная РНК-полимераза (РНКП) может находиться в форме кор-фермента или холофермента. Кор-фермент состоит из пяти субъединиц ($\alpha_2, \beta, \beta', \omega$), обладает каталитической активностью, но не способен к инициации транскрипции. Холофермент включает в себя кор-фермент и фактор инициации (σ -субъединицу). σ -субъединица играет ключевую роль в процессах узнавания и связывания промотора, плавления ДНК и ухода РНКП с промотора. Транскрипционный цикл РНКП представляет собой три последовательные стадии, кратко рассмотренные ниже: инициацию, элонгацию и терминацию синтеза РНК.

2.2.2. Структура промотора и инициация транскрипции

РНКП начинает транскрипционный цикл со связывания с особой последовательностью ДНК – промотором. В бактериальных геномах закодировано несколько типов σ -субъединиц, узнающих различные промоторы. Геном *E. coli* кодирует семь σ -субъединиц: σ^{70} , σ^{54} , σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} , σ^{18} , которые по строению можно разделить на две группы: σ^{70} -подобные и σ^{54} -подобные (обзор (Wösten, 1998)). Большинство промоторов *E. coli* узнаются σ^{70} -фактором, другие σ -субъединицы (альтернативные σ -факторы) ответственны за адаптацию к конкретным физиологическим состояниям. σ^{70} -подобные факторы содержат четыре консервативных района, играющих важную роль в инициации транскрипции. Было показано, что количество молекул кор-фермента РНКП в клетке почти не изменяется на протяжении клеточного цикла и при изменении условий среды (Grigорова *et al*, 2006). Подобная динамика характерна и для ряда σ факторов (σ^{70} , σ^{54} и σ^{24}) (Jishage & Ishihama, 1998). В то же время концентрация некоторых альтернативных σ факторов (например, σ^{38} и σ^{32}), узнающих определенный вид промоторов, возрастает в определенных физиологических состояниях (например, при переходе в стационарную фазу роста или тепловом шоке), что имеет чрезвычайно важный адаптивный характер. Помимо концентрации на конкуренцию альтернативных σ факторов с основным влияет сродство σ -субъединицы к кор-ферменту РНКП. Обнаружено, что σ^{70} обладает самым высоким сродством к кор-ферменту, а σ^{38} – самым низким (Maeda *et al*, 2000). Таким образом, наличие набора σ -субъединиц дает

возможность активно транскрибировать те гены, которые необходимы клетке в данный момент.

В составе бактериальных промоторов выделяют несколько консервативных участков, необходимых для успешного взаимодействия с РНКП. Прежде всего это «-10» (консенсусная последовательность для главной σ -субъединицы ТАТААТ) и «-35» (консенсусная последовательность для главной σ -субъединицы TTGACA) элементы, располагающиеся, соответственно, примерно на 10 и 35 нуклеотидов левее положения начала транскрипции и взаимодействующие с районами 2 и 4 σ -субъединицы. Важным оказывается и расстояние между этими участками промотора. В большинстве случаев оно составляет 17-18 нуклеотидов (Gourse *et al*, 1998). Существуют промоторы с удлинённой «-10» областью, в которых на один нуклеотид левее консервативной последовательности «-10» элемента находится динуклеотид TG, распознаваемый районом 2 σ -субъединицы (Barne *et al*, 1997). В состав некоторых сильных промоторов входит А/Т-богатый участок, расположенный на 50-70 нуклеотидов левее старта точки начала транскрипции. Этот участок, узнаваемый α -субъединицей РНКП, получил название UP-элемента (Gourse *et al*, 1998).

В процессе инициации транскрипции холофермент РНКП образует сначала закрытый промоторный комплекс, в котором ДНК остается в форме двойной спирали. Затем комплекс изомеризуется, что приводит к локальной денатурации ДНК и образованию открытого промоторного комплекса. После образования открытого комплекса РНКП начинает синтез фрагментов РНК длиной 2-9 нуклеотидов, которые диссоциируют из комплекса (Gross *et al*, 1998). Синтез таких коротких молекул РНК называется абортным. На стадии абортного синтеза РНКП сохраняет связи с промотором, поэтому при продвижении фермента по ДНК расплетенные одноцепочечные участки выпетливаются из ДНК-связывающего канала РНКП. Этот процесс сопровождается появлением напряжения в инициаторном комплексе. Накопленная энергия может быть потрачена либо на диссоциацию РНК-продукта, либо на разрыв контактов с промотором (Revyakin *et al*, 2004, 2006). В случае диссоциации продукта РНКП возвращается в стартовое положение и начинает синтез заново. Разрыв контактов с промотором сопровождается диссоциацией σ -субъединицы и переходом транскрипции в стадию элонгации.

2.2.3. Структура кор-фермента и элонгация транскрипции

Структуры РНКП *T. thermophilus* и *E. coli*, а также их комплексов с транскрипционными факторами и рибосомой анализировались методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии (Vassilyev *et al*, 2007a; Tagami *et al*, 2010; Sekine *et al*, 2015; Murakami *et al*, 2002; Bae *et al*, 2015; Demo *et al*, 2017; Kang *et al*, 2018b, 2018a; Guo *et al*, 2018). По форме кор-фермент РНКП похож на клешню краба (рис. 2.4). Одну половину

«клешни» образует в основном β -, а другую – β' -субъединица (Zhang *et al*, 1999). Гомодимер α -субъединиц располагается с противоположной стороны фермента и выполняет в основном структурную функцию, а их С-концевых домены участвуют во взаимодействии с UP-элементами. ω -субъединица контактирует с β' -субъединицей на внешней стороне фермента вблизи канала для выхода РНК и играет роль в регуляции (Vrentas *et al*, 2005).

В щели между субъединицами β и β' формируется главный канал фермента, где связывается РНК-ДНК гибрид длиной 8-9 нуклеотидов и передний ДНК-дуплекс (Vassilyev *et al*, 2007b). РНК-ДНК гибрид помещается между доменами clamp (зажим) β' -субъединицы, β_1 и β_2 β -субъединицы. Активный центр находится в глубине главного канала и связан со вторичным каналом, по которому в активный центр поступают субстраты реакции (Vassilyev *et al*, 2007a). Кроме того, во вторичном канале связываются некоторые транскрипционные факторы (см. ниже). Главный канал отделяется от вторичного консервативным элементом β' -субъединицы F-спиралью (bridge helix, ВН). Новосинтезированная РНК покидает РНКП через специальный канал, где контактирует с доменом flap (заслонка) β -субъединицы (рис. 2.4) (Vassilyev *et al*, 2007a, 2007b).

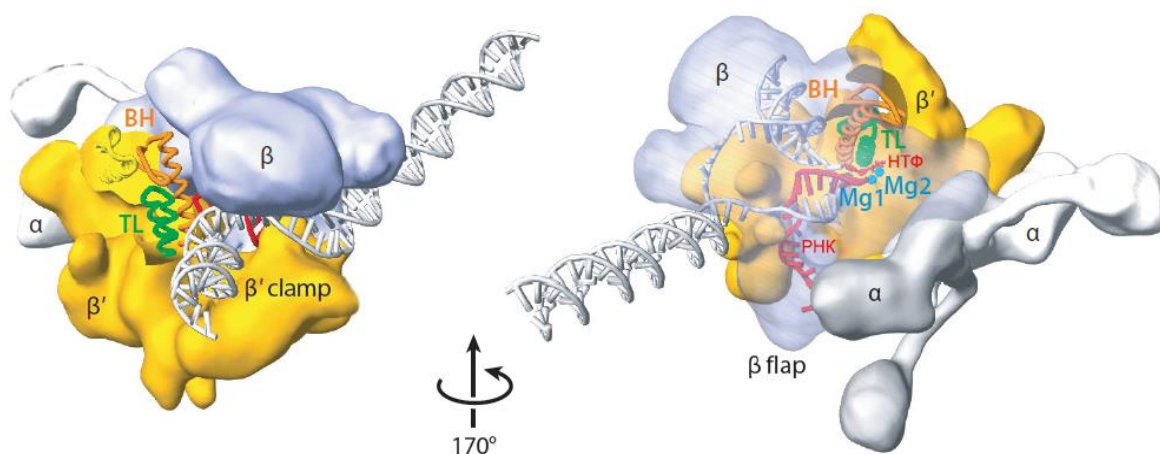


Рисунок 2.4 Элонгационный комплекс. Обозначены субъединицы РНКП, домены clamp и flap, F-спираль (ВН), G-петля (TL). Красным показаны РНК и входящий НТФ. Синим – ионы Mg^{2+} , белым – ДНК (из (Belogurov & Artsimovitch, 2015) с изменениями).

В активном центре выделяют два сайта связывания субстратов: « i » и « $i+1$ ». В « i »-сайте с активным центром РНКП прочно связан один из двух ионов Mg^{2+} ($Mg^{2+}-1$), необходимых для катализа. Он удерживается за счет взаимодействий с тремя остатками аспарагиновых кислот консервативного мотива β' -субъединицы NADFDGD (Zaychikov *et al*, 1996; Sosunov *et al*, 2003, 2005). $Mg^{2+}-1$ участвует в позиционировании 3'-гидроксила растущей РНК и α -фосфата входящего НТФ в активном центре фермента. Второй ион магния, $Mg^{2+}-2$, связывается гораздо слабее, с константой диссоциации порядка сотен мкМ (Sosunov *et al*, 2005). $Mg^{2+}-2$

попадает в активный центр в комплексе с НТФ. Таким образом, в « $i+1$ »-сайте оказываются ион Mg^{2+} -2, НТФ и спаренное с ним азотистое основание матричной ДНК. С рибозой НТФ контактируют консервативные остатки аргинина и аспарагина β' -субъединицы (Svetlov *et al*, 2004). В ходе связывания субстрата РНКП претерпевает конформационные перестройки, благоприятствующие катализу, в частности, закрывается активный центр (Vassilyev *et al*, 2007b).

В состав активного центра также входит G-петля (trigger loop, TL) – подвижный элемент β' -субъединицы. Синхронизированные изменения конформации G-петли и F-спирали обеспечивают присоединение входящего НТФ и последующую транслокацию перестроек (рис. 2.5) (обзоры (Пупов & Кульбачинский, 2010; Belogurov & Artsimovitch, 2015)). В отсутствие субстрата G-петля не обладает четкой структурой и не разрешается при рентгеноструктурном анализе (Vassilyev *et al*, 2007a). Такую конформацию G-петли называют открытой. При связывании НТФ в « $i+1$ » сайте G-петля приобретает конформацию двух спиралей, соединенных перемычкой. Это состояние называется закрытым. Переход G-петли в закрытое состояние индуцируется связыванием правильного НТФ в « $i+1$ » сайте (Yuzenkova *et al*, 2010). В свою очередь, закрывание G-петли стимулирует перенос нуклеотида 3'-конец РНК (Mishanina *et al*, 2017). G-петля формирует множественные взаимодействия со входящим НТФ, стабилизируя его положение, а также формирует вместе с F-спиралью единую стрехспиральную структуру, закрывая активный центр со стороны вторичного канала (Wang *et al*, 2006; Vassilyev *et al*, 2007b; Hein & Landick, 2010). При связывании некомплементарного НТФ G-петля не может перейти в закрытую конформацию из-за неправильной геометрии пары азотистых оснований, а при связывании дНТФ – из-за отсутствия необходимых контактов G-петли с сахаром НТФ (Yuzenkova *et al*, 2010). При этом катализ и последующая транслокация оказываются затруднены. Таким образом, G-петля способствует увеличению точности синтеза РНК.

После включения нуклеотида в состав растущей РНК элонгационный комплекс находится в претранслокационном состоянии: в « $i+1$ » сайте расположены 3'-концевой нуклеотид РНК и пиррофосфат. В этом состоянии РНКП способна катализировать экзонуклеазное отщепление нуклеотида от 3'-конца РНК (Orlova *et al*, 1995). Эта реакция стимулируется присутствием НТФ, некомплементарных следующему положению матрицы (Wang & Hawley, 1993; Sosunov *et al*, 2003). При этом ион Mg^{2+} -2 взаимодействует с фосфатами некомплементарного нуклеотида (Vassilyev *et al*, 2007a). Для продолжения синтеза РНК необходима транслокация (рис. 2.5). Транслокация сопровождается переходом G-петли в открытую, неструктурированную конформацию и высвобождением пиррофосфата. В результате 3'-конец синтезируемой РНК оказывается в « i » сайте, а « $i+1$ » сайт оказывается

свободным для связывания следующего НТФ (Svetlov & Nudler, 2009; Kireeva *et al*, 2010). Такое состояние элонгационного комплекса называют пост-транслокационным.

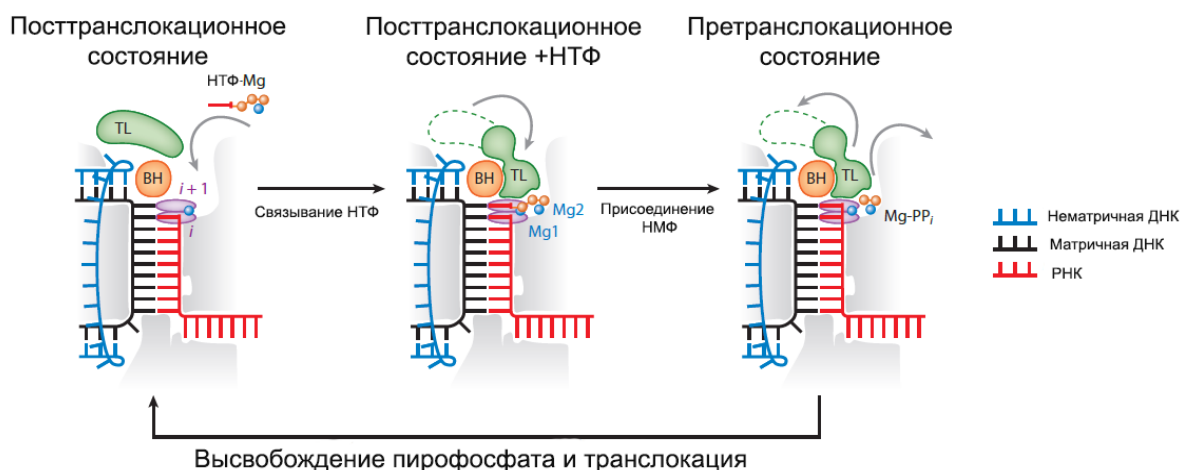


Рисунок 2.5 Катализ присоединения нуклеотида в активном центре РНКП. Обозначены две цепи ДНК, РНК, G-петля (TL), F-спираль (BH), входящий НТФ и каталитические ионы Mg^{2+} . Связывание НТФ в « $i+1$ »-сайте сопровождается структурными изменениями в G-петле, после чего происходит катализ и элонгационный комплекс переходит в претранслокационное состояние. Затем следует транслокация (из (Belogurov & Artsimovitch, 2015) с изменениями).

Помимо претранслокационного и пост-транслокационного состояний элонгационный комплекс может принимать гипер-транслокационное состояние, когда 3'-конец РНК смещается по главному каналу и оказывается позади активного центра (Nedialkov *et al*, 2012). РНКП способна также «отъезжать» по матрице ДНК в обратном направлении («backtracking») (Komissarova & Kashlev, 1997b, 1997a). Смещенные на один или несколько нуклеотидов в обратном направлении элонгационные комплексы могут восстанавливать способность к продолжению синтеза РНК за счет нескольких последовательных раундов транслокации или слабой эндонуклеазной активности, присущей РНКП (Yuzenkova & Zenkin, 2010). Эндонуклеазное расщепление играет важную роль в повышении точности транскрипции, поскольку позволяет исправлять ошибки синтеза РНК (Erie *et al*, 1993; Zenkin *et al*, 2006). Обычно при исправлении ошибок транскрипции РНКП смещается на 1 нуклеотид, что приводит к гидролизу связи между вторым и третьим нуклеотидами с 3'-конца молекулы и высвобождению динуклеотида. Была показана важная роль 3'-концевого нуклеотида в стимуляции этой реакции посредством координирования Mg^{2+} -2 и молекулы воды (Zenkin *et al*, 2006; Sosunova *et al*, 2013). После этого в активном центре фермента оказывается новообразованный 3'-конец РНК, и синтез может быть продолжен. Однако РНКП может смещаться и на большее расстояние с образованием транскрипционной паузы. При этом 3'-конец РНК оказывается во вторичном канале фермента (Komissarova & Kashlev, 1997a). Такие «арестованные» комплексы также реактивируются за счет эндонуклеазной реакции. В катализе расщепления РНК в активном центре РНКП принимает участие G-петля,

которая в этой ситуации принимает частично открытую конформацию (Yuzenkova & Zenkin, 2010; Sekine *et al*, 2015). Важную роль в стимуляции эндонуклеазной активности РНКП играют Gre-факторы, о которых пойдет речь ниже.

2.2.4. Транскрипционные паузы

Во время элонгации РНКП может переходить в неактивное состояние, что приводит к паузам или остановке транскрипции. Транскрипционная паузы – необходимый элемент терминации транскрипции; кроме того, паузы могут иметь регуляторное значение для контроля инициации транскрипции, аттенюации, котранскрипционного фолдинга РНК, а также сопряжения транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК (обзоры (Landick, 2006; Petushkov *et al*, 2017)). Образование паузы сопровождается изменением конформации РНКП, что нарушает циклические конформационные перестройки в ходе элонгации.

На первом этапе элонгационный комплекс принимает конформацию элементарной паузы. Это может произойти при транскрипции любого участка ДНК (Neuman *et al*, 2003). Одной из причин формирования элементарной паузы может быть ошибка транскрипции. Недавно было установлено, что большинство пауз возникает вследствие ошибок транскрипции (James *et al*, 2016). На определенных последовательностях ДНК вероятность формирования элементарной паузы повышена. Несмотря на существование некоторых паттернов, характерных для таких последовательностей, они очень разнообразны: транскрипция прерывается паузой в среднем каждые 100-200 пар оснований (Larson *et al*, 2014; Chen *et al*, 2015). Существует две точки зрения на механизм образования элементарной паузы. Согласно одной группе гипотез, элонгационные комплексы, находящиеся в состоянии элементарной паузы, не отличаются от активных, но остаются в претранслокационном состоянии, поскольку транслокация термодинамически невыгодна из-за особенностей нуклеотидной последовательности: GC-пара в +1 положении переднего дуплекса ДНК и в -10 положении РНК-ДНК гибрида осложняют их плавление (Bai *et al*, 2004; Bochkareva *et al*, 2012). Согласно другой группе гипотез, такие элонгационные комплексы принимают неактивную конформацию (Landick, 2006; Kireeva & Kashlev, 2009). Полученные недавно структурные данные подтвердили наличие небольших конформационных перестроек, нехарактерных для активных транскрипционных комплексов, а также показали полутранслоцированное состояние элонгационных комплексов, находящихся в состоянии элементарной паузы: РНК уже транслоцирована, а ДНК ещё нет (Kang *et al*, 2018a; Guo *et al*, 2018). Остается непонятным, является ли такое состояние нормальным интермедиатом транслокации, или это особая неактивная конформация РНКП.

В дальнейшем такая РНКП может претерпеть конформационные перестройки, приводящие к образованию долгоживущей паузы. Из состояния элементарной паузы РНКП

может возвращаться в состояние активного элонгационного комплекса, смещаться в обратном направлении по матрице ДНК (Komissarova & Kashlev, 1997a) или стабилизироваться в неактивной конформации, в пост-транслокационном (Kireeva & Kashlev, 2009) или в претранслокационном состоянии. В последнем случае важную роль в стабилизации паузы может играть образование шпильки в составе РНК-продукта. Наиболее исследованный вариант таких пауз - *his*-паузы, сигнал которой находится в начале гистидинового оперона и служит для регуляции аттенуации транскрипции. Было показано, что важна не последовательность, а расположение (11-12 нуклеотидов от 3'-конца РНК) этой шпильки (Chan *et al*, 1997; Touloukhonov *et al*, 2001). В случае *his*-паузы элонгационный комплекс также находится в полутранслоцированном состоянии, как и в случае элементарной паузы (Kang *et al*, 2018a; Guo *et al*, 2018). РНК-шпилька образует контакты с доменами flap и clamp РНКП, образующими канал для выхода РНК, и в формировании РНК-дуплекса участвует положительно заряженный мотив в этом канале (Touloukhonov & Landick, 2003; Hein *et al*, 2014; Kang *et al*, 2018a). Взаимодействия РНКП с РНК-шпилькой аллостерически провоцируют дальнейшие изменения конформации РНКП, которые приводят к невозможности сворачивания G-петли в закрытую конформацию и, следовательно, затруднению катализа (Touloukhonov *et al*, 2007; Kang *et al*, 2018a).

2.2.5. Терминация транскрипции

Один из процессов, зависящий от паузирования РНКП – это терминация транскрипции. На последовательностях, называемых терминаторами, время полураспада транскрипционных комплексов составляет несколько секунд. Терминаторы необходимы для разграничения независимо транскрибируемых областей, а также важны для регуляции транскрипции.

Существуют два механизма терминации транскрипции: Rho-зависимый и Rho-независимый (обзоры (Ray-Soni *et al*, 2016; Mitra *et al*, 2017)). Для успешной терминации по второму пути не требуются никакие дополнительные факторы, достаточно взаимодействия терминатора с РНКП. Было показано, что синтез примерно 80% транскриптов *E.coli* терминируется по Rho-независимому пути (Peters *et al*, 2009). Классический терминатор Rho-независимого пути хорошо описан у *E. coli*. Он представляет собой GC-богатую РНК-шпильку и следующую за ней олиго-U последовательность. Взаимодействие новосинтезированного олиго-U участка РНК с РНКП приводит к возникновению элементарной транскрипционной паузы (Gusarov & Nudler, 1999). В отсутствие GC-богатой шпильки РНКП на таких последовательностях с высокой вероятностью претерпевает обратное смещение. Одна из предполагаемых функций шпильки – предотвращение этого смещения, чтобы зафиксировать РНКП на легкоплавком РНК-ДНК гибриде (Komissarova *et al*, 2002). Сообщалось также о важной роли G-петли в терминации транскрипции:

динамические конформационные перестройки G-петли способствуют быстрым сменам состояний элонгационного комплекса, паузированного на олиго-U последовательности. Часть из этих состояний предрасположены к терминации (Ray-Soni *et al*, 2017).

В Rho-зависимом пути принимает участие белковый Rho-фактор – гомогексамерный белок, обладающий АТФ-зависимыми транслоказной и хеликазной активностями. Он связывается с РНК на последовательностях, называемых *rut* (Rho utilization). Эти последовательности могут быть очень разнообразны, и характеризуются высоким содержанием цитозинов и низким – гуанинов. Далее за счет АТФ-зависимой транслоказной активности Rho движется в направлении 3'-конца молекулы, пока не догонит РНКП. После этого происходит диссоциация элонгационного комплекса. Точный механизм диссоциации при Rho-зависимой терминации не известен. Предполагается, что Rho может нарушать контакты между ДНК и РНК в гибриде, связанном в главном канале РНКП (Richardson, 2002) или же вызывать гипертранслокацию элонгационного комплекса (Dutta *et al*, 2008). Физиологическая роль Rho-фактора заключается также в предотвращении транскрипции чужеродной ДНК в бактериальных клетках (Cardinale *et al*, 2008) и в разрешении R-петель, которые формируются позади транскрибирующей РНКП и могут быть источником двунитевых разрывов ДНК (Krishna Leela *et al*, 2013).

2.2.6. Роль транскрипционного фактора NusA в паузах и терминации транскрипции

Транскрипционный фактор NusA универсален для всех бактерий. Он состоит из двух функциональных элементов: РНКП-связывающего N-концевого домена и трех доменов, образующих сайты для взаимодействия с новосинтезированной РНК. NusA усиливает чувствительность РНКП к шпилькозависимым паузам и терминации транскрипции, стабилизируя структуру РНК-шпильки и её взаимодействие с доменом *flap* РНКП (Ha *et al*, 2010; Schmidt & Chamberlin, 1987; Kolb *et al*, 2014). Было показано, что NusA предоставляет положительно заряженную поверхность новосинтезированной РНК и, таким образом, способствует формированию в ней вторичных структур (Guo *et al*, 2018). Помимо шпилечных структур, стабилизирующих паузы, NusA принимает участие в котранскрипционном фолдинге рРНК: новосинтезированная пре-рРНК за счет образования контактов с NusA образует петлевую конформацию, в которой области, фланкирующие пре-16S и пре-23S рРНК, образуют стебельки шпилек. Благодаря этому рРНК успевают принимать правильную укладку до того, как соответствующие РНКазы процессируют пре-рРНК (Bubunenکو *et al*, 2013).

Кроме того, NusA входит в состав антитерминационных комплексов, которые формируются у бактерий при транскрипции рРНК. Кроме NusA они состоят из белков NusB, NusG и рибосомных белков S4 и S10. Антитерминационный комплекс препятствует контакту

Rho-фактора с РНКП. Помимо этого новосинтезирующиеся рРНК защищаются рибосомными белками, а rut-сайты входят в состав вторичных структур, что препятствует их узнаванию Rho-фактором (Kaczanowska & Ryden-Aulin, 2007). Потребность в таких механизмах антитерминации при синтезе рРНК связана с тем, что в этом случае транскрипция не сопряжена с трансляцией, а это облегчает Rho-зависимую терминацию.

2.2.7. Конформационные состояния РНКП

РНКП можно представить как комплекс из четырех модулей (рис. 2.6): «core» (ядро), «shelf» (шельф), «clamp» (зажим) и «jaw-lobe» (челюстная лопасть) (Zhang *et al*, 1999). Недавние структурные исследования конформационных перестроек РНКП показали, что фермент может принимать как минимум две конформации, различающиеся взаимным расположением этих элементов: Т-форму (от англ. tight) и R-форму (от англ. ratcheted) (Tagami *et al*, 2010). Т-форма соответствует элонгационным комплексам, находящимся в активном состоянии. Также такую конформацию принимают комплексы, находящиеся в состоянии элементарной паузы и смещенном на 1 нуклеотид назад состоянии (Sekine *et al*, 2015). R-форма отличается тем, что модули core и shelf развернуты друг относительно друга на 7° по сравнению с Т-формой, G-петля находится в открытом состоянии, а F-спираль изогнута (рис. 2.6) (Tagami *et al*, 2010). РНКП в R-форме не способна к катализу. В эту конформацию РНКП переходит при формировании шпилькозависимой паузы, в том числе при терминации транскрипции, при сильном обратном смещении, а также в свободном, не связанном с ДНК состоянии (Sekine *et al*, 2015). Именно с R-формой РНКП связываются факторы Gre и Gfh1 (см. ниже).

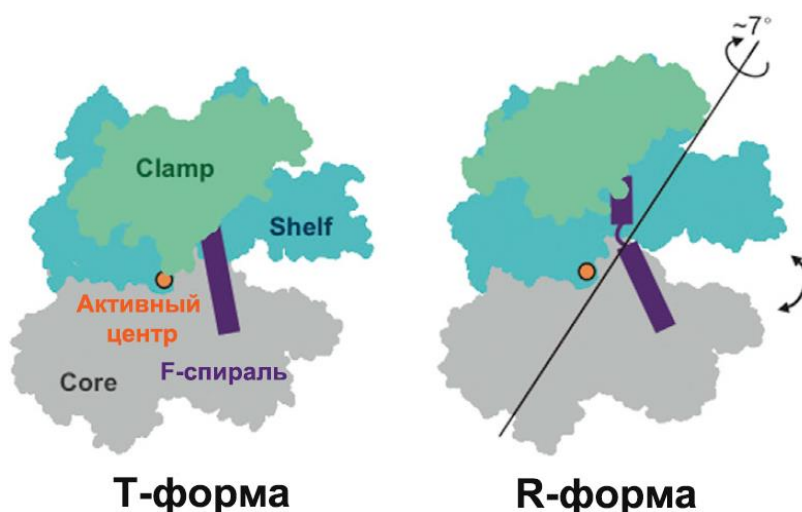


Рисунок 2.6 Конформационные состояния РНКП. Обозначены модули РНКП core, shelf, clamp, F-спираль и активный центр. При переходе РНКП из Т-формы в R-форму происходит поворот модулей shelf и core на 7° относительно друг друга (из (Sekine *et al*, 2015) с изменениями).

2.2.8. Транскрипция поврежденной ДНК бактериальной РНК-полимеразой

Широкое разнообразие повреждений ДНК можно классифицировать с позиции их транскрипции: одни повреждения полностью блокируют синтез РНК, другие приводят к образованию транскрипционных пауз, при этом могут оказывать влияние на точность транскрипции. Есть и такие повреждения, которые РНКП *E. coli* проходит почти без задержек (обзор (Saxowsky & Doetsch, 2006)). К последним относится распространенный в ДНК продукт дезаминирования цитозина – урацил. С достаточно высокой эффективностью РНКП проходит метилированные азотистые основания, такие как 6-О-метилгуанин, а также продукты окисления: 8-оксогуанин, тимин-гликоль. Часть из этих повреждений приводят к ошибкам кодирования: напротив урацила РНКП *E. coli* вставляет АМФ, напротив 6-О-метилгуанина – УМФ, 8-оксогуанина – АМФ или ЦМФ (Viswanathan & Doetsch, 1998). Апуриновые/апиримидиновые-сайты (АП-сайты) также преодолеваются РНКП *E. coli* с преимущественным включением АМФ (Zhou & Doetsch, 1993).

Интересно, что РНКП *E. coli* способна преодолевать односторонние разрывы и даже делеции в матричной цепи ДНК. Эффективность транскрипции в данном случае напрямую зависит от размера делеции (Liu & Doetsch, 1996).

Повреждения ДНК, эффективно преодолеваемые РНКП, обычно репарируются системой BER (base excision repair – эксцизионная репарация оснований), а на исправлении повреждений, значительно изменяющих структуру ДНК-матрицы, специализируется репарационная система NER (nucleotide excision repair – эксцизионная репарация нуклеотидов). В этом случае РНКП может служить сенсором повреждений в ДНК.

2.2.9. Сопряженная с транскрипцией репарация ДНК

Было показано участие РНКП в регуляции трансляции мРНК и репарации ДНК (Proshkin *et al*, 2010; Selby & Sancar, 1993; Newton *et al*, 1965; Yanofsky & Ito, 1966; Mellon & Hanawalt, 1989). В свою очередь, трансляционная машинерия, системы репарации и репликации ДНК также могут влиять на работу РНКП.

РНКП *E. coli*, остановленная на поврежденном участке матрицы, запускает процесс эксцизионной репарации нуклеотидов, сопряженной с транскрипцией (TCR, transcription coupled repair). Впервые такой механизм репарации удалось обнаружить благодаря наблюдению более эффективной репарации матричной цепи ДНК (Mellon *et al*, 1987). В работах различных научных групп было предложено два механизма сопряжения транскрипции с репарацией у бактерий на примере модельного объекта *E. coli* (рис. 2.7). По одной версии, с РНКП сначала связывается ДНК-транслоказа Mfd, которая с затратами АТФ перемещает остановленную РНКП в направлении транскрипции, приводя тем самым к диссоциации элонгационного комплекса (Park *et al*, 2002). Далее с Mfd связываются UvrA и

другие белки NER (Selby & Sancar, 1993; Selby, 2017). Согласно другой гипотезе, с остановленной РНКП сначала связывается ДНК-хеликаза UvrD, которая, вероятно, при участии NusA с затратами АТФ смещает элонгационный комплекс в направлении, обратном движению РНКП при транскрипции (Epshtein *et al*, 2014). Затем UvrD связывается с UvrB, и запускается NER. Несмотря на существование работ, подтверждающих обе гипотезы в *in vitro* экспериментах, результаты *in vivo* экспериментов по анализу фенотипов бактерий с делециями генов *mfd* и *uvrD* противоречивы (Adebali *et al*, 2017; Epshtein *et al*, 2014).

Mfd-транслоказа – большой мультидоменный белок. Домены 1 и 2 обладают структурным сходством с белком NER UvrB и формируют сайт узнавания UvrA. Домен 4 связывается с β -субъединицей РНКП, а домены 5 и 6 необходимы для АТФ-зависимой транслоказной активности (Deaconescu *et al*, 2006). Было показано, что Mfd помогает РНКП преодолевать транскрипционные паузы, толкая РНКП в направлении транскрипции (Park *et al*, 2002; Le *et al*, 2018). Если же РНКП не способна преодолеть препятствие (например, массивное повреждение в ДНК), то Mfd приводит к диссоциации элонгационного комплекса (Le *et al*, 2018; Park *et al*, 2002). Интересно, что Mfd, связавшись с ДНК, транслируется примерно на 200 нуклеотидов, прежде чем диссоциировать от матрицы. Если на этом отрезке окажется ещё один элонгационный комплекс, Mfd способствует продолжению либо терминации транскрипции (Haines *et al*, 2014; Le *et al*, 2018). Реконструкция привлечения белков NER к повреждению показала, что комплекс UvrAB на порядок сильнее связывается с Mfd, связанной с РНКП, чем с поврежденной ДНК (Fan *et al*, 2016).

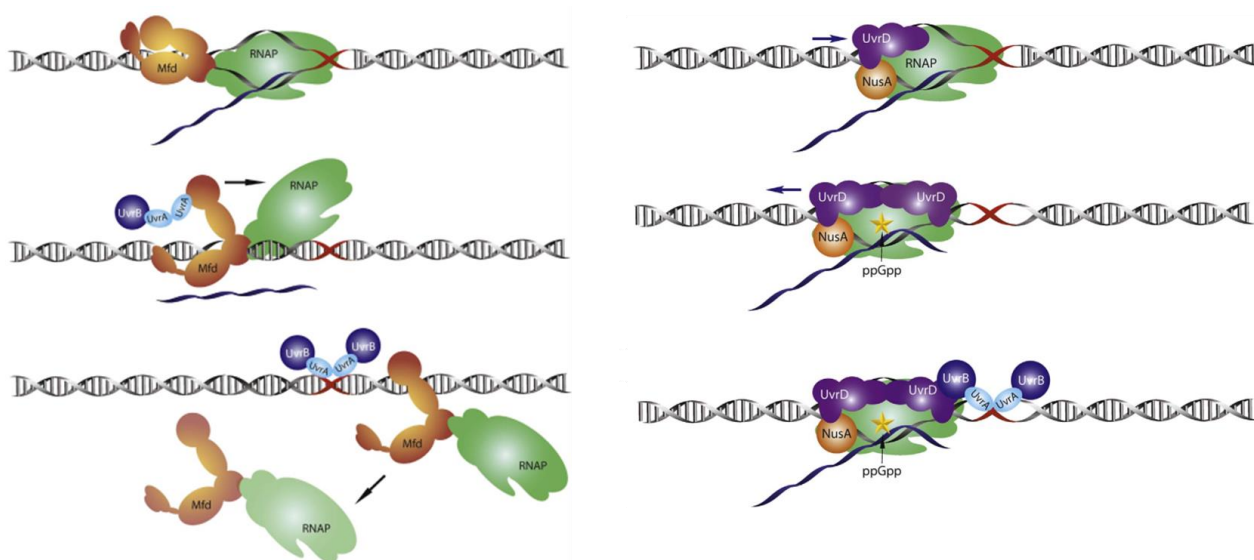


Рисунок 2.7 Сопряженная с транскрипцией репарация (TCR). Mfd-зависимый путь TCR (слева) начинается со связывания Mfd с остановленной на повреждении РНКП. Далее Mfd сдвигает РНКП вперед, вызывая диссоциацию элонгационного комплекса, и привлекает белки NER. UvrD-зависимый путь начинается со связывания UvrD и, возможно, NusA и ppGpp с остановленной на повреждении РНКП. Затем UvrD смещает РНКП в обратном направлении и привлекает белки NER (из (Pani & Nudler, 2017)).

Согласно альтернативной гипотезе, при UvrD-зависимом сопряжении транскрипции с репарацией Mfd тоже играет роль, но на поздних стадиях. Эта модель предполагает, что после репарационных событий РНКП остается в смещенном арестованном состоянии. Mfd может участвовать в реактивации таких комплексов (Pani & Nudler, 2017). UvrD-зависимую модель подтверждают полученные *in vivo* данные, согласно которым UvrD способствует обратному смещению РНКП: делеция *uvrD* снижает жизнеспособность *E. coli*, а делеции генов Gre-факторов в этом штамме нивелируют этот эффект (Epshtein *et al*, 2014). Авторы работы объясняют это тем, что Gre-факторы препятствуют обратному смещению РНКП и ингибируют TCR в отсутствие UvrD, который провоцирует смещение элонгационных комплексов с поврежденной ДНК. Предполагается также участие NusA и ppGpp в стимуляции обратного смещения РНКП (Kamarthapu *et al*, 2016; Pani & Nudler, 2017). Однако существует и альтернативное объяснение этого феномена. Было показано, что UvrD вместо с ppGpp и Gre-факторы могут являться антагонистами не только в TCR, но и в репарации двунитевых разрывов путем гомологичной рекомбинации: UvrD и ppGpp стимулируют этот процесс, а Gre-факторы ингибируют (Sivaramakrishnan *et al*, 2017). Таким образом, результаты экспериментов по анализу жизнеспособности делеционных штаммов *E. coli* не могут рассматриваться как абсолютное доказательство участия UvrD в TCR.

2.2.10. Регуляция транскрипции факторами, взаимодействующими с РНКП через вторичный канал

Среди множества белков, участвующих в регуляции транскрипции у бактерий, особое место занимают транскрипционные факторы, связывающиеся во вторичном канале РНКП, поскольку они не взаимодействуют напрямую с ДНК или РНК. К ним относятся Gre, Gfh, Rnk, Rv3788, DksA, TraR.

2.2.10.1. Структура и функции Gre-факторов

Для стимуляции реакции эндонуклеазного расщепления РНКП в клетках бактерий присутствуют белковые факторы Gre (GreA и GreB у *E. coli*) (Borukhov *et al*, 1992, 1993). Гены этих белков высоко консервативны и широко распространены в геномах бактерий. Пространственные структуры факторов GreA, GreB и их гомологов также очень схожи. У *E. coli* функциональные активности этих белков несколько различны: GreA стимулирует расщепление РНК за два или три нуклеотида от 3'-конца, а GreB – от 2 до 18 нуклеотидов от 3'-конца РНК (Borukhov *et al*, 1993).

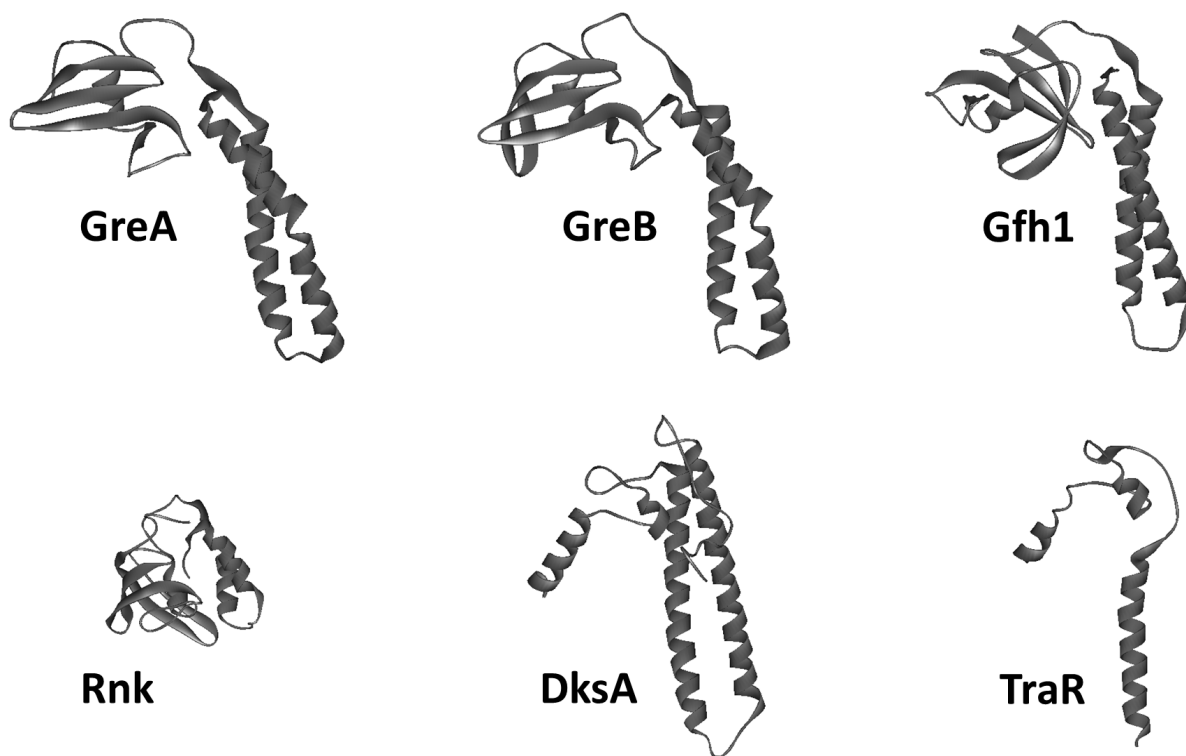


Рисунок 2.8 Gre-подобные факторы бактерий. Структуры гомологичных белков GreA, GreB, Rnk *E. coli*, Gfh1 *T. thermophilus*, а также белков DksA и TraR *E. coli*. Они связываются во вторичном канале РНКП и все, кроме Rnk могут достигать активного центра фермента.

К настоящему времени с помощью рентгеноструктурного анализа установлены пространственные структуры факторов GreA и GreB (Stebbins *et al*, 1995; Vassylyeva *et al*, 2007). Структуры оказались почти идентичными (рис. 2.8). В обоих факторах выделяется два домена: N-концевой (N-КД) и С-концевой (С-КД). По взаимному расположению домены напоминают плечи латинской буквы «L». N-концевой домен состоит из двух α -спиралей, сложенных в coiled-coil структуру. Глобулярный С-концевой домен состоит из α -спирали и пяти β -тяжей. Функциональный аналог Gre-факторов в клетках эукариот – белок TFIIIS – также ускоряет эндонуклеазную реакцию РНК-полимеразы II. Несмотря на отсутствие гомологии и разную вторичную структуру, третичная структура TFIIIS проявляет сходство с Gre-факторами (Kettenberger *et al*, 2003; Izban & Luse, 1992).

Для определения функций доменов белков Gre были проведены эксперименты с химерными белками и изолированными доменами (Koulich *et al*, 1997, 1998). Результаты этих опытов, а также структурные данные свидетельствуют о разделении функций катализа и связывания с РНКП между доменами Gre-факторов: С-КД связывается на поверхности фермента, а N-КД проникает через вторичный канал к активному центру фермента (Polyakov *et al*, 1998; Opalka *et al*, 2003; Sekine *et al*, 2015). Заменяв в каталитическом центре РНКП ионы Mg^{2+} на ионы Fe^{2+} , удалось методом локализованного гидроксил-радикального

футпринтинга показать, что в непосредственной близости от каталитического центра РНКП располагается петля N-КД, соединяющая две α -спирали (Laptenko *et al*, 2003).

Было установлено, что функциональные различия GreA и GreB во многом обусловлены различиями в распределении поверхностного заряда. На N-КД обоих факторов имеется положительно заряженный участок, причем у белка GreB он образован пятью аминокислотными остатками, а у GreA лишь двумя (Stebbins *et al*, 1995). Замена положительно заряженных аминокислотных остатков фактора GreB на аланины приводит к изменению типа расщепления РНК на GreA-тип (Kulish *et al*, 2000). Считается, что за счет наличия более протяженного положительно заряженного участка на поверхности GreB, этот фактор связывается во вторичном канале в присутствии 3'-концевого участка РНК и стимулирует отщепление РНК большей длины.

Делеции и инсерции в петле N-КД приводят к снижению функциональной активности GreA. Из аминокислотных остатков наиболее консервативны D41 и E44 (приведены номера остатков для GreA-фактора *E. coli*). Любые замены (кроме E44D) этих остатков приводят к значительному снижению активности белка. Кроме того, такие Gre-факторы ингибируют полимеразную активность РНКП. Этот эффект частично снимается повышением концентрации Mg^{2+} , что в совокупности с доступной информацией о пространственной структуре указывает на участие факторов Gre в связывании ионов Mg^{2+} (Laptenko *et al*, 2003; Sosunova *et al*, 2003). Видимо, именно доставка иона Mg^{2+} -2 в активный центр РНКП Gre-факторами повышает скорость эндонуклеазной реакции.

Gre-факторы связываются с РНКП, находящейся в R-форме, а также могут стимулировать переход элонгационного комплекса из смещенного на 1 нуклеотид состояния в R-форму (Sekine *et al*, 2015). При связывании во вторичном канале РНКП Gre-фактор замещает G-петлю в активном центре фермента, но не способен к этому во время продуктивной элонгации, когда РНКП находится в T-форме (Sekine *et al*, 2015; Miropolskaya *et al*, 2017; Roghanian *et al*, 2011).

Способность белков Gre активировать эндонуклеазную реакцию РНКП делает их важными регуляторами преодоления транскрипционных пауз и реактивации смещенных элонгационных комплексов (Marg & Roberts, 2000). Присутствие факторов Gre приводит к увеличению скорости элонгации и повышению точности синтеза (Erie *et al*, 1993; James *et al*, 2016; Gamba *et al*, 2017). Подобным образом Gre-факторы стимулируют переход инициаторного комплекса в элонгационное состояние. Это связано с тем, что диссоциация abortивного продукта сопряжена с обратным смещением РНКП (China *et al*, 2011). Вероятно, достраивание abortивного продукта после эндонуклеазного расщепления происходит быстрее, чем его диссоциация и синтез новой РНК.

Гены *greA* и *greB* очень широко распространены среди бактерий. Для ряда организмов было установлено повышение экспрессии этих генов в стрессовых условиях. Обнаружена роль Gre-факторов в разрешении конфликтов между процессами репликации ДНК и транскрипции, происходящих при столкновении РНКП с реплисомой комплексов (Poteete, 2011). Было показано, что репликация, сонаправленная активной транскрипции, часто прерывается (Merrikh *et al*, 2011). Дело в том, что в данном случае реплисома наталкивается на смещенные элонгационные комплексы, что приводит к появлению двунитевых разрывов в ДНК (Dutta *et al*, 2011). Gre-факторы стимулируют реактивацию смещенных элонгационных комплексов и предотвращают образование двунитевых разрывов (Gamba *et al*, 2017).

2.2.10.2. Структура и функции Rnk

У протеобактерий был обнаружен гомолог Gre-факторов – регулятор нуклеозидкиназы, Rnk (Lamour *et al*, 2008). Делеция гена *rnk* в клетках *E. coli* приводит к значительному понижению экспрессии гена нуклеозиддифосфат киназы, продукт которого важен для поддержания уровня НТФ и дНТФ в клетке (Shankar *et al*, 1995). Согласно данным рентгеноструктурного анализа, Rnk состоит из двух доменов (рис. 2.8). С-КД близок по структуре к аналогичному домену белков Gre, в то время как структуры N-КД сильно различаются. Rnk способен связываться с РНКП и конкурировать с другими Gre-подобными факторами, однако длина N-КД недостаточна для взаимодействия с активным центром РНКП, поэтому транскрипт-расщепляющей активностью Rnk не обладает (Lamour *et al*, 2008).

2.2.10.3. Структура и функции DksA

К факторам, связывающимся во вторичном канале РНКП, относится также белок DksA протеобактерий. Несмотря на отсутствие гомологии аминокислотных последовательностей этого фактора и белков Gre, DksA схож с ними структурно (Perederina *et al*, 2004). В его составе также выделяют глобулярный С-КД и фибриллярный N-КД. В составе С-КД расположены четыре остатка цистеина, образующие вместе с ионом Zn^{2+} мотив «цинковый палец». Две протяженные спирали N-КД соединены петлей (Perederina *et al*, 2004). Методом локализованного гидроксил-радикального футпринтинга было показано, что эта петля находится вблизи активного центра РНКП, как и у Gre-факторов (Lee *et al*, 2012). Ещё одно сходство заключается в наличии двух отрицательно заряженных аминокислотных остатков в области, сближенной с активным центром РНКП (Lennon *et al*, 2012; Lee *et al*, 2012). По аналогии с Gre-факторами предполагается, что карбоксильные группы остатков аспарагиновых кислот участвуют в координировании ионов Mg^{2+} (Lee *et al*, 2012). Однако DksA не стимулирует эндонуклеозное расщепление транскрипта и не реактивирует смещенные элонгационные комплексы.

Лучше всего изучена роль DksA в системе «строгого контроля». В условиях аминокислотного голодания в клетке значительно подавляется синтез рРНК и активируется транскрипция генов, связанных с синтезом аминокислот. Важную регуляторную роль в этих процессах играют алармоны: ppGpp и pppGpp. Алармоны связываются с РНКП и модулируют её функции, активируя транскрипцию на одних промоторах и подавляя – на других. Было установлено, что DksA, действуя совместно с ppGpp, облегчает формирование, но снижает стабильность открытых инициаторных комплексов, поэтому их эффект зависит от кинетических свойств конкретных промоторов (Rutherford *et al*, 2007; Paul *et al*, 2005). В последнее время появляются данные о том, что функции DksA не ограничиваются воздействием на инициацию транскрипции. Показано, что он играет роль в элонгации и в разрешении конфликтов при столкновении ДНК-полимеразы и РНКП (Tehranchi *et al*, 2010; Furman *et al*, 2012). Было обнаружено, что DksA увеличивает точность транскрипции (Roghanian *et al*, 2015). Таким образом, и Gre-факторы, и DksA предотвращают конфликты РНКП с реплисомой, но разными путями: сообщалось, что DksA снижает вероятность включения неправильного нуклеотида и, следовательно, обратного смещения и ареста элонгационного комплекса, а Gre-факторы реактивируют смещенные РНКП (Zenkin & Yuzenkova, 2015).

Недавно проведенные структурные исследования показали, что ppGpp имеет два сайта для связывания на РНКП. Один из них (сайт 1) располагается в углублении между β' - и ω -субъединицами, а сайт 2 расположен в области вторичного канала между DksA и β' -субъединицей (Ross *et al*, 2013; Molodtsov *et al*, 2018). Таким образом, сайт 2 формируется только при связывании DksA во вторичном канале РНКП. Связывание ppGpp в сайте 2 сильнее ингибирует транскрипцию, и, таким образом, основной эффект ppGpp – стимуляция активности DksA (Ross *et al*, 2016; Molodtsov *et al*, 2018; Gourse *et al*, 2018). ppGpp повышает аффинность DksA к РНКП, а также помогает его правильному позиционированию во вторичном канале. В результате DksA, как и другие Gre-подобные факторы, оттесняет G-петлю от активного центра и затрудняет связывание инициаторных субстратов (Molodtsov *et al*, 2018).

2.2.10.4. Структура и функции TraR

В конъюгативной F-плазмиде закодирован белок TraR, гомологичный DksA (Blankschien *et al*, 2009). Этот полипептид значительно короче фактора DksA, однако формирует N-КД, состоящий из одной спирали, и глобулярный C-КД (рис. 2.8). Показана важная роль двух остатков аспартата, соответствующих гомологичным остаткам аспартата в DksA (Blankschien *et al*, 2009). Эффекты TraR на РНКП аналогичны эффектам от воздействия DksA в присутствии ppGpp. Сверхэкспрессия TraR может компенсировать функцию DksA у

делеционных мутантов *in vivo*. Интересно, что для проявления активности TraR не требует присутствия ppGpp или других нуклеотидных производных (Blankschien *et al*, 2009; Gopalkrishnan *et al*, 2017). Это позволяет фактору TraR влиять на инициацию транскрипции во время экспоненциальной фазы роста, когда клетка не синтезирует больших количеств алармонов. Согласно структурным данным, TraR связывается с инициаторными комплексами так же, как DksA, только для правильного позиционирования ему не нужен ppGpp (Molodtsov *et al*, 2018).

2.2.10.5. Транскрипционные свойства белка Rv3788

Белок Rv3788 *Mycobacterium tuberculosis* – близкий гомолог Gre-факторов, который не влияет на расщепление РНК в активном центре РНКП (China *et al*, 2012). Вместо этого Rv3788 ингибирует транскрипцию, затрудняя связывание инициаторных НТФ в активном центре РНКП, но не влияя на стабильность инициаторных комплексов. Кроме того, Rv3788 конкурирует с GreA за связывание во вторичном канале РНКП. Авторы объясняют наблюдаемые функциональные отличия от Gre-факторов особенностями строения петли N-КД (China *et al*, 2012).

2.2.10.6. Структура и функции Gfh1

У термофильных бактерий рода *Thermus*, кроме фактора GreA, был обнаружен его гомолог Gfh1 (Gre factor homolog 1) (Hogan *et al*, 2002). Этот фактор не только не активирует транскрипт-расщепляющую активность РНКП, но и подавляет работу фермента. Gfh1 также называют анти-GreA фактором, поскольку он конкурирует с GreA за связывание с РНКП, нивелируя таким образом GreA-опосредованную активацию эндонуклеазного расщепления. В системе транскрипции *in vitro* Gfh1 ингибирует все активности РНКП *T. thermophilus*: синтез РНК, эндонуклеазное и экзонуклеазное расщепление транскрипта, а также пирофосфоролиз (Symersky *et al*, 2006; Hogan *et al*, 2002).

В состав Gfh1 *T. thermophilus* входит 156 аминокислотных остатков, формирующих глобулярный С-КД и фибриллярный N-КД, состоящий из двух α -спиралей, соединенных небольшой петлей (рис. 2.8). С использованием локализованного гидроксил-радикального футпринтинга удалось установить, что N-КД проникает во вторичный канал РНКП, а петля достигает области активного центра фермента (Symersky *et al*, 2006; Laptenko *et al*, 2006). В дальнейшем эти результаты подтвердились рентгеноструктурным анализом комплекса РНКП *T. thermophilus* с Gfh1 (Tagami *et al*, 2010). Пространственная структура белков Gfh1 *T. thermophilus* и *T. aquaticus* оказалась очень похожей на структуру GreA, а в составе петли N-КД обнаружены аминокислотные остатки с карбоксильными группами, что позволило предположить участие Gfh1 в связывании ионов Mg^{2+} активного центра РНКП (Lamour *et al*, 2006; Symersky *et al*, 2006; Laptenko *et al*, 2006). Однако вместо консервативных для всех

Gre-факторов остатков D41 и E44 (приведены номера аминокислот для GreA-фактора *E. coli*), связывающих Mg^{2+} , на конце N-КД Gfh1 *T. thermophilus* располагается четыре остатка аспарагиновой кислоты. В пространственной укладке Gfh1 также имеются важные отличия от GreA: С-КД закристаллизованного Gfh1 повернут на 172° вокруг своей оси относительно положения в Gre, между доменами возникают прямые гидрофобные контакты, усиливающие их связь. Поскольку такое расположение доменов не позволяет петле N-КД взаимодействовать с активным центром РНКП, было предположено существование другой, Gre-подобной конформации белка Gfh1 (Laptenko *et al*, 2006; Symersky *et al*, 2006). Кроме того, поверхность Gfh1 лишена положительно заряженного участка, характерного для Gre.

Для выявления структурных элементов белка, отвечающих за ингибирующий эффект Gfh1, был получен набор мутантов с заменами отдельных аминокислотных остатков или целых участков Gfh1 *T. thermophilus* на последовательность GreA (Laptenko *et al*, 2006). Оказалось, что тип активности фактора определяется N-КД. Однако Gfh1 с заменой фрагмента последовательности, образующего петлю N-КД, на аналогичный участок GreA сохраняет ингибирующие свойства и не активирует транскрипт-расщепляющую активность РНКП. Замены всех остатков аспарагиновой кислоты этой петли на остатки аланина приводит к снижению, но не полному исчезновению ингибирующей активности Gfh1. По-видимому, важную роль в функционировании белков Gre и их гомологов также играют поверхностные заряды N-КД, определяя взаимодействия с РНКП и новосинтезированной РНК.

Gfh1 является конкурентным ингибитором на стадии элонгации транскрипции: он уменьшает сродство РНКП к НТФ, но не снижает максимальную скорость реакции. В то же время в инициации Gfh1 – ингибитор смешанного типа, поскольку помимо воздействия на аффинность РНКП к субстратам белок мешает высвобождению abortивного продукта, что снижает максимальную скорость реакции (Laptenko *et al*, 2006). Активность Gfh1 сильно зависит от концентрации ионов Mg^{2+} . Это позволило предположить механизм ингибирования: по-видимому, кислые остатки петли N-КД способны конкурировать с НТФ за Mg^{2+} в активном центре РНКП. Связавшись с Gfh1, ион Mg^{2+} -2 координируется в неактивном состоянии.

Рентгеноструктурный анализ комплекса РНКП *T. thermophilus* с Gfh1 раскрыл дополнительные причины ингибирующего эффекта этого фактора на полимеразную активность. Во-первых, N-КД Gfh1, располагаясь во вторичном канале РНКП, ограничивает поступление НТФ к активному центру фермента. Во-вторых, петля N-КД занимает место связывания β - и γ -фосфатов НТФ, что препятствует правильному ориентированию НТФ в активном центре. В-третьих, Gfh1 не позволяет G-петле РНКП принять активную

конформацию. Gfh1 связывается с R-формой РНКП и, вероятно, стабилизирует её (Tagami *et al*, 2010; Sekine *et al*, 2015).

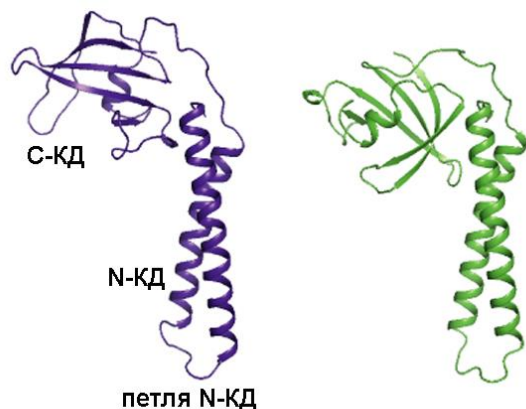


Рисунок 2.9 Конформационные перестройки Gfh1. Слева изображена Gre-подобная конформация Gfh1, наблюдаемая в комплексе с РНКП. Справа - неактивная конформация Gfh1, в которой С-КД развернут на 172° относительно своего положения в активной конформации, что затрудняет проникновение концевой петли к активному центру РНКП (из (Tagami *et al*, 2010)).

Концентрации Gfh1 и GreA в клетках *T. thermophilus* примерно равны (колеблются в пределах 0,5-1 мкМ), в то время как аффинность Gfh1 к РНКП в 8 раз больше, чем GreA. В таком случае вероятно существование механизма регуляции активности Gfh1. Было замечено, что ингибирующий эффект Gfh1 сильно зависит от pH: при изменении pH транскрипционного буфера от 6,5 до 7,5 способность Gfh1 ингибировать транскрипцию падает на порядок. При этом инактивация фактора связана с резким снижением сродства к РНКП (Laptenko *et al*, 2006). Эти факты позволили предположить, что pH среды играет роль переключателя конформационных состояний белка Gfh1. Для проверки этой гипотезы были получены варианты Gfh1 *T. thermophilus* с заменами двух аминокислотных остатков на цистеины (Laptenko *et al*, 2006). Цистеины в белке располагались таким образом, что при образовании дисульфидной связи фиксируется одна из двух конформаций: активная GreA-подобная, либо неактивная. Данные транскрипции *in vitro* показали, что фактор, зафиксированный в GreA-подобной конформации, оказывает даже большее ингибирующее воздействие на синтез РНК, чем белок дикого типа. В то же время, Gfh1, зафиксированный в альтернативной конформации, не обладает способностью подавлять активности РНКП. Эксперименты по связыванию показали, что конформационные перестройки влияют именно на аффинность Gfh1 к РНКП. Таким образом, Gfh1 может находиться в двух конформациях: активной GreA-подобной при pH 6,5 и неактивной при pH $\geq 7,5$ (рис. 2.9).

2.2.11. РНК-полимераза *D. radiodurans*

В последние годы было опубликовано несколько работ, посвященных особенностям транскрипционного аппарата *D. radiodurans*. Было показано, что промоторы, узнаваемые холоферментом РНКП *D. radiodurans*, содержащим главную σ^A -субъединицу, сходны с промоторами, узнаваемыми σ^{70} -субъединицей *E. coli* (Meima *et al*, 2001). Выделены РНКП и σ^A -фактор этой бактерии (Kulbachinskiy *et al*, 2004; Есюнина & Кульбачинский, 2015). Показано, что стабильность инициаторных комплексов *D. radiodurans* гораздо ниже

стабильности промоторных комплексов РНКП *E. coli*, а холофермент с низкой эффективностью расплетает ДНК в районе старта транскрипции (Kulbachinskiy *et al*, 2004; Varinova *et al*, 2008). Эти особенности связывают со строением как кор-фермента, так и σ^A -субъединицы *D. radiodurans*.

По сравнению с РНКП *E. coli*, РНКП *D. radiodurans* более устойчива к стрептолидигину и менее устойчива к рифампицину (Kulbachinskiy *et al*, 2004). Анализ мутантных вариантов фермента, устойчивых к рифампицину, обнаружил, что такие РНКП образуют ещё менее стабильные инициаторные комплексы (Hua *et al*, 2011).

Геном *D. radiodurans* кодирует как минимум три альтернативные σ -субъединицы. Две из них, Sig1 и Sig2, участвуют в ответе на тепловой шок (Schmid & Lidstrom, 2002). Экспрессия гена *sig1* индуцируется облучением (Liu *et al*, 2003). Исследование транскриптома и протеома мутантов с делецией *sig1* позволило охарактеризовать промоторы, узнаваемые Sig1. Оказалось, что часть этих промоторов сходны с промоторами σ^{70} *E. coli*, а другие – с промоторами σ^W *Bacillus subtilis* (Schmid *et al*, 2005b). Для других σ -факторов *D. radiodurans* такие исследования не проводились.

На стадии элонгации РНКП *D. radiodurans* способна быстрее расщеплять РНК, чем РНКП *E. coli*. Это связано с особенностями строения G-петли (Miropolskaya *et al*, 2017; Пупов *et al*, 2008; Miropolskaya *et al*, 2014). Это свойство может быть полезным для повышения точности транскрипции поврежденной ДНК при стрессе, однако работ, посвященных изучению транскрипции поврежденной ДНК РНКП *D. radiodurans*, не проводилось. Интересно, что в присутствии соответствующих GreA-факторов скорости эндонуклеазной реакции РНКП *E. coli* и *D. radiodurans* выравниваются (Miropolskaya *et al*, 2017). Помимо GreA-фактора в геноме *D. radiodurans* закодированы другие факторы, участвующие в регуляции элонгации транскрипции: белки Gfh1, Gfh2, NusA, Mfd, UvrD, но данные об их транскрипционной активности в литературе отсутствуют.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Бактериальные штаммы, плазмиды, среды

3.1.1. Штаммы

DH5 α (Novagene, USA) (генотип: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rk⁻mk⁺), λ^-) – для выделения плазмидной ДНК.

BL21 (DE3) (Novagene, USA) (генотип: F⁻ ompT hsdSB (r_B⁻m_B⁻) gal dcm D(srl-recA) 306::Tn10 (tetR) (DE3)) – для экспрессии генов, кодирующих Gfh-факторы, Mfd, NusA, σ^A , Sig1 и РНКП *D. radiodurans*, а также Gfh-факторы *D. peraridilitoris*. Данный штамм содержит хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного *lac*-промотора.

Для выделения нативной РНКП *D. radiodurans* использовали штамм *D. radiodurans* R1.

3.1.2. Плазмиды

Плазмидные векторы, использованные в работе:

pET28 gpoABCZ Dra – плаزمида на основе вектора pET28, несущая гены *gpoA*, *gpoB*, *gpoC*, *gpoZ* *D. radiodurans* дикого типа (получена ранее в лаборатории);

pET28 Gfh1 Dra – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh1* *D. radiodurans* дикого типа (получена ранее в лаборатории);

pET28 Gfh1 D3T – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh1* *D. radiodurans* с аминокислотными заменами A43D, N45Y, E46D (получена в данной работе);

pET28 Gfh1 NTCD – плазмида на основе вектора pET28, несущая гибридный ген, составленный из генов *gfh1* *D. radiodurans* и *gfh1* *T. thermophilus* таким образом, что кодируемый белок включает в себя N-концевой домен от Gfh1 *T. thermophilus* (аминокислотные остатки 1-78), а C-концевой домен от *D. radiodurans* (аминокислотные остатки 82-161) (получена в данной работе);

pET28 Gfh1 Ala – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh1* *D. radiodurans* с аминокислотными заменами D44A, E46A, D47A (получена в данной работе);

pET28 Gfh2 Dra – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh2* *D. radiodurans* дикого типа (получена ранее в лаборатории);

pET28 Gfh2 Ala – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh1* *D. radiodurans* с аминокислотными заменами E64A, E66A (получена в данной работе);

pET28 Gfh1 α Dper – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh1 α* *D. peraridilitoris* дикого типа (получена в данной работе);

pET28 Gfh1 β Dper – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh1 β* *D. peraridilitoris* дикого типа (получена в данной работе);

pET28 Gfh2 α Dper – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh2 α* *D. peraridilitoris* дикого типа (получена в данной работе);

pET28 Gfh2 β Dper – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген *gfh2 β* *D. peraridilitoris* дикого типа (получена в данной работе);

pET28 SigA Dra – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген, кодирующий σ^A -субъединицу *D. radiodurans* дикого типа (получена ранее в лаборатории);

pET28 SigA R167C – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген, кодирующий σ^A -субъединицу *D. radiodurans* с заменой R167C (получена в данной работе);

pET28 Sig1 Dra – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген, кодирующий Sig1-субъединицу *D. radiodurans* дикого типа (получена в данной работе);

pET28 Mfd Dra – плазмида на основе вектора pET28, несущая ген, кодирующий транслоказу Mfd *D. radiodurans* дикого типа (получена в данной работе);

pBAD/HisB NusA Dra – плазмида на основе вектора pBAD/HisB, несущая ген, кодирующий белок NusA *D. radiodurans* дикого типа (получена в данной работе);

pGEMT226-146 – содержит фрагмент гена *groB* *E. coli* длиной 500 нт под контролем промотора λP_R (получена ранее в лаборатории);

pJET1.2/blunt GalP1 tR2 – плазмида на основе вектора pJET1.2/blunt из набора «CloneJET PCR Cloning Kit» фирмы Thermo Scientific, содержащая последовательность матрицы для изучения эффективности терминации (получена в данной работе);

pTZ19 T7A1 – плазмида на основе вектора pTZ19, содержащая промотор T7A1 (получена в работе (Nudler et al, 1995)).

3.1.3. Питательные среды и антибиотики

В качестве жидкой питательной среды для *E. coli* использовали среду LB (1% бактотриптона, 1% NaCl, 0.5% дрожжевого экстракта). Для получения твердых сред в нее добавляли 2% агара.

Бактерии *D. radiodurans* выращивали на среде TGY (0.5% триптона, 0.1% глюкозы, 0.3% дрожжевого экстракта).

Для приготовления селективной среды в жидкую среду добавляли антибиотик канамицин до концентрации 50 мкг/мл или ампициллин до концентрации 100 мкг/мл.

Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем индуцибельного *lac*-промотора, в среду добавляли IPTG (изопропил β -D-тиогалактопиранозид).

Для индукции экспрессии гена *lusA*, находящегося под контролем индуцибельного арабинозного промотора, в среду добавляли 0.1% арабинозы.

3.2. Методы работы с ДНК

3.2.1. Электрофоретическое разделение молекул ДНК

Для проведения электрофоретического разделения молекул ДНК разной длины использовали гели с концентрацией агарозы (Panreac) 0.8-1.5% в буфере TBE (0.089 М Трис-борат, pH 7.9, 2 mM ЭДТА). Перед нанесением в пробы добавляли 1/5 объема буфера для нанесения, содержащего 50% глицерина, 0.05 М ЭДТА и краситель бромфеноловый синий. Электрофорез проводили при напряжении 200 В. Для визуализации ДНК в ультрафиолетовом свете в гель добавляли краситель GelRed фирмы Biotium.

3.2.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР обычно проводили в объеме 20 мкл. Препаративную реакцию ставили в объеме 100 мкл (использовали 5 пробирок по 20 мкл). В состав реакционной смеси входил однократный буфер для ДНК-полимеразы соответствующего производителя, 1-10 нг матрицы ДНК, 50 мкМ праймеров, дНТФ в концентрации 200 нМ и 1 – 2 единицы активности ДНК-полимеразы на 100 мкл реакционной смеси. Использовали ДНК-полимеразу iProof (Bio-Rad) или Deep Vent (New England Biolabs). Для подбора оптимальных условий реакции предварительно проводили аналитические ПЦР с разными температурами отжига праймеров. Для амплификации использовали прибор MJ Mini фирмы Bio-Rad.

3.2.3. Очистка ПЦР-продуктов

ПЦР-продукты очищали с помощью реактивов, входящих в набор «PCR purification» фирмы Thermo Scientific в соответствии с рекомендациями производителя.

3.2.4. Рестрикция ДНК

Реакцию рестрикции проводили в объеме 20 – 100 мкл в течение 0.5 – 3 часов при температуре 37°C. Использовались эндонуклеазы рестрикции из набора «Fast Digest» фирмы Thermo Scientific. Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Количество рестрицируемой ДНК в смеси составляло 0.5 мкг в случае аналитической рестрикции и 5-20 мкг в случае препаративной рестрикции.

3.2.5. Выделение ДНК из геля

Для выделения ПЦР-продукта или рестриктного фрагмента из агарозного геля необходимый участок геля вырезали скальпелем под УФ-лампой с длиной волны 354 нм, ДНК выделяли с помощью реактивов, входящих в набор «Gel extraction kit» фирмы Thermo Scientific в соответствии с рекомендациями производителя.

3.2.6. Измерение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК измеряли на приборе Nano Drop 1000 (Thermo Scientific).

3.2.7. Лигирование

Перед лигированием вектор обрабатывали терминальной полинуклеотид-фосфатазой TSAP (Thermo Sensitive Alkaline Phosphatase) Fermentas в 1-кратном TSAP буфере в течение 15 минут при температуре 37°C. Реакцию останавливали прогреванием раствора до 75°C в течение 5 минут.

Лигирование проводили в однократном лигазном буфере New England Biolabs в объеме 15 мкл в течение ночи при +4°C. Для проведения реакции использовали 5 weiss units T4 ДНК-лигазы (NEB), 20-100 нг рестрицированного вектора и в 3 раза больше по количеству вещества рестрицированного ПЦР-продукта для встраивания.

3.2.8. Трансформация

Для трансформации использовалась культура компетентных клеток *E. coli*. Для получения этой культуры 1 колонию со свежей чашки вносили в 100 мл среды и выращивали при 18°C при перемешивании 130 об./мин. до достижения $OD_{600} = 0,45$. Культуру охлаждали во льду в течение 10 минут, а затем центрифугировали 15 минут на центрифуге Eppendorf 5804R при 3,5 тыс.об./мин и температуре 4°C. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 32 мл охлажденного буфера TP (10 mM PIPES pH 6,5, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl) и инкубировали во льду 15 минут. После повторного центрифугирования (15 минут на центрифуге Eppendorf 5804R при 3,5 тыс.об./мин с охлаждением) клетки ресуспендировали в 8 мл буфера TP, добавляли стерильный ДМСО до 10% при постоянном перемешивании и замораживали в жидком азоте. Клетки хранили при -70° С. Компетентность клеток проверяли по количеству выросших колоний после трансформации 1 нг плазмидной ДНК. Для трансформации к 50 мкл культуры компетентных клеток добавляли 10 нг плазмидной ДНК либо 5 мкл смеси после лигирования и инкубировали 30 минут при температуре 0°C. После этого клетки выдерживали 50 секунд при температуре 42°C и переносили в лед на 2 – 5 минут. Затем добавляли 1 мл теплой среды LB и инкубировали 45 минут при 37°C, центрифугировали 10 секунд со скоростью 14 тыс. об./мин. в центрифуге Eppendorf 5424 и сливали супернатант, оставляя около 100 мкл. В этом объеме клетки ресуспендировали и высевали на чашки Петри с твердой питательной средой, содержащей антибиотик, затем чашки помещали в термостат на 37°C на 16 часов. Клетки с выросших колоний переносили стерильной петлей в селективную жидкую среду для наращивания биомассы при 37°C в течение 14-18 часов.

3.2.9. Выделение плазмидной ДНК

Клетки из 4 мл ночной культуры осаждали центрифугированием в течение 1 минуты при скорости 14 тыс. об./мин. в центрифуге 5424 фирмы Eppendorf. Плазмидную ДНК выделяли

с помощью реактивов, входящих в набор фирмы Zymo Research для выделения плазмидной ДНК, в соответствии с рекомендациями производителя.

3.2.10. Секвенирование ДНК

Секвенирование проводилось в ЦКП «Геном» и в компании «Евроген». Пробы готовились в соответствии с рекомендациями фирмы, проводившей секвенирование. Анализ отсеквенированных последовательностей проводили в программе SnapGene.

3.3. Получение матриц для реакций транскрипции *in vitro*

3.3.1. Получение матрицы T7A1cons для исследования инициации транскрипции

Фрагмент длиной 138 пар оснований, содержащий промотор T7A1 cons без последующего терминатора, получали с использованием праймеров T7A1lRI и T7A1rHindIII на матрице pTZ19 T7A1. Реакцию проводили с использованием полимеразы Deep Vent в следующих условиях: плавление – 8 секунд при 95°C, отжиг праймеров – 30 секунд при 57°C, синтез ДНК – 15 секунд при 72°C, 30 циклов амплификации. Продукты ПЦР разделяли в 1% агарозном геле, интересующий фрагмент выделяли из геля (см. методику 3.2.5.).

Нуклеотидные последовательности использованных праймеров:

T7A1lRI 5'-AGTGAATTCTATTTGGATCCAGATCCCGAAAATTTATCAAAAAGAG-3'

T7A1rHindIII 5'-CGAAGCTTCCCCGGTGTGCGATTGGGATGGCTATTCGCCGTGTCCC-3'

Нуклеотидная последовательность матрицы T7A1 cons (указана нематричная цепь ДНК):
5'-CAGTGAATTCTATTTGGATCCAGATCCCGAAAATTTATCAAAAAGAGTAT**TGACT**TAAAGTCTAAC
CTATAGTATAAT**TACAGCCATCGAGAGGGACACGGCGAATAG**-3'
(полужирным шрифтом выделены промоторные элементы, старт транскрипции подчеркнут).

3.3.2. Получение матрицы для исследования скорости элонгации

Плазмиду pGEMT226-146 амплифицировали в клетках штамма GM109, затем выделяли (см. методику 3.2.9) и подвергали рестрикции ферментами EcoR I и Hind III (см. методику 3.2.4). Продукты рестрикции разделяли в 1% агарозном геле, интересующий фрагмент экстрагировали из геля и очищали (см. методику 3.2.5.).

Нуклеотидная последовательность начального участка нематричной цепи ДНК матрицы для исследования скорости элонгации (полная длина составляет около 600 нуклеотидов):
5'-CGTTAAATCTATCACCGCAAGGGATAAATATCTAACACCGTGC**GTGTTGACT**ATTTTACCTCTGGC
GGTGATAATGGTTGCATGTAGTAAGGAGGTTGTATGGAAGACCATCA...-3'
(полужирным шрифтом выделены элементы промотора λPR, лидирующий участок транскрибируемой последовательности, не содержащей C, длиной в 26 нуклеотидов подчеркнут).

3.3.3. Получение матрицы galP1 tR2 для исследования эффективности терминации

Для получения матрицы galP1 tR2 сначала проводили ПЦР полимеразой Deep Vent на матрице ПЦР-продукта galP1 tR2 (любезно предоставлен Л. Минахиным) с использованием

праймера M13, который отжигается с обоих концов матрицы. Реакцию проводили в следующих условиях: плавление – 20 секунд при 95°C, отжиг праймеров – 30 секунд при 69°C, синтез ДНК – 25 секунд при 72°C, 30 циклов амплификации. Очищенный ПЦР-продукт клонировали в плазмиду с помощью набора «CloneJET PCR Cloning Kit» фирмы Thermo Scientific в соответствии с рекомендациями производителя. Плазмидой трансформировали клетки штамма DH5α, затем её выделяли выделяли (см. методику 3.2.9) и использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймеров к плазмиде pJET, входящих в состав набора «CloneJET PCR Cloning Kit».

Последовательность праймера M13:

5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'

Нуклеотидная последовательность матрицы galP1 tR-2 (указана нематричная цепь):

5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGCCGCGCCAGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATTGTAAC
ACGACGGCCAGTGAATTCGCATAAAAAACGGCTAAATTCTTGTGTAAACGATTCCACTAATTTATTCCAT
GTCACACTTTTCGCATCTTTTTTATGCTATAATTATTTCA^{TCGAGAGGGACACGGCGAATAGCCATCCCAA}
TCGACACCGGGGTCCGGGATCTGGATCTGGATCGCTAATAACAGGCGCTGCTGGTAATCGCAGGCC^{TTTTTA}
TTTGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAC^{TGGCCGTCGTTTTACAATCTTTCTAGAAGATCTCCTACA}
ATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTT-3'

(полужирным выделены элементы промотора galP1, подчеркнута точка старта транскрипции, выделены курсивом и подчеркнуты последовательности, образующие терминаторную шпильку).

3.4. ПЦР-мутагенез и клонирование

Гены используемых в работе белков получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы геномные ДНК *D. radiodurans* и *D. peraridilitoris* (препараты геномных ДНК были любезно предоставлены Д. Есюниной). Для получения мутаций в генах Gfh-факторов и σ^A -субъединице РНКП *D. radiodurans* использовали метод сайт-направленного мутагенеза. Полученные гены были клонированы в экспрессионные векторы. Праймеры и стадии клонирования см. в приложении.

3.5. Выделение белков

3.5.1. Белки, использованные в реакциях транскрипции *in vitro*

В реакциях транскрипции *in vitro* использовались препараты следующих белков:

1. рекомбинантный кор-фермент РНКП *D. radiodurans* (получен в данной работе);
2. σ^A -субъединица РНКП *D. radiodurans* (любезно предоставлен Д. Есюниной);
3. нативная РНКП *D. radiodurans*, выделенная из клеток *D. radiodurans* (получен в данной работе);
4. холофермент РНКП *T. thermophilus* (любезно предоставлен Д. Есюниной);

5. σ^A -субъединица РНКП *T. thermophilus* (любезно предоставлен Л. Минахиным);
6. фактор Gfh1 *D. radiodurans* (получен в данной работе);
7. фактор Gfh2 *D. radiodurans* (получен в данной работе);
8. фактор Gfh1D3T – белок Gfh 1 *D. radiodurans* с аминокислотными заменами A43D, N45Y, E46D (получен в данной работе);
9. фактор Gfh1NTCD – гибридный белок Gfh 1 включающий в себя N-концевой домен от Gfh1 *T. thermophilus* и C-концевой домен от Gfh1 *D. radiodurans* (получен в данной работе);
10. фактор Gfh1 Ala – белок Gfh1 *D. radiodurans* с аминокислотными заменами D44A, E46A, D47A (получен в данной работе);
11. фактор Gfh2 Ala – белок Gfh2 *D. radiodurans* с аминокислотными заменами E64A, E66A (получен в данной работе);
12. фактор Gfh1 *T. thermophilus* (любезно предоставлен И. Арцимович);
13. фактор NusA *D. radiodurans* (получен в этой работе);
14. фактор Mfd *D. radiodurans* (получен в этой работе);
15. σ^A -субъединица *D. radiodurans* с аминокислотной заменой R167C (получен в данной работе);
16. Sigma1-субъединица *D. radiodurans* (получен в данной работе);
17. фактор Gfh1 α *D. peraridilitoris* (получен в данной работе);
18. фактор Gfh1 β *D. peraridilitoris* (получен в данной работе);
19. фактор Gfh2 α *D. peraridilitoris* (получен в данной работе);
20. фактор Gfh2 β *D. peraridilitoris* (получен в данной работе).

3.5.2. Электрофорез в денатурирующем геле

Для анализа белков использовалась система денатурирующего диск-электрофореза. Концентрация полиакриламида в концентрирующем геле составляла 4% (соотношение акриламида и метиленбисакриламида 29:1; 0.125 М Трис-HCl, pH 6.8), разделяющий гель (соотношение акриламида и метиленбисакриламида 29:1, 0.375 М Трис-HCl, pH 8.8) имел различную концентрацию в зависимости от анализируемого белкового препарата. В качестве денатурирующего агента гель содержал 0,1% SDS. В состав электродного буфера входили 0.025 М Трис-HCl с pH 8.3, 0.192 М глицина и 0.1% SDS. При приготовлении образцов к ним добавляли равный объем буфера для нанесения (0.25 М Трис-HCl с pH 6.8, 10 % глицерина, 2% SDS, 2 мМ β -меркаптоэтанола и краситель бромфеноловый синий), прогревали 5 минут при 98°C и центрифугировали 1 мин. при 14 тыс. оборотах в минуту. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200 В. Гели окрашивали Кумасси G-250 (0.04% раствор в 3.5% хлорной кислоте): прогревали до кипения, после чего оставляли на 10 минут на качалке. Краситель отмывали горячей водой.

3.5.3. Измерение концентрации белков

Измерение концентрации белков проводили методом Бредфорд. К раствору, содержащему 0,5 - 10 мкг белка, добавляли 1 мл раствора Dye Reagent из набора Bio-Rad Protein Assay (фирмы Bio-Rad) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. После этого измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 595 нм (в качестве контроля использовали смесь без добавления белка). Калибровку делали по раствору с известной концентрацией белка.

3.5.4. Суперпродукция и очистка Gfh-факторов

Для суперпродукции белков Gfh 2 мл ночной культуры клеток штамма *E. coli* BL-21 (DE3), трансформированных плазмидой, несущей соответствующий ген, засекали в 500 мл теплой жидкой среды с добавлением канамицина и инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании (220 об./мин.) до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,6$. После этого добавляли IPTG до концентрации 1 мМ и инкубировали в течение ещё двух часов в тех же условиях. Клетки осаждали центрифугированием в центрифуге K-70 с охлаждением в течение 20 минут, при скорости 3500 об./мин., затем осадок замораживали.

Осадок клеток, полученный из 500 мл культуры, ресуспендировали в 20 мл буфера для лизиса (50 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 233 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 0,2% Tween-20, 1 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 мг/мл лизоцим и 0,1 мМ PMSF), оставляли на 30 минут во льду. Лизат подвергали обработке ультразвуком (суммарное время 7 минут в режиме 2 секунды импульс, 9 секунд пауза, 75% мощности) на приборе фирмы Sonics&Materials Inc. (400 W). Затем лизат центрифугировали 10 минут при скорости 14000 об./мин. в центрифуге K-24, супернатант повторно центрифугировали при таких же условиях. К полученному супернатанту добавляли 5% раствор Polymix P (полиэтиленимин) до конечной концентрации 0,15% при постоянном перемешивании. Оставляли пробы во льду на 15 минут для формирования осадка, затем центрифугировали 20 минут при скорости 12000 об./мин. в центрифуге K-24. К супернатанту добавляли сульфат аммония до концентрации 35 г на 100 мл, перемешивали при +4°C в течение 40 минут. Образовавшуюся суспензию центрифугировали 25 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24, осадок ресуспендировали в 15 мл буфера для никелевой хроматографии (10 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 500 мМ NaCl). Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка Millex Syringe Filters with Durapore PVDF Membrane (Merk) и наносили на колонку HisTrap HP (GE Healthcare) объемом 1 мл, заряженную ионами Ni^{2+} и уравновешенную Ni-буфером без имидазола. Для проведения хроматографии использовали прибор FPLC фирмы GE Healthcare. После нанесения препарата на колонку её промывали Ni-буфером, содержащим 35 мМ имидазола. Белки Gfh элюировали Ni-буфером, содержащим 300 мМ имидазола. Собирали

фракции по 1 мл. Фракции, обогащенные белком Gfh, объединяли и диализовали в течение ночи при +4°C против буфера для диализа (40 mM Трис-HCl, pH 7,9, 300 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 5% глицерин). Белок концентрировали ультрафильтрацией на устройстве Centricon-10 (Amicon), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 mM и хранили при -20°C.

3.5.5. Суперпродукция и очистка рекомбинантной РНКП *D. radiodurans*

Для суперпродукции РНКП *D. radiodurans* 1 мл ночной культуры клеток штамма BL-21 (DE3), трансформированных плазмидой pET28 groABCZ Dra, кодирующей все субъединицы РНКП *D. radiodurans*, засеивали в 1 л теплой жидкой среды с добавлением канамицина и 0.1 mM IPTG. Выращивали при 30°C при постоянном перемешивании 220 об./мин. в течение ночи до достижения максимальной оптической плотности. Клетки осаждали центрифугированием в центрифуге K-70 с охлаждением в течение 20 минут, при скорости 3500 об./мин., затем осадок замораживали.

Осадок клеток, полученный из 1 л культуры, тщательно ресуспендировали в 30 мл буфера для лизиса (50 mM Трис-HCl, pH 7,9, 233 mM NaCl, 2 mM ЭДТА, 5% глицерин, 0,2% Tween-20, 1 mM β -меркаптоэтанол, 0,2 мг/мл лизоцим и 0.1 mM PMSF), оставляли на 30 минут во льду. Затем проводили обработку ультразвуком (суммарное время 7 минут в режиме 2 с импульс, 9 с пауза, 75% мощности) на приборе фирмы Sonics&Materials Inc. (400 W). Лизат, обработанный ультразвуком, центрифугировали 10 минут при скорости 14000 об./мин. в центрифуге K-24, супернатант повторно центрифугировали при таких же условиях. К полученному супернатанту добавляли 5% раствор Polymix P до конечной концентрации 0.6% при постоянном перемешивании. Оставляли пробы во льду на 15 минут для формирования осадка, после чего центрифугировали 10 минут при 12000 об./мин. в центрифуге K-24. Полученный осадок ресуспендировали для промывки в 12 мл буфера TGED (10 mM Трис-HCl, pH 7.9, 0,1 mM ЭДТА, 0,1 mM ДТТ, 5% глицерин), содержащего 0,3 M NaCl с использованием гомогенизатора Поттера, снова центрифугировали в таких же условиях. Полученный осадок ресуспендировали для элюции РНКП тем же способом в 12 мл буфера TGED, содержащего 1 M NaCl, центрифугировали 15 минут при скорости 12000 об./мин., к супернатанту добавляли сульфат аммония из расчета 35 г на 100 мл, перемешивали при +4°C в течение 30. Образовавшуюся суспензию центрифугировали 20 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24, осадок ресуспендировали в 10 мл буфера TGED, не содержащего NaCl, раствор центрифугировали 15 минут при 15000 тыс.об./мин. для удаления нерастворившихся частиц. К супернатанту добавляли буфер TGED без NaCl до объема 15 мл. Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку с гепарин-сефарозой HiTrap Heparin HP (GE Healthcare, объем колонки 5 мл), уравновешенную буфером для гепариновой хроматографии (20 mM Трис-HCl, pH 7,9,

100 mM NaCl, 5% глицерин), содержащим 100 mM NaCl. При проведении хроматографии был использован прибор для FPLC фирмы Pharmacia. Колонку промывали буфером для гепариновой хроматографии, содержащим 350 mM NaCl, до полного прохождения пика оптической плотности. РНКП элюировали буфером, содержащим 450 mM NaCl. Колонку промывали буфером, содержащим 600 mM NaCl. Затем раствор, содержащий РНКП *D. radiodurans*, наносили на колонку HisTrap HP (GE Healthcare) объемом 5 мл, заряженную ионами Ni^{2+} . Колонку промывали Ni-буфером (10 mM Трис-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl), содержащим 20 mM имидазола, до полного прохождения пика, оптической плотности при длине волны 280 нм. РНКП элюировали Ni-буфером, содержащим 100 mM имидазола. С появлением пика оптической плотности начинали собирать фракции по 1 мл. Фракции, обогащенные РНКП, объединяли и подвергали процедуре диализа в течение ночи при +4°C против буфера для диализа (состав буфера см. в разделе 3.5.4). Белок концентрировали ультрафильтрацией на устройстве Centricon-50 (Amicon). Затем добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 mM и хранили при -20°C.

3.5.6. Выделение РНКП из клеток *D. radiodurans*

2 мл ночной культуры клеток *D. radiodurans* штамма R1 засевали в 500 мл теплой жидкой среды TGY и инкубировали при 30°C при постоянном перемешивании (200 об./мин.) до достижения $\text{OD}_{600} = 0,2$. Клетки осаждали центрифугированием в центрифуге K-70 в течение 20 минут, при скорости 3500 об./мин., затем осадок замораживали.

Осадок клеток, полученный из 20 л культуры (около 8 г), ресуспендировали в 50 мл буфера для промывки (50 mM Трис-HCl, pH 7,9, 5 mM ЭДТА), затем центрифугировали в течение 15 минут при скорости 5000 об./мин. в центрифуге Eppendorf 5804 R при 4°C, сливали супернатант. Затем к осадку добавляли лизирующий буфер (50 mM Трис-HCl, 200 mM NaCl pH 7,9, 5 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 2,8 мг/мл лизоцим) из расчета 5 мл на 1 г осадка и инкубировали во льду в течение 30 минут. После этого смесь замораживали в жидком азоте и оставляли на несколько минут в воде при комнатной температуре. Процесс замораживания-оттаивания повторяли дважды. Затем на каждые 5 мл суспензии добавляли по 30 мкл PMSF (23 мг/мл), Triton X-100 (100 %) и дезоксихолата натрия (4%), инкубировали 30 минут во льду. Затем клетки подвергали разрушению на мельнице Mixer Mill MM 400 фирмы Retsch. Для этого смесь замораживали добавлением по каплям в стакан, заполненный жидким азотом. Замороженную субстанцию пересыпали в охлажденные в жидком азоте стаканы с шариками, идущими в комплекте к прибору. Стаканы закрепляли в приборе и запускали его на частоте 30 Гц на 12 секунд 8 раз. В промежутках между запусками стаканы извлекали и вновь охлаждали в жидком азоте. После этого лизат инкубировали в течение 30-40 минут при комнатной температуре. Оттаявший лизат дважды центрифугировали по 15

минут при скорости 14000 об./мин. в центрифуге К-24 и избавлялись от осадка. К полученному супернатанту добавляли 5% раствор Polymin P до конечной концентрации 0,6% при постоянном перемешивании. Оставляли пробы во льду на 15 минут для формирования осадка, после чего центрифугировали 10 минут при 12000 об./мин. в центрифуге К-24. Полученный осадок ресуспендировали для промывки в 12 мл буфера TGED (10 mM Трис-HCl, pH 7,9, 0,1 mM ЭДТА, 0,1 mM ДТТ, 5% глицерин), содержащего 0,3 M NaCl с использованием гомогенизатора Поттера, снова центрифугировали в таких же условиях. Полученный осадок вновь ресуспендировали для промывки РНКП тем же способом в 12 мл буфера TGED, содержащего 0,4 M NaCl, центрифугировали 15 минут при скорости 12000 об./мин. в центрифуге К-24. Осадок ресуспендировали для элюции РНКП тем же способом в 10 мл буфера TGED, содержащего 1 M NaCl, центрифугировали в тех же условиях. К супернатанту добавляли сульфат аммония из расчета 35 г на 100 мл, перемешивали при +4°C в течение 30 минут. Образовавшуюся суспензию центрифугировали 20 минут при 14000 об./мин. в центрифуге К-24, осадок ресуспендировали в 10 мл буфера TGED, не содержащего NaCl. Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку с гепарин-сефарозой (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare, объем колонки 1 мл), уравновешенную буфером В (20 mM Трис-HCl, pH 7,9, 100 mM NaCl, 5% глицерин), содержащим 100 mM NaCl. Колонку промывали 10 мл буфера В, содержащего 300 mM NaCl. РНКП элюировали 10 мл буфера В, содержащего 600 mM NaCl. Элюат фракционировали по 1 мл. Фракции, содержащие РНКП, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией на устройстве Centricon-50 (Amicon), а затем разводили буфером TGED таким образом, чтобы конечная концентрация NaCl составила 200 mM. Раствор центрифугировали 18 минут при 13000 об./мин. в центрифуге Eppendorf 5415 при 4°C, отбрасывали осадок. Объем супернатанта доводили до 5 мл буфером Е (40 mM Трис-HCl, pH 7,9, 5% глицерин, 1 mM ЭДТА, 0,1 mM ДТТ) и наносили на колонку Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare, объем колонки 1 мл), уравновешенную буфером Е. Колонку промывали 5 мл буфера Е, РНКП элюировали градиентом от буфера Е к буферу F (40 mM Трис-HCl, pH 7,9, 5% глицерин, 1 mM ЭДТА, 0,1 mM ДТТ, 600 mM NaCl) со скоростью 0,5 мл/мин по следующей программе: 0-25% (3 мл), 25-50% (13 мл), 50-72% (27 мл), 72-83% (4 мл), 83-100% (1 мл), 100-100% (13 мин), и собирали фракции по 1 мл, используя коллектор фракций. Фракции, содержащие наибольшее количество РНКП, объединяли и концентрировали с помощью устройства Centricon-50 (Amicon), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 mM и хранили при -20°C.

3.5.7. Суперпродукция и очистка белка Mfd *D. radiodurans*

Для суперпродукции Mfd *D. radiodurans* 1 мл ночной культуры клеток штамма BL-21 (DE3), трансформированных плазмидой pET28 Mfd Dra, засеивали в 1 л теплой жидкой среды

с добавлением канамицина и выращивали при 30 °C при постоянном перемешивании 220 об./мин. в течение нескольких часов до достижения $OD_{600} = 0,5$. Далее колбы переносили на температуру 16 °C и добавляли IPTG до 0,2 мМ. Клетки выращивали при этой температуре и постоянном перемешивании 220 об./мин. в течение 16 часов. Затем клетки осаждали центрифугированием в центрифуге K-70 в течение 20 минут, при скорости 3500 об./мин., затем осадок замораживали.

Осадок клеток, полученный из 1 л культуры, тщательно ресуспендировали в 30 мл буфера для лизиса (40 мМ трис-HCl pH 8,0, 500 мМ NaCl, 5% глицерин, 0,1 мМ ДТТ, 0,1 мМ PMSF). Затем проводили обработку ультразвуком (суммарное время 7 минут в режиме 2 с импульс, 9 с пауза, 75% мощности) на приборе фирмы Sonics&Materials Inc. (400 W). Лизат, обработанный ультразвуком, центрифугировали 10 минут при скорости 14000 об./мин. в центрифуге K-24, супернатант повторно центрифугировали при таких же условиях. Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку HisTrap HP (GE Healthcare) объемом 1 мл, заряженную ионами Ni^{2+} и уравновешенную буфером без имидазола. После нанесения препарата на колонку в буфере с 10 мМ имидазола её промывали Ni-буфером, содержащим 40 мМ имидазола. Белок Mfd элюировали Ni-буфером, содержащим 100 мМ имидазола. Собирали фракции по 1 мл. Фракции, обогащенные белком Mfd, объединяли и диализовали в течение ночи при +4°C против буфера для диализа (40 мМ трис-HCl pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ ДТТ, 5% глицерин). Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare, объем колонки 1 мл), уравновешенную буфером (100 мМ NaCl, 40 мМ Трис-HCl pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ и 5% глицерин). После нанесения колонку промывали буфером, содержащим 100 мМ NaCl, а затем белки элюировали градиентом концентрации NaCl. Белок Mfd элюировался с колонки при концентрации NaCl ~250 мМ. Фракции, обогащенные Mfd, концентрировали ультрафильтрацией на устройстве Centricon-100 (Amicon), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 мМ и хранили при -20°C.

3.5.8. Суперпродукция и очистка белка NusA *D. radiodurans*

Для суперпродукции NusA *D. radiodurans* 1 мл ночной культуры клеток штамма BL-21 (DE3), трансформированных плазмидой pBAD/HisB NusA Dra, засекали в 1 л теплой жидкой среды с добавлением ампициллина и выращивали при 30 °C при постоянном перемешивании 220 об./мин. в течение нескольких часов до достижения $OD_{600} = 0,5$. Далее колбы переносили на температуру 16 °C и добавляли арабинозу до концентрации 0,1%. Клетки выращивали при этой температуре и постоянном перемешивании 220 об./мин. в течение 16 часов. Затем клетки осаждали центрифугированием в центрифуге K-70 в течение 20 минут, при скорости 3500 об./мин., затем осадок замораживали.

Осадок клеток, полученный из 1 л культуры, тщательно ресуспендировали в 30 мл буфера для лизиса (50 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 233 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 0,2% Tween-20, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 мг/мл лизоцим (0,2 мг/мл) и 0,1 мМ PMSF), оставляли на 30 минут при температуре 0°C. Затем проводили обработку ультразвуком (суммарное время 7 минут в режиме 2 с импульс, 9 с пауза, 75% мощности) на приборе фирмы Sonics&Materials Inc. (400 W). Лизат, обработанный ультразвуком, центрифугировали 10 минут при скорости 14000 об./мин. в центрифуге K-24, супернатант повторно центрифугировали при таких же условиях. К полученному супернатанту добавляли 5% раствор Polymix P до конечной концентрации 0,2% при постоянном перемешивании. Оставляли пробы во льду на 15 минут для формирования осадка, после чего центрифугировали 10 минут при 12000 об./мин. в центрифуге K-24. Полученный осадок ресуспендировали в 12 мл буфера TGED (10 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ, 5% глицерин), содержащего 1 М NaCl, с использованием гомогенизатора Поттера, снова центрифугировали в таких же условиях, к супернатанту добавляли сульфат аммония из расчета 35 г на 100 мл, перемешивали при +4°C в течение 30 минут. Образовавшуюся суспензию центрифугировали 20 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24, осадок ресуспендировали в 20 мл буфера для никелевой хроматографии (10 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазол). Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку HisTrap HP (GE Healthcare, 1 мл), заряженную ионами Ni²⁺ и уравновешенную буфером с 10 мМ имидазола. После нанесения препарата на колонку её промывали Ni-буфером, содержащим 40 мМ имидазола. Белок NusA элюировали Ni-буфером, содержащим 100 мМ имидазола. Собирали фракции по 1 мл. Фракции, обогащенные белком NusA, объединяли и диализовали в течение ночи при +4°C против буфера для диализа (200 мМ NaCl, 40 мМ Трис-HCl pH 7,9, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ и 5% глицерин). Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку для гель-фильтрации Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare). Фракции, обогащенные NusA, концентрировали ультрафильтрацией на устройстве Centricon-50 (Amicon), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 мМ и хранили при -20°C.

3.5.9. Суперпродукция и очистка белка σA R167C *D. radiodurans*

2 мл ночной культуры клеток штамма BL-21 (DE3), трансформированных плазмидой pET28 SigA R167C, засеивали в 300 мл теплой жидкой среды с канамицином и выращивали при 37°C и постоянном перемешивании 220 об./мин. до достижения OD₆₀₀ = 0,6. После этого добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ и выращивали клетки в течение еще 6 часов в таких же условиях. Клетки осаждали центрифугированием в центрифуге K-70 в течение 20 минут, при 3500 об./мин., затем осадок замораживали.

Осадок клеток ресуспендировали в 15 мл лизирующего буфера (50 мМ Трис-НCl, pH 7,9, 300 мМ KCl, 10 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 0,2% Tween-20, 1 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 мг/мл лизоцим и 0,1 мМ PMSF), оставляли на 20 минут в ледяной бане. Затем проводили обработку ультразвуком (суммарное время 7 минут в режиме 2 с импульс, 9 с пауза, 75% мощности) на приборе фирмы Sonics&Materials Inc. (400 W). Полученный лизат центрифугировали 15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24, супернатант отбрасывали, осадок повторно ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса, инкубировали 20 минут во льду, также обрабатывали ультразвуком и центрифугировали. Данную процедуру повторяли еще раз. Полученный после последнего центрифугирования осадок растворяли в течение 60 минут при постоянном перемешивании в 10 мл денатурирующего буфера (50 мМ трис-НCl, pH 7,9, 6 М гуанидин, 1 мМ ЭДТА, 10% глицерин, 1 мМ ДТТ, 10 мМ $MgCl_2$) до полного растворения. Нерастворившиеся белки удаляли центрифугированием 15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24. Супернатант подвергали диализу в реконструирующем буфере (30 мМ трис-НCl, pH 7,9, 300 мМ KCl, 0,05 мМ ЭДТА, 10% глицерин, 0,25 мМ ДТТ, 10 мМ $MgCl_2$). Образовавшийся хлопьевидный осадок удаляли от ренатурированных белков центрифугированием 15 минут при 15000 об./мин. в центрифуге K-24. Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку HisTrap HP GE Healthcare объемом 1 мл, заряженную ионами Ni^{2+} и уравновешенную буфером без имидазола. После нанесения препарата на колонку в буфере с 10 мМ имидазола её промывали Ni-буфером, содержащим 40 мМ имидазола. Белок элюировали Ni-буфером, содержащим 100 мМ имидазола. Собирали фракции по 1 мл. Фракции, обогащенные белком σ^A R167C, объединяли и диализовали в течение ночи при +4°C против буфера для диализа (200 мМ NaCl, 40 мМ Трис-НCl pH 7,9, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ и 5% глицерин), затем концентрировали ультрафильтрацией (Centricon-30, Amicon), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 мМ и хранили при -20°C.

3.5.10. Суперпродукция и очистка белка Sig1 *D. radiodurans*

2 мл ночной культуры клеток штамма BL-21 (DE3), трансформированных плазмидой pET28 Sig1 Dra, засеивали в 500 мл теплой жидкой среды с добавлением канамицина и инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании (220 об./мин.) до достижения $OD_{600} = 0,5$. После этого добавляли IPTG до концентрации 0,15 мМ и инкубировали в течение ещё пяти часов при температуре 25 °C. Клетки осаждали центрифугированием в центрифуге K-70 в течение 20 минут, при скорости 3500 об./мин., затем осадок замораживали.

Осадок клеток, полученный из 500 мл культуры, ресуспендировали в 20 мл буфера для лизиса (50 мМ Трис-НCl, pH 7,9, 233 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 0,2% Tween-20, 1 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 мг/мл лизоцим и 0,1 мМ PMSF), оставляли на 30 минут при 0°C.

Лизат подвергали обработке ультразвуком (суммарное время 7 минут в режиме 2 секунды импульс, 9 секунд пауза, 75% мощности) на приборе фирмы Sonics&Materials Inc. (400 W). Затем лизат центрифугировали 10 минут при скорости 14000 об./мин. в центрифуге К-24, супернатант повторно центрифугировали при таких же условиях. К полученному супернатанту добавляли 5% раствор Polymin P до конечной концентрации 0,15% при постоянном перемешивании. Оставляли пробы во льду на 15 минут для формирования осадка, затем центрифугировали 20 минут при скорости 12000 об./мин. в центрифуге К-24. К супернатанту добавляли сульфат аммония до концентрации 35 г на 100 мл, перемешивали при +4°C в течение 40 минут. Образовавшуюся суспензию центрифугировали 25 минут при 15000 об./мин. в центрифуге К-24, осадок ресуспендировали в 15 мл буфера для никелевой хроматографии (10 мМ Трис-НCl, pH 7,9, 500 мМ NaCl). Раствор фильтровали через 0,22 мкм фильтры с низкой адгезией белка и наносили на колонку HisTrap HP GE Healthcare объемом 1 мл, заряженную ионами Ni²⁺ и уравновешенную буфером без имидазола. Для проведения хроматографии использовали прибор FPLC фирмы GE Healthcare. После нанесения препарата на колонку её промывали Ni-буфером, содержащим 20 мМ имидазола. Белок элюировали Ni-буфером, содержащим 200 мМ имидазола. Собирали фракции по 1 мл. Фракции, обогащенные белком Sig1, объединяли и диализовали в течение ночи при +4°C против буфера для диализа (40 мМ Трис-НCl, pH 7,9, 300 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 5% глицерин). Белок концентрировали ультрафильтрацией на колонке Centricon-30 (Amicon), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 мМ и хранили при -20°C.

3.6. Транскрипция *in vitro*

3.6.1. Электрофорез нуклеиновых кислот в денатурирующем геле

Анализ РНК-продуктов в экспериментах по транскрипции *in vitro* проводили методом электрофореза в однократном буфере TBE (0,089 М Трис-борат, pH 7,9, 2 мМ ЭДТА) в денатурирующих ПААГ различного состава (в скобках указано соотношение акриламида и метиленабисакриламида, в процентах указана их суммарная концентрация):

- 10% (19:1), 7 М мочевины;
- 15% (29:1.5), 7 М мочевины;
- 23% (20:3), 7 М мочевины;
- 30% (13:2), 5,3 М мочевины.

После приготовления растворов их фильтровали через 0,45 мкм фильтры Dugapore фирмы Millipore и хранили при комнатной температуре. При заливке геля к раствору добавляли персульфат аммония (12 мкл на 1 мл раствора) и TEMED (1,2 мкл на 1 мл раствора).

3.6.2. Буферы, использованные для проведения реакций транскрипции *in vitro*

Реакции транскрипции *in vitro* проводили в буферных растворах с различными pH на основе Трис-HCl (ТВ) и PIPES-NaOH (РВ). В буферные растворы добавляли $MgCl_2$ или $MnCl_2$ до концентрации 10 мМ. Ниже представлен список использованных буферных растворов; в зависимости от присутствующего каталитического иона буферы обозначены «+Mg» или «+Mn»:

РВ 40 (40 мМ PIPES-NaOH, 40 мМ KCl) с pH 6.1, 6.5, 7.0.

РВ 40 «+Mg» (40 мМ PIPES-NaOH, 10 мМ $MgCl_2$, 40 мМ KCl) с pH 6.1, 6.5, 7.0.

РВ 40 «+Mn» (40 мМ PIPES-NaOH, 10 мМ $MnCl_2$, 40 мМ KCl) с pH 6.5.

ТВ 40 (40 мМ Трис-HCl, 40 мМ KCl) с pH 7.5, 7.9, 8.5, 8.9.

ТВ 40 «+Mg» (40 мМ Трис-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 40 мМ KCl) с pH 7.5, 7.9, 8.5, 8.9.

ТВ 40 «+Mn» (40 мМ Трис-HCl, 10 мМ $MnCl_2$, 40 мМ KCl) с pH 7.9.

Все буферы, кроме ТВ 40 «+Mn», хранили на +4°C. ТВ 40 «+Mn» каждый раз готовили заново, поскольку при высоких pH ионы Mn^{2+} образуют нерастворимый оксид.

3.6.3. Тест по определению эффективности синтеза коротких РНК на стадии инициации транскрипции

Для определения зависимости эффективности абортного синтеза от присутствия Gfh-факторов при разных pH реакцию проводили в транскрипционных буферах РВ 40 «+Mg» с pH 6.1, 6.5, 7.0 и ТВ 40 «+Mg» с pH 7.5, 7.9, 8.5, 8.9. Для опытов по раститровке двухвалентных ионов использовали буфер ТВ 40 «-Me» pH 7.9, в который добавляли $MgCl_2$ или $MnCl_2$ в необходимой концентрации. В транскрипционный буфер добавляли корфермент (50 нМ), σ -субъединицу (250 нМ), матрицу, содержащую промотор (20 нМ) и инкубировали 3 минуты при 37°C в случае РНКП *D. radiodurans* и 50 °C в случае РНКП *T. thermophilus*. После этого в смесь вносили Gfh до концентрации 5 мкМ и инкубировали ещё 2 минуты при той же температуре. В контрольную смесь вместо Gfh добавляли аналогичный объем буфера, в котором хранятся Gfh-факторы (20 мМ Трис-HCl, pH 7,9, 150 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 50% глицерин). Транскрипцию запускали добавлением затравки CpA до концентрации 20 мкМ и 2,5 мкКи α -[^{32}P]-УТР. Реакцию проводили в течение 5 минут при температуре 37°C в случае РНКП *D. radiodurans* и 50 °C в случае РНКП *T. thermophilus* и останавливали добавлением равного объема стоп-буфера (8 М мочевины, 100 мМ ЭДТА, 2хТВЕ, красители ксилен цианоловый и бромфеноловый синий). РНК-продукты анализировали на 23% денатурирующем ПААГ, детекцию проводили при помощи фосфоимиджера Typhoon FLA 9500 фирмы GE Healthcare Life Sciences. Относительное содержание радиоактивно меченого полноразмерного продукта длиной 3 нуклеотида на радиоавтограммах в каждом опыте определяли в программе ImageQuant по интенсивности

излучения соответствующей полосы на автордиограмме. Для расчета воздействия условий опыта на эффективность abortивного синтеза находили отношение количества продукта в опытной дорожке к тому же показателю в контрольной дорожке.

3.6.4. Измерение кинетических характеристик синтеза коротких РНК в зависимости от присутствия Gfh-факторов

Для выявления влияния факторов Gfh на кажущиеся константы Михаэлиса ($K_{M,app}$) для субстратов при синтезе коротких РНК в промоторных комплексах проводили два типа реакций: АТР+УТР, СрА+УТР. В каждом случае один из субстратов присутствовал в реакции в избытке, а концентрацию другого варьировали. В четырех экспериментальных системах субстратами служили:

1. АТР (1 мМ) в смеси с γ -[^{32}P]-АТР (3000 Ки/мМ) и УТР в различных концентрациях (3, 10, 20, 40, 100, 200, 400, 1000, 3000 мкМ);
2. УТР (1 мМ) в смеси с α -[^{32}P]-УТР (3000 Ки/мМ) и АТР в различных концентрациях (50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500, 2000, 3000, 6000 мкМ);
3. СрА (100 мкМ) и УТР в смеси с α -[^{32}P]-УТР (3000 Ки/мМ). УТР, смешанный с α -[^{32}P]-УТР, добавляли в различных концентрациях (0,06, 0,02, 0,6 2, 6, 20, 40, 100, 200 мкМ);
4. УТР (1 мМ) в смеси с α -[^{32}P]-УТР (3000 Ки/мМ) и СрА в различных концентрациях (3, 10, 30, 100, 300, 600 мкМ).

В транскрипционный буфер РВ 40 «+Mg» рН 6.5 вносили кор-фермент (50 нМ) и σ -субъединицу (250 нМ) РНКП, матрицу, содержащую промотор T7A1 cons (20 нМ), и один из субстратов в высокой концентрации, инкубировали 3 минуты при 37°C. После этого в смесь добавляли Gfh до концентрации 5 мкМ и инкубировали ещё 2 минуты при температуре 37°C. В контрольную смесь вместо Gfh добавляли аналогичный объем буфера для хранения белков. Транскрипцию запускали добавлением определенной концентрации второго субстрата, для которого и измеряли K_{Mapp} . Для этого в аналогичные реакционные смеси вносили разное количество этого субстрата. Реакция протекала 15 минут при 37°C, после чего её останавливали добавлением равного объема стоп-буфера. Тринуклеотидные радиоактивно меченые РНК-продукты анализировали в 23%, а динуклеотидные – в 30% денатурирующем ПААГ, детекцию проводили при помощи фосфоимиджера. Относительное содержание радиоактивно меченого продукта интересующей длины в каждом опыте определяли в программе ImageQuant по интенсивности излучения соответствующей полосы на автордиограмме. Затем в программе GraFit (Eritacus Software) находили численное значение $K_{M,app}$ с помощью аппроксимации данных по уравнению:

$V = V_{\text{макс}} \times C / (K_{\text{M,app}} + C)$, где V – скорость синтеза при данной концентрации субстратов, $V_{\text{макс}}$ – максимальное значение скорости, $K_{\text{M,app}}$ – кажущаяся константа Михаэлиса, C – концентрация субстрата.

3.6.5. Тест по определению влияния Gfh-факторов на скорость образования полноразмерного продукта в реакции синтеза РНК

Реакцию проводили в буферах ТВ 40 «+Mg» pH 7.9 и ТВ 40 «+Mn» pH 7.9.

Для получения холофермента РНКП кор-фермент (30 нМ) и σ -субъединицу (200 нМ) смешивали в транскрипционном буфере, добавляли матрицу для измерения скорости элонгации и инкубировали 5 минут при 37°C в случае РНКП *D. radiodurans* и 50 °C в случае РНКП *T. thermophilus*. Транскрипционные комплексы, остановленные в +26 положении от λ Pr-промотора, получали, добавляя к промоторным комплексам ограниченный набор субстратов (25 мкМ праймера ApU, 25 мкМ АТР и GTP, 2,5 мкКи α -[³²P]-УТР). Транскрипцию проводили в течение 5 минут при той же температуре, что и сборку холофермента. После этого в смесь вносили Gfh до концентрации 5 мкМ и инкубировали ещё 2 минуты при той же температуре. Далее транскрипционные комплексы, остановленные в +26 положении, переносили на 20°C в случае РНКП *D. radiodurans* и оставляли на 50°C в случае РНКП *T. thermophilus*. Отбирали «нулевую точку», после чего добавляли все нуклеозидтрифосфаты до концентрации 200 мкМ и гепарин (15 мкг/мл) для предотвращения повторной инициации. Транскрипцию останавливали добавлением равного объема стоп-буфера через определенные промежутки времени. РНК-продукты разделяли в 10% денатурирующем ПААГ, детекцию проводили при помощи фосфоимиджера.

3.6.6. Получение искусственных элонгационных комплексов для исследования расщепления РНК

Последовательности ДНК- и РНК-олигонуклеотидов, использованных для получения искусственных элонгационных комплексов (ИЭК):

РНК: 5'-AAUAAUCGACGAGGGA-3'

Матричная цепь ДНК: 5'-TGGCTATTCGCCGTGGCCCTCTCGATGGTCGTAAGT-3'

Нематричная цепь ДНК: 5'-ACTTACAGCCATCGAGAGGGCCACGGCGAATAGCCA-3'

РНК (в конечной концентрации 3,5 мкМ) радиоактивно метили по 5'-концу с помощью Т4 полинуклеотид-киназы (10 е.а., New England Biolabs) и γ -[³²P]-АТР (3000 Ки/мМ) в Т4 полинуклеотид-киназном буфере. Реакцию проводили 30 минут при 37°C, затем фермент инактивировали прогреванием при 65°C в течение 15 минут. Меченую РНК в конечной концентрации 0,6 мкМ смешивали с матричной ДНК (концентрация матричной ДНК в пробе – 1,7 мкМ) в транскрипционном буфере ТВ 40 pH 7,9, не содержащем ионов двухвалентных металлов, в присутствии 10 мМ ЭДТА. Раствор помещали в водяную баню с начальной температурой 65°C и медленно охлаждали до комнатной температуры со скоростью 1°C в

минуту. Полученный гибрид хранили при -20°C. Для дальнейшей сборки элонгационного комплекса гибрид РНК-ДНК инкубировали с кор-ферментом РНКП (конечная концентрация РНК-ДНК гибрида 10 нМ, кор-фермента 100 нМ) при 30°C в течение 15 минут в буфере РВ 40 «-Ме» рН 6,5 или ТВ 40 «-Ме» рН 7,9, не содержащем ионов двухвалентных металлов (концентрация ЭДТА в реакционном буфере составляла 167 мкМ). Затем добавляли нематричную цепь ДНК (до конечной концентрации 2 мкМ) и инкубировали еще 20 минут при 30°C. Собранный элонгационный комплекс помещали в термостат с нужной температурой для проведения реакции расщепления.

3.6.7. Тест по определению зависимости эндонуклеазной активности РНКП от Gre-подобных факторов

Для определения зависимости эндонуклеазной активности РНКП *D. radiodurans* от присутствия GreA и Gfh-факторов реакцию проводили при рН 6,5 и температуре 20°C, а также при рН 7,9 и температуре 37°C. К препарату элонгационного комплекса (см. методику 3.6.6) добавляли Gfh-факторы до концентрации 5 мкМ и/или GreA до концентрации 1 мкМ. Из полученного раствора отбирали аликвоту и смешивали с равным объемом стоп-буфера для получения контрольной пробы («0» точка без расщепления РНК). Затем к оставшейся смеси добавляли MgCl₂ до концентрации 10 мМ. После этого через различные промежутки времени отбирали аликвоты и смешивали их с равным объемом стоп-буфера. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 23% ПААГ и детектировали при помощи фосфоимиджера. Авторадиограммы обрабатывали в программе ImageQuant. Содержание укороченной цепи радиоактивно меченой РНК количественно выражали через отношение интенсивности полосы, содержащей укороченный 13-тинуклеотидный продукт, к общей сумме интенсивностей полос укороченного и исходного РНК-продуктов (15 нуклеотидов) на данной дорожке. Полученные значения количества укороченной РНК-цепи были пронормированы относительно максимальных значений в каждом опыте. Далее в программе GraFit вычисляли значение кажущейся кинетической константы реакции первого порядка согласно кинетическому уравнению реакции первого порядка:

[количество укороченной РНК-цепи] = $A \times (1 - \exp(-k_{obs} \times t))$, где A – максимальное количество укороченной РНК-цепи, k_{obs} – кажущаяся кинетическая константа реакции первого порядка, t – время реакции.

3.6.8. Измерение времени полужизни *his*-паузы

Для получения холофермента РНКП кор-фермент *D. radiodurans* (30 нМ) и σ -субъединицу (200 нМ) смешивали в транскрипционном буфере, добавляли матрицу для измерения паузы (*hisP*- λ PR – предоставлена в лаборатории) и инкубировали 5 минут при 37°C. Транскрипционные комплексы, остановленные в +26 положении от λ Pr-промотора,

получали, добавляя к промоторным комплексам ограниченный набор субстратов (25 мкМ праймера ApU, 25 мкМ АТР и ГТР, 2.5 мкКи α -[32 P]-УТР). Транскрипцию проводили в течение 5 минут при той же температуре. После этого в смесь вносили Gfh до концентрации 5 мкМ и/или NusA до концентрации 2 мкМ, после чего инкубировали ещё 2 минуты при той же температуре. Далее транскрипционные комплексы, остановленные в +26 положении, переносили на 30°C. Отбирали «нулевую точку», после чего добавляли все нуклеозидтрифосфаты до концентрации 200 мкМ и гепарин (15 мкг/мл) для предотвращения повторной инициации. Транскрипцию останавливали добавлением равного объема стоп-буфера через определенные промежутки времени. РНК-продукты разделяли в 10% денатурирующем ПААГ, детекцию проводили при помощи фосфоимиджера. Далее в программе GraFit вычисляли значение кажущейся кинетической константы реакции перехода паузированного комплекса в элонгирующее состояние согласно кинетическому уравнению реакции первого порядка:

$P = P_{\text{макс}} \times \exp(-k_{\text{obs}} \times t)$, где P – доля паузированных продуктов, $P_{\text{макс}}$ – максимальная доля паузированных продуктов в начальный момент времени, k_{obs} – кажущаяся константа скорости реакции, t – время. Из значений константы вычисляли значения времени полужизни паузированного комплекса $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}}$.

3.6.9. Получение искусственных элонгационных комплексов для исследования паузирования РНКП

Таблица 3.1. Последовательности ДНК- и РНК-олигонуклеотидов, использованных для получения ИЭК.

hisP-dnaT	5'- CCACTGGAAGATCTGAATTCTCTTCCAGCACACATCAGGACGTA CTGACC-3'
hisP-dnaNT	5'- GGTCAGTACGTCCTGTGCGATCTTCGGAAGAGAATT CAGATCTTCCAGTGG-3'
hisP-rna17	5'- UCAUCCGGCGAUGUGUG-3'
hisP-rna19	5'- UCAUCCGGCGAUGUGUGCU-3'
hisP-asRNA	5'-AGUAGGCC-3'
Kashlev_dna_NT	5'-GGGTTGTAATAGCCATCCCAATCCACACGTCCAACGGGGCAAACCGTAGG-3'
Kashlev_dna_T	5'-CCTACGGTTTGCCCCGTTGGACGTGTGGATTGGGATGGCTATTACAACCC-3'
Kashlev_rna_17	5'-CUCGAGACUCCCAAUCC-3'
Pause_nt_60	5'-AGGATACTTAGTGCTATAATGAGCGGATCGCATGTT CACACAGGAAACA GCTGATTGCCC-3'
Pause_t_60	5'- GGGCAATCAGCTGTTTCCTGTGTGAACATGCGATCCGCTCATTATAGCAC TAAGTATCCT-3'
RNA_20	5'-AUCACGAUAAAUGAGCGGAU-3'

Олигонуклеотиды были приобретены в компании «ДНК-синтез».

Для анализа *his*-паузы использовали матричную ДНК *hisP-dnaT*, нематричную ДНК *hisP-dnaNT*, а также одну из РНК: 17-нуклеотидную *hisP-rna17* либо 19-нуклеотидную *hisP-rna19*.

Для анализа T7A1-паузы использовали матричную ДНК *Kashlev_dna_T*, нематричную ДНК *Kashlev_dna_NT* и РНК *Kashlev_rna_17*.

Для анализа *lacUV5*-паузы использовали матричную ДНК Pause_t_60, нематричную ДНК Pause_nt_60 и РНК RNA_20.

РНК (в конечной концентрации 3,5 мкМ) радиоактивно метили по 5'-концу с помощью Т4 полинуклеотид-киназы (10 е.а., New England Biolabs) и α -[^{32}P]-АТФ (3000 Ки/мМ) в Т4 полинуклеотид-киназном буфере. Реакцию проводили 30 минут при 37°C, затем фермент инактивировали прогреванием при 65°C в течение 15 минут. Меченую РНК в конечной концентрации 0,6 мкМ смешивали с матричной ДНК (концентрация матричной ДНК в пробе – 1,7 мкМ) в транскрипционном буфере ТВ 40, не содержащем ионов двухвалентных металлов (рН 7,9). Раствор помещали в водяную баню с начальной температурой 65°C и медленно охлаждали до комнатной температуры со скоростью 1°C в минуту. Полученный гибрид хранили при -20°C. Для дальнейшей сборки элонгационного комплекса гибрид РНК-ДНК в концентрации 6 нМ инкубировали с кор-ферментом РНКП (конечная концентрация кор-фермента 60 нМ) при 30°C в течение 20 минут в буфере, не содержащем ионов двухвалентных металлов. Затем добавляли нематричную цепь ДНК (до конечной концентрации 120 нМ) и инкубировали еще 20 минут при 30°C. Собранный элонгационный комплекс доводили тем же буфером до конечного объема и помещали в термостат с нужной температурой для проведения реакции синтеза РНК. В случае с *his*-паузой к ИЭК также добавляли 2 мкМ *hisP*-asRNA (антисмысловая РНК, необходимая для имитации шпильки).

3.6.10. Анализ пауз транскрипции в ИЭК

Все реакции проводили при 30°C. Перед проведением реакции к ИЭК добавляли Gfh-факторы до концентрации 5 мкМ и/или NusA до концентрации 2 мкМ.

His-паузу анализировали в двух ИЭК: с 17-нуклеотидной РНК и 19-нуклеотидной РНК в составе. В первом случае к ИЭК добавляли 100 мкМ ЦТФ, 100 мкМ УТФ и 2 мкМ ГТФ. В результате получались продукты длиной 19 (соответствует паузе) и 21 нуклеотид. В дальнейшем их анализировали аналогично описанной в разделе 3.6.8 методике и вычисляли время полужизни паузированных комплексов.

Для вычисления $K_{d,app}$ для ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} к паузированным элонгационным комплексам в присутствии и в отсутствие Gfh-факторов (5 мкМ) мы проводили удлинение ИЭК с РНК длиной 19 нуклеотидов на один нуклеотид добавлением 2 мкМ ГТФ и MgCl_2 либо MnCl_2 в концентрациях от 2 мкМ до 10 мМ. Реакции останавливали через 10 с. $K_{d,app}$ вычисляли по формуле:

$$R = R_{\max} \times [\text{Me}^{2+}] / (K_{d,app-2} + [\text{Me}^{2+}]),$$

где R – доля удлиненной РНК, $R_{\max}$ – максимальная активность, $K_{d,app}$ – кажущаяся константа диссоциации для иона Me^{2+} -2.

Для двухфазной кривой мы использовали формулу:

$$R=R_{\max}\times([Mn^{2+}]/(K_{d,app-2}+[Mn^{2+}]))\times(1-I_{\max}\times[Mn^{2+}]/(K_{d,app-3}+[Mn^{2+}])),$$

где R – доля удлинённой РНК, $R_{\max}$ – максимальная доля удлинённой РНК, которая бы наблюдалась в случае отсутствия ингибирования Gfh-фактором, $I_{\max}$ – максимальная эффективность ингибирования при насыщающих концентрациях Mn^{2+} , $K_{d,app-2}$ и $K_{d,app-3}$ – кажущиеся константы диссоциации для ионов Mn^{2+} -2 и Mn^{2+} -3.

Для анализа Т7А1-паузы к ИЭК добавляли 100 мкМ ЦТФ, УТФ, ГТФ и 5 мкМ АТФ. В результате получались РНК длиной 19 и 22 нуклеотида, соответствующие паузированным комплексам. Для количественной оценки эффективности паузирования вычисляли долю 19-нуклеотидного продукта.

К ИЭК на последовательности *lacUV5* добавляли все 4 НТФ в концентрации 10 мкМ. Вычисляли долю РНК длиной 23 и 25 нуклеотидов, что соответствует положениям паузы на этой матрице.

3.6.11. Получение минимальных искусственных элонгационных комплексов для исследования синтеза РНК на поврежденных матрицах

Таблица 3.2. Последовательности ДНК- и РНК-олигонуклеотидов, использованных для получения минимальных матриц.

26tDNA_Cramer	5'-AGCTCAAGTACTTAGGCCTGGTCATT-3'
8oxoG-26tDNA	5'-AGCTCAAGTACTTA(8-оксогуанин)GCCTGGTCATT-3'
14ntDNA_Cramer	5'-TAAGTACTTGAGCT-3'
11ntRNA_Cramer	5'-rUrUrCrGrArCrCrArGrGrC-3'
12ntRNA_C_Cramer	5'-rUrUrCrGrArCrCrArGrGrCrC-3'
12ntRNA_A_Cramer	5'-rUrUrCrGrArCrCrArGrGrCrA-3'
t30_AP	5'-GGGCAGCTCAAGTATAC_GGCCTGGTCATT-3'
t30_unmod_TG	5'-GGGCAGCTCAAGTATACTGGCCTGGTCATT-3'
nt18_anti_TG	5'-AGTATACTTGAGCTGCCC-3'
t30_CPD	5'-GGGCAGCTCAAGTAAC(тиминный димер)GGCCTGGTCATT-3'
t30_unmod_CPD	5'-GGGCAGCTCAAGTAACTTGGCCTGGTCATT-3'
nt17_anti_CPD	5'-AAGTTACTTGAGCTGCC-3'

t30_TG	5'-GGGCAGCTCAAGTATAC(тимин-гликоль) GGCCTGGTCATT-3'
t30_EthA	5'-GGGCAGCTCAAGTATTC(этноаденин)GGCCTGGTCATT-3'
t30_unmod_EthA	5'-GGGCAGCTCAAGTATTCAGGCCTGGTCATT-3'
nt17_anti_EthA	5'-GAATACTTGAGCTGCCC-3'
t30_o6MeG	5'-GGGCAGCTCAAGTATAC(6-O-метилгуанин)TGCCTGGTCATT-3'
nt18_anti_o6MeG	5'-CGTATACTTGAGCTGCCC-3'
t30_unmod_o6MeG	5'-GGGCAGCTCAAGTATTCAGGCCTGGTCATT-3'

Таблица 3.3. Схемы минимальных матриц. Для матричной цепи в скобках первым указан олигонуклеотид, содержащий модифицированный нуклеотид (на схеме выделен жирным и подчеркнут), а вторым - олигонуклеотид, использованный для создания контрольной матрицы, содержащей соответствующий немодифицированный нуклеотид.

8-оксогуанин	5' -ТААГТАСТТГАСТ 3' -ТТАСТГГТССГ Г АТТСАТГААСТСА 5' -УУСГАССАГГС	14ntDNA_Cramer (8oxoG-26tDNA / 26tDNA_Cramer) 11ntRNA_Cramer
АП-сайт	5' -АГТАСТТГАСТГССС 3' -ТТАСТГГТССГГ_САТАТГААСТСАССГГ 5' -УУСГАССАГГСС	nt18_anti_TG (t30_AP / t30_unmod_TG) 12ntRNA_C_Cramer
6-O-метилгуанин	5' -СГТАСТТГАСТГССС 3' -ТТАСТГГТССГТ Г САТАТГААСТСАССГГ 5' -УУСГАССАГГСА	nt18_anti_o6MeG (t30_o6MeG / t30_unmod_o6MeG) 12ntRNA_A_Cramer
Тиминовый димер	5' -ААГТТАСТТГАСТГССС 3' -ТТАСТГГТССГГ ТТ САТАТГААСТСАССГГ 5' -УУСГАССАГГСС	nt17_anti_CPD (t30_CPD / t30_unmod_CPD) 12ntRNA_C_Cramer
Тимин-гликоль	5' -АГТАСТТГАСТГССС 3' -ТТАСТГГТССГГ Т САТАТГААСТСАССГГ 5' -УУСГАССАГГСС	nt18_anti_TG (t30_TG / t30_unmod_TG) 12ntRNA_C_Cramer
1,N6-этноаденин	5' -ТГААСТТГАСТГССС 3' -ТТАСТГГТССГГ А СТТАТГААСТСАССГГ 5' -УУСГАССАГГСС	nt17_anti_EthA (t30_EthA / t30_unmod_EthA) 12ntRNA_C_Cramer

ДНК-олигонуклеотиды с повреждениями АП-сайт и 6-О-метилгуанин, тиминовый димер, тимин-гликоль и 1,N6-этенoadенин были заказаны в фирмах TriLink и Midland (США). ДНК-олигонуклеотиды с повреждением 8-оксогуанин, а также РНК-олигонуклеотиды и ДНК-олигонуклеотиды, не содержащие повреждений, были заказаны в фирме Синтол.

Для дальнейшей сборки элонгационного комплекса минимальную матрицу инкубировали с кор-ферментом РНКП (конечная концентрация кор-фермента 100 нМ) при 30°C в течение 15 минут в буфере, не содержащем каталитических ионов металлов. Собранный элонгационный комплекс доводили тем же буфером до конечного объема и помещали в термостат с нужной температурой для проведения реакции синтеза РНК.

3.6.12. Получение искусственных элонгационных комплексов с длинной матрицей для исследования синтеза РНК на поврежденной ДНК

Таблица 3.4. Последовательности ДНК- и РНК-олигонуклеотидов, использованных для получения ИЭК

8oxoG_T71	5'- TCAGCTGTTTCCTGTGTGAACCGGC(8-оксогуанин)CEATCCGCTCATTATAGCACTA AGTATCCTCTATAGGTTAGACTTGG -3'
O6meG_T71	5'- TCAGCTGTTTCCTGTGTGAACCGGC(6-О-метилгуанин)ATCCGCTCATTATAGCACTA AGTATCCTCTATAGGTTAGACTTGG -3'
TG_T71	5'- TCAGCTGTTTCCTGTGTGAACCGGC(тимин-гликоль)ATCCGCTCATTATAGCACTA AGTATCCTCTATAGGTTAGACTTGG -3'
t70_CPD	5'-CTGTGAATTCTCCTGTGTGAACAC(тиминовый димер)GATCCGCTCATTATAGCACT AAGTATCCTATAGGTTAGACTTGG-3'
G_T71-unmod	5'- TCAGCTGTTTCCTGTGTGAACCGGCGATCCGCTCATTATAGCACTAAGTATCCTCTA TAGGTTAGACTTGG -3'
T_T71-unmod	5'- TCAGCTGTTTCCTGTGTGAACCGGCTATCCGCTCATTATAGCACTAAGTATCCTCTAT AGGTTAGACTTGG -3'
t70_unmod_CPD	5'-CTGTGAATTCTCCTGTGTGAACACTTGATCCGCTCATTATAGCACTAAGTATCCT ATAGGTTAGACTTGG-3'
G_NT71	5'-CCAAGTCTAACCTATAGAGGATACTTAGTGCTATAATGAGCGGATCGCCGGTTCACA CAGGAAACAGCTGA-3'
G_NT71-BIO	биотин-CCAAGTCTAACCTATAGAGGATACTTAGTGCTATAATGAGCGGATCGCCGGTT CACACAGGAAACAGCTGA-3'
T_NT71	5'- CCAAGTCTAACCTATAGAGGATACTTAGTGCTATAATGAGCGGATAGCCGGTTCACA CAGGAAACAGCTGA -3'
nt70_anti_CPD	5'-CCAAGTCTAACCTATAGGATACTTAGTGCTATAATGAGCGGATCAAGTGTTTAC ACAGGAGAATTACAG-3'
RNA_18	5'-AUCACGAAUAAUGAGCGG-3'
RNA_20	5'-AUCACGAUAAAUGAGCGGAU-3'

РНК RNA_18 и RNA_20 кинировали радиоактивно меченым фосфатом по описанной выше методике. Далее к ним добавляли матричную ДНК до концентрации 1 мкМ, в транскрипционном буфере ТВ 40 pH 7,9, не содержащем ионов двухвалентных металлов. Раствор помещали в водяную баню с начальной температурой 65°C и медленно охлаждали до комнатной температуры со скоростью 1°C в минуту. После сборки гибриды хранили на -20 °C. Для дальнейшей сборки элонгационного комплекса гибрид РНК-ДНК в концентрации 6 нМ инкубировали с кор-ферментом РНКП (конечная концентрация кор-фермента 60 нМ) при 30°C в течение 20 минут в буфере, не содержащем ионов двухвалентных металлов. Затем добавляли нематричную цепь ДНК (до конечной концентрации 120 нМ) и инкубировали еще 20 минут при 30°C. Собранный элонгационный комплекс доводили тем

же буфером до конечного объема и помещали в термостат с нужной температурой для проведения реакции синтеза РНК.

Для получения ИЭК с 8-оксогуанином (контрольного ИЭК с гуанином) смешивали РНК RNA_18, матричную цепь ДНК 8охоG_T71 (G_T71-unmod) и нематричную цепь ДНК G_NT71/ G_NT71-BIO (если получали биотинилированный ИЭК).

Для получения ИЭК с 6-О-метилгуанином смешивали РНК RNA_18, матричную цепь ДНК ОбмеG_T71 и нематричную цепь ДНК G_NT71.

Для получения ИЭК с тимин-гликолем (контрольного ИЭК с тимином) смешивали РНК RNA_18, матричную цепь ДНК TG_T71 (T_T71-unmod) и нематричную цепь ДНК T_NT71.

Для получения ИЭК с тиминовым димером (контрольного ИЭК с тимином) смешивали РНК RNA_20, матричную цепь ДНК t70_CPD (t70_unmod_CPD) и нематричную цепь ДНК nt70_anti_CPD.

3.6.13. Тест на точность работы РНКП *D. radiodurans* при транскрипции поврежденных матриц

Для определения точности транскрипции к минимальным ИЭК в буфере ТВ 40 «+Mg» или «+Mn» pH 7,9 добавляли один из НТФ. Условия реакций приведены в таблице.

Таблица 3.5. Условия реакций по измерению точности транскрипции на минимальных матрицах.

Повреждение	Концентрация НТФ	Температура
8-оксогуанин	10 мкМ	25°C
6-О-метилгуанин	10 мкМ	25°C
АП-сайт	10 мкМ	25°C
Тимин-гликоль	10 мкМ	25°C
Тиминовый димер	1 мМ	37°C
1,N6-этеноаденин	1 мМ	37°C

Реакцию останавливали через 1 минуту добавлением равного объема стоп-буфера. Продукты реакции разделяли электрофоретически в 23% ПААГ и детектировали при помощи фосфоимиджера.

3.6.14. Тест на эффективность транскрипции поврежденной ДНК РНКП *D. radiodurans*

Реакции проводили в буфере ТВ 40 «+Mn» pH 7,9. К препарату элонгационного комплекса (во всех случаях, кроме 8-оксогуанина использовались минимальные ИЭК, в случае 8-оксогуанина – ИЭК с длинной матрицей) добавляли Gfh1-фактор до концентрации 5 мкМ. Из полученного раствора отбирали аликвоту и смешивали с равным объемом стоп-буфера для получения контрольной пробы («0» точка без синтеза РНК). Реакцию запускали добавлением к оставшейся смеси $MnCl_2$ (10 мМ) и набора НТФ. После этого через

определенные промежутки времени отбирали аликвоты и смешивали их с равным объемом стоп-буфера. Продукты реакции разделяли электрофоретически в 23% ПААГ и детектировали при помощи фосфоимиджера. Условия реакций приведены в таблице.

Таблица 3.6. Условия реакций по определению эффективности синтеза РНК на поврежденных матрицах.

Повреждение	НТФ	Температура
8-оксогуанин	10 мкМ АТФ, УТФ, ЦТФ, ГТФ	30°C
6-О-метилгуанин	10 мкМ УТФ, ЦТФ, ГТФ	25°C
АП-сайт	1 мМ АТФ, УТФ, ГТФ	25°C
Тимин-гликоль	10 мкМ АТФ, УТФ, ГТФ	25°C
Тиминовый димер	100 мкМ АТФ, УТФ, ГТФ	37°C
1,N6-этенoadенин	1 мМ АТФ, УТФ, ЦТФ, ГТФ	37°C

3.6.15. Тесты по влиянию транслоказы Mfd и Gfh-факторов *D. radiodurans* на транскрипцию поврежденных матриц

К ИЭК, содержащим повреждения в составе длинных матриц в буфере ТВ 40 «+Mn» pH 7,9, добавляли Gfh1-фактор и/или Mfd *D. radiodurans*, инкубировали 2 минуты при 30°C, после чего запускали реакцию добавлением полного набора НТФ и 1 мМ дАТФ. дАТФ необходим Mfd в качестве источника энергии, в то же время не используется РНКП как субстрат, поэтому не влияет на транскрипцию. Реакцию останавливали через 10 с, 30 с, 1 мин, 3 мин, 10 мин добавлением равного объема стоп-буфера. Продукты реакции разделяли электрофоретически в 23% ПААГ и детектировали при помощи фосфоимиджера. Условия реакций приведены в таблице.

Таблица 3.7. Условия реакций по определению влияния Mfd и Gfh на транскрипцию поврежденных матриц.

Повреждение	Концентрация НТФ	Температура
8-оксогуанин	10 мкМ	30°C
6-О-метилгуанин	100 мкМ	30°C
Тимин-гликоль	100 мкМ	30°C
Тиминовый димер	100 мкМ	37°C

3.6.16. Тест на активность Mfd в диссоциации паузированных элонгационных комплексов на поврежденных матрицах

Для проверки активности Mfd в диссоциации паузированных на повреждении ДНК элонгационных комплексов собирали ИЭК с длинной матрицей, содержащей 8-оксогуанин в буфере ТВ 40 без двухвалентного катиона с pH 7,9. В качестве нематричной ДНК использовали вариант с биотином на 5'-конце (G_NT71-BIO). После сборки элонгационного комплекса его смешивали с магнитной стрептавидиновой смолой Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали 10 минут на комнатной температуре. Несвязавшиеся ИЭК отмывали буфером ТВ 40 без двухвалентного катиона с pH 7,9. Реакцию запускали добавлением 10 mM MgCl₂/MnCl₂, 10 мкМ АТФ, УТФ, ГТФ, СТФ, 1мМ дАТФ. Реакцию останавливали через 20 минут 50-кратным разведением в буфере ТВ 40 без каталитических ионов. В 23% ПААГ отдельно наносили фракции смолы и супернатанта.

3.6.17. Тест по измерению эффективности терминации

Реакцию проводили в буферах ТВ 40 pH 7,9 «+Mg» и «+Mn». Для получения холофермента РНКП кор-фермент (30 нМ) и σ -субъединицу (200 нМ) смешивали в транскрипционном буфере, добавляли матрицу *galP1-tR2*, содержащую последовательности промотора и терминатора, и инкубировали 5 минут при 37°C. Все последующие операции также проводили при той же температуре. Транскрипционные комплексы, остановленные в +20 положении от старта транскрипции, получали добавлением ограниченного набора субстратов (25 мкМ ApU, 10 мкМ АТФ, 10 мкМ ГТФ и 10 мкМ ЦТФ). Транскрипцию проводили в течение 5 минут. К остановленному элонгационному комплексу добавляли Gfh-фактор до концентрации 5 мкМ и/или NusA до концентрации 1 мкМ, после чего инкубировали смесь ещё 2 минуты при той же температуре. Для определения эффективности терминации в смесь вносили все НТФ (250 мкМ АТФ, 250 мкМ ГТФ, 250 мкМ ЦТФ, 2 мкМ УТФ и 2.5 мкКи α -[³²P]-УТР) и гепарин до концентрации 15 мкг/мл. Реакцию останавливали через 5 минут равным объемом стоп-буфера. Терминированный продукт отделяли от полноразмерного в 15% денатурирующем ПААГ и детектировали на фосфоимиджере. С помощью программы ImageQuant определяли относительное количество РНК-продуктов по интенсивности полос на автордиограммах. В качестве количественной оценки эффективности терминации использовали отношение количества терминированного продукта к суммарному количеству терминированного и полноразмерного продуктов.

3.6.18. Метод молекулярных маячков

Для анализа взаимодействий РНКП с промотором использовали σ^A -субъединицу РНКП *D. radiodurans*, содержащую замену R167C и меченую тетраметилродамином-5-малеимидом

(ТМР-малеимид). Замена R167C необходима для образования связи между цистеином и флуорофором. Для получения меченого белка очищенный препарат σ^A -субъединицы инкубировали на льду в течение часа с пятикратным избытком ТМР-малеимида в 50 мМ фосфатном буфере с pH 7,0. Затем в смесь добавляли ДТТ до концентрации 1 мМ. Избыток ТМР-малеимида удаляли с помощью обессоливающей колонки Micro Bio-Spin Column P-30 (Bio-Rad). Препарат меченого белка хранили на -20 °C. В контрольных экспериментах было показано, что введенная в σ^A -субъединицу мутация, а также наличие флуорофора не влияют на её активность. В изолированной меченой σ^A -субъединице флуоресценция ТМР гасится находящимися вблизи ароматическими аминокислотами ДНК-связывающего района 2 σ^A -субъединицы. Было показано, что при образовании открытого инициаторного комплекса флуоресцентный сигнал возрастает, так как флуорофор и гасители оказываются удалены друг от друга в результате взаимодействия ДНК с районом 2 σ -субъединицы. При распаде инициаторного комплекса или переходе к элонгации флуоресценция вновь падает.

Интенсивность флуоресценции ТМР регистрировали с помощью спектрофлуориметра QuantaMaster QM40 при 37°C. Длина волны поглощения – 550 нМ, длина волны регистрации флуоресценции – 580 нМ (ширина щели 10 нМ).

Пробы содержали меченый холофермент РНКП *D. radiodurans* (1-3 нМ меченой σ^A R167C и 7 нМ кор-фермента) в 800 мкл транскрипционного буфера, содержащего 40 мМ Трис-НСl pH 8,0, 100 мМ NaCl, 5% глицерин, 1мМ ДТТ, 10 мМ MgCl₂ и 0,02% Tween 20. К этой смеси добавляли промоторные ДНК в концентрации 7 нМ, и вследствие образования открытого промоторного комплекса флуоресцентный сигнал повышался. Смесь инкубировали в течение 3-5 минут до достижения флуоресценцией плато. Далее в смесь добавляли Gfh-факторы в концентрации 5 мкМ.

Мы изучали влияние Gfh на два параметра: стабильность инициаторного комплекса и скорость перехода от инициации к элонгации транскрипции.

Для измерения стабильности промоторного комплекса к ним добавляли гепарин до конечной концентрации 15 мкг/мкл. Последующая кинетика изменения флуоресценции описывается уравнением с двумя экспонентами:

$$F_n = F_1 \times \exp(-k_{1obs} \times t) + F_2 \times \exp(-k_{2obs} \times t) + B$$

где k_{1obs} и k_{2obs} – кажущиеся константы скорости реакции F_1 и F_2 – амплитуды изменения флуоресценции для первой и второй фаз реакции, соответственно, B – фоновое значение флуоресценции после завершения реакции, F_n – нормализованное значение флуоресценции, вычисляемое по формуле $F_n = 100 \times (F - F_{мин}) / (F_{макс} - F_{мин})$, где F – уровень флуоресценции, зафиксированный после добавления гепарина, $F_{макс}$ – максимальное значение флуоресценции, зафиксированное до добавления гепарина, $F_{мин}$ – минимальное значение флуоресценции,

зафиксированное до добавления промоторной ДНК к меченому холоферменту РНКП *D. radiodurans*.

Для анализа перехода от инициации к элонгации мы добавляли к инициаторным комплексам 500 нМ немеченой σ^A R167C и все четыре НТФ до конечной концентрации 100 мкМ. В этом случае кинетика изменения флуоресценции описывалась уравнением с одной экспонентой.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Выравнивание последовательностей петли N-концевого домена белков GreA и Gfh бактерий *T. thermophilus* и *D. radiodurans* обнаруживает различия в ключевых для функционирования Gre-факторов аминокислотных позициях как между Gre- и Gfh-факторами, так и между Gfh-факторами этих двух родственных бактерий (рис. 4.1). Высказывалось предположение (Hogan *et al*, 2002; Lamour *et al*, 2006), что различия в транскрипционных свойствах Gfh1 *T. thermophilus* и Gre-факторов связаны именно со строением петли N-концевого домена: два отрицательно заряженных аминокислотных остатка у Gre координируют каталитический ион магния в положении, способствующим эндонуклеазной реакции, а четыре аспартата у Gfh1-фактора *T. thermophilus*, наоборот, фиксируют Mg^{2+} в состоянии, ингибирующим катализ. Принимая это во внимание, можно было ожидать, что факторы Gfh1 и Gfh2 *D. radiodurans* иначе воздействуют на РНКП. Ранее не исследованные Gfh-факторы *D. peraridilitoris* по последовательности петли N-КД похожи на белки *D. radiodurans*. В соответствии со строением этого региона они были названы нами Gfh1 α , Gfh1 β , Gfh2 α , Gfh2 β (рис. 4.1).

GreA	Tth	38	LEEGD LD RENAGYD
GreA	Dra	39	IEDGD LD ESAAYD
Gfh1	Tth	37	MESS DDYDD SGLE
Gfh1	Dra	39	METSAD NED TGLE
Gfh2	Dra	60	MEA- NENE SLDLA
Gfh1	D3T	39	METS DDYDD TGLE
Gfh1	Ala	39	METSA ANAA TGLE
Gfh2	Ala	60	MEA- ANAA SLDLA
Gfh1α	Dper	37	METAAD YED TGLE
Gfh1β	Dper	37	LDDAMD LED RSLQ
Gfh2α	Dper	37	LEA- NENE SLGLV
Gfh2β	Dper	37	REA- NEQE SLGLV

Рисунок 4.1. Выравнивание петли N-концевого домена Gre-подобных факторов бактерий родов *Thermus* и *Deinococcus*. Красным выделены отрицательно заряженные аминокислотные остатки, для которых показана или предполагается роль в транскрипционной активности этих белков. *Tth*, *T. thermophilus*; *Dra*, *D. radiodurans*; *Dper*, *D. peraridilitoris*. Gfh1 D3T, Gfh1 Ala и Gfh2 Ala – сконструированные в этой работе белки с заменами подчеркнутых остатков в петле N-КД

В этой работе мы клонировали гены, кодирующие мутантные варианты Gfh-факторов *D. radiodurans*, в экспрессионные векторы. Все Gfh-факторы *D. radiodurans* были выделены из клеток экспрессионного штамма *E. coli*. Используя эти белки и препараты РНКП *D. radiodurans* и *T. thermophilus*, мы исследовали влияние Gfh-факторов на разные стадии транскрипции. Поскольку при стрессе в клетки *D. radiodurans* закачиваются ионы Mn^{2+} , и их концентрация повышается до миллимолярной, ионы Mn^{2+} потенциально могут вытеснять ионы Mg^{2+} в активном центре РНКП и влиять на характер воздействия Gfh-факторов на транскрипцию (Leibowitz *et al*, 1976; Paulino-Lima *et al*, 2016). Поэтому мы проводили

реакции транскрипции *in vitro* как в стандартном транскрипционном буфере, содержащем каталитические ионы Mg^{2+} , так и в буфере с ионами Mn^{2+} .

4.1. Влияние Gfh-факторов на активность РНКП на стадии инициации транскрипции

Известно, что фактор Gfh1 *T. thermophilus* проявляет хорошо выраженный pH-зависимый ингибирующий эффект на синтез РНК на стадии инициации транскрипции (Laptenko *et al*, 2006). Влияние Gfh-факторов *T. thermophilus* и *D. radiodurans* на эффективность синтеза РНК-продуктов РНКП *T. thermophilus* и *D. radiodurans* на стадии инициации транскрипции было протестировано в транскрипционных буферах с pH от 6.1 до 8.9 с использованием ДНК-матрицы, содержащей промотор T7A1cons (рис. 4.2 А). За синтезом РНК следили по образованию тринуклеотидного продукта при добавлении в реакционную смесь динуклеотидной затравки CpA и радиоактивно меченого по альфа-положению УТФ. В соответствии с ранее опубликованными данными, ингибирующий эффект Gfh1-фактора *T. thermophilus* значительным образом усиливается с понижением pH. В то же время оба Gfh-фактора *D. radiodurans* такой зависимости не проявляют: они ингибируют синтез тринуклеотида в широком промежутке значений pH, но с гораздо меньшей эффективностью, чем Gfh1-фактор *T. thermophilus* ингибирует свою РНКП. Замена каталитического иона Mg^{2+} на Mn^{2+} не повлияла значительным образом на активность Gfh1, но заметно снизила ингибирующий эффект Gfh2-фактора *D. radiodurans*. Характер pH-зависимости Gfh1-фактора *T. thermophilus* сохраняется в присутствии иона Mn^{2+} (рис. 4.2 Б).

Ранее было показано, что аффинность Gfh1-фактора *T. thermophilus* к транскрипционным комплексам зависит от pH: концентрации полуингибирования (IC_{50}) при pH 6,5 и 7,5 составляют, соответственно, 0,05 и 0,5 мкМ (Laptenko *et al*, 2006). Для определения аффинности Gfh-факторов *D. radiodurans* к инициаторным комплексам мы измеряли относительную эффективность abortивного синтеза в присутствии различных концентраций Gfh-факторов. Полученные значения IC_{50} при pH 7,9 ($2,0 \pm 0,6$ мкМ для Gfh1 и $1,0 \pm 0,2$ мкМ для Gfh2) похожи на IC_{50} при pH 6,5 ($2,7 \pm 0,9$ мкМ для Gfh1 и $0,8 \pm 0,1$ мкМ для Gfh2). Таким образом, в отличие от фактора Gfh1 *T. thermophilus*, возможные pH-зависимые изменения конформации Gfh-факторов *D. radiodurans* не играют роли в регуляции их активности.

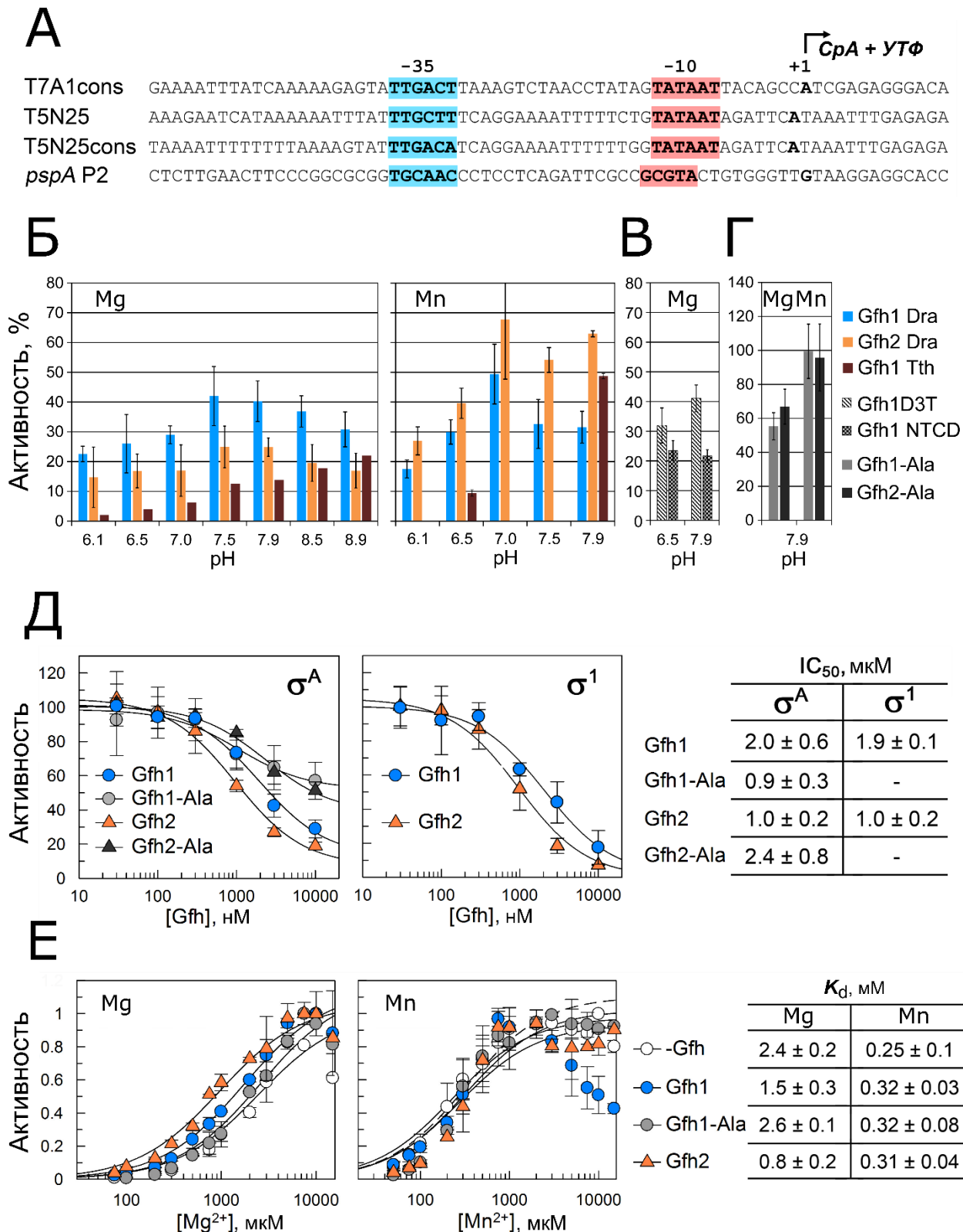


Рисунок 4.2. Активность Gfh-факторов *D. radiodurans* в инициации транскрипции. (А) Используемые в работе промоторные последовательности. Показаны последовательности нематричной цепи ДНК, указаны «-35», «-10» регионы и точка старта транскрипции. (Б) Влияние Gfh1 (синий) и Gfh2 (оранжевый) факторов *D. radiodurans*, а также Gfh1-фактора *T. thermophilus* (коричневый) на инициацию транскрипции соответствующими РНКП на промоторе T7A1cons при разных значениях pH в присутствии Mg²⁺ или Mn²⁺. Концентрация Gfh-факторов 5 мкМ. (В и Г) Влияние мутантных вариантов Gfh-факторов *D. radiodurans* на abortивный синтез. (Д) Кажущаяся аффинность Gfh-факторов к инициаторным транскрипционным комплексам. Реакции были проведены в присутствии Mg²⁺ на матрицах, содержащих промотор T7A1cons (запускались заправкой CpA и УТФ) либо pspA P2 (запускались смесью ГТФ и УТФ) для σ^A и Sig1 (σ^1),

соответственно. Значения активности нормировали на контрольную реакцию, в которую не добавлялись Gfh-факторы. (Е) Кажущаяся аффинность двухвалентных металлов к инициаторным транскрипционным комплексам. Реакции abortивного синтеза были проведены на промоторе T7A1cons при различных концентрациях Mg^{2+} или Mn^{2+} . Значения кажущихся констант диссоциации показаны справа. Значения активности нормировали на контрольную реакцию, в которую не добавлялись Gfh-факторы

4.2. Анализ мутантных вариантов Gfh-факторов *D. radiodurans* в реакции инициации транскрипции

Чтобы выяснить, объясняются ли различия в активности Gfh-факторов *T. thermophilus* и *D. radiodurans* строением петли N-концевого домена, мы получили варианты Gfh1-фактора *D. radiodurans* с заменами трех аминокислотных остатков (Gfh1D3T) либо целого N-концевого домена (Gfh1NTCD) на соответствующие последовательности Gfh1-фактора *T. thermophilus* (рис. 4.1). Белок Gfh1D3T не проявляет отличий в активности от фактора Gfh1 *D. radiodurans* дикого типа, а Gfh1NTCD даже немного слабее ингибирует РНКП (рис. 4.2 В). Таким образом, различия в активности Gfh-факторов *T. thermophilus* и *D. radiodurans* на стадии инициации транскрипции нельзя объяснить строением N-концевого домена: по-видимому, ингибирующий эффект отчасти объясняется особенностями взаимодействия факторов с РНКП и зависит от строения фермента.

Чтобы установить роль отрицательно заряженных аминокислотных остатков петли N-концевого домена в инициации транскрипции, мы заменили их в Gfh-факторах *D. radiodurans* на остатки аланинов (Gfh1-Ala и Gfh2-Ala). В присутствии Mg^{2+} оба мутантных белка слабее ингибируют РНКП по сравнению с Gfh-факторами дикого типа, а в присутствии Mn^{2+} ингибирующий эффект полностью пропадает (рис. 4.2 Г). Полученные данные свидетельствуют о важной роли отрицательно заряженных аминокислотных остатков петли N-концевого домена Gfh-факторов *D. radiodurans* в проявлении их ингибирующей активности на стадии инициации транскрипции.

4.3. Действие Gfh-факторов на холоферменты РНКП, содержащие главную и альтернативную σ -субъединицы

Чтобы оценить аффинность Gfh-факторов к холоферментам, мы измерили эффективность инициации транскрипции при разных концентрациях Gfh. IC_{50} ~2,0 мкМ для Gfh1 и 1,0 мкМ для Gfh2, что больше, чем для Gfh1-фактора *T. thermophilus* (IC_{50} ~0,05-0,5 в зависимости от значения pH) (Laptenko *et al*, 2006). В то же время аланиновые замены в N-концевом домене не влияют на аффинность Gfh-факторов *D. radiodurans* к холоферменту (рис. 4.2 Д), следовательно, ослабление ингибирования в случае мутантных факторов не связано со снижением аффинности Gfh к РНКП.

Все предыдущие данные по влиянию Gfh-факторов *D. radiodurans* на инициацию транскрипции были получены на холоферментах РНКП, содержащих основную σ^A -субъединицу. В то же время, варианты холоферментов с альтернативными σ -факторами могут различаться в чувствительности к транскрипционным регуляторам. Мы проанализировали инициацию транскрипции РНКП *D. radiodurans*, содержащей одну из альтернативных σ -субъединиц Sig1. Ген, кодирующий этот белок, был клонирован в экспрессионный вектор, после чего Sig1 была очищена из клеток *E. coli*. Для анализа влияния Gfh-факторов на активность холофермента, содержащего Sig1 мы использовали ДНК-матрицу с промотором *pspA* P2 и добавляли в реакционную смесь ГТФ и УТФ в качестве инициаторных субстратов. Мы обнаружили, что σ^A - и Sig1-содержащие холоферменты одинаковым образом ингибируются Gfh-факторами и демонстрируют схожую аффинность к Gfh1 и Gfh2 (рис. 4.2 Д).

4.4. Влияние Gfh-факторов на аффинность РНКП к каталитическим ионам в реакции синтеза коротких РНК

Gfh1-фактор *T. thermophilus* значительно повышает аффинность РНКП к каталитическим ионам магния на стадии инициации транскрипции, по-видимому, напрямую взаимодействуя с ними в активном центре фермента (Laptenko *et al*, 2006). Чтобы выявить возможный эффект Gfh-факторов *D. radiodurans* на сродство РНКП к каталитическим ионам, мы провели тесты по определению относительной эффективности абортного синтеза в присутствии различных концентраций Mg^{2+} и Mn^{2+} (рис. 4.2 Е). Мы обнаружили, что оба Gfh-фактора *D. radiodurans* немного уменьшают кажущуюся константу диссоциации ($K_{d,app}$) для иона магния (в 1,5 и 3 раза, соответственно). В то же время, мутантные белки Gfh1-Ala и Gfh2-Ala не влияют на $K_{d,app}$, что указывает на участие отрицательно заряженных аминокислотных остатков активного центра в увеличении аффинности РНКП к Mg^{2+} . Оба фактора не влияют на связывание Mn^{2+} транскрипционным комплексом. Интересно, что высокие концентрации Mn^{2+} усиливают ингибиторную активность Gfh1 *D. radiodurans*, что может указывать на связывание Gfh1-фактором дополнительного иона Mn^{2+} в активном центре РНКП, приводящее к ингибированию катализа.

4.5. Влияние Gfh-факторов на аффинность РНКП к инициаторным субстратам

Чтобы установить, какой этап инициации транскрипции подвержен действию Gfh-факторов *D. radiodurans*, мы измерили влияние этих белков на связывание инициаторных субстратов, стабильность промоторных комплексов и скорость ухода РНКП с промотора. Ранее было

показано, что Gfh1-фактор *T. thermophilus* значительно увеличивает кажущуюся K_M ($K_{M,app}$) для 3'-инициаторного субстрата, в то же время выступая в роли неконкурентного ингибитора для 5'-субстрата (Laptenko *et al*, 2006). Мы измерили влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на $K_{M,app}$ при инициации транскрипции на промоторе T7A1cons, используя в качестве субстратов АТФ+УТФ или СрА+УТФ (таблица 4.1). Мы обнаружили, что оба Gfh-фактора лишь немного повышают $K_{M,app}$ для 3'-УТФ (в 1,5-3 раза), но оказывают гораздо более сильный эффект на связывание 5'-субстратов (АТФ или СрА, до 10-кратного повышения $K_{M,app}$). Таким образом, механизм ингибирующего действия Gfh-факторов *D. radiodurans* отличается от Gfh1-фактора *T. thermophilus*.

Таблица 4.1. Влияние Gfh-факторов на значения кажущихся K_M для инициаторных субстратов

Фактор	$K_{M,app}$ (мкМ)			
	АТФ + УТФ		СрА + УТФ	
	АТФ	УТФ	СрА	УТФ
-	169 ± 24 1	51 ± 9 1	28 ± 1 1	2.4 ± 0.3 1
Gfh1	865 ± 185 5.1	87 ± 34 1.7	104 ± 15 3.7	4.5 ± 1.2 1.9
Gfh2	1380 ± 210 8.2	82 ± 26 1.6	248 ± 5 8.7	4.9 ± 0.1 2.0

Цифры, выделенные полужирным, указывают на изменения значений $K_{M,app}$ по сравнению с реакциями без Gfh-факторов

4.6. Влияние Gfh-факторов на стабильность промоторных комплексов и скорость перехода от инициации к элонгации транскрипции

Ранее было показано, что РНКП *D. radiodurans* формирует нестабильные промоторные комплексы, что делает измерение времени их полужизни непростой задачей (Kulbachinskiy *et al*, 2004). Поэтому мы применили метод молекулярных маячков, ранее разработанный для РНКП *E. coli* и *Thermus aquaticus* (Mekler *et al*, 2012, 2011). Суть метода заключается в измерении флуоресценции флуорофора ТМР, расположенного рядом с ДНК-связывающим районом. Флуоресценция ТМР, ковалентно связанного с цистеином, гасится ароматическими аминокислотными остатками районов 2.3-2.4 как в изолированной σ^A -субъединице, так и в составе холофермента РНКП. Однако связывание ДНК инициаторным комплексом приводит к резкому усилению флуоресценции вследствие пространственного разделения флуорофора с гасителями. Для введения флуорофора мы получили σ^A -субъединицу *D. radiodurans* с единственным остатком цистеина в позиции 167 (для этого получили аминокислотную замену R167C). В трехмерной модели РНКП родственного организма *T. thermophilus*

соответствующий аминокислотный остаток L230 сближен с районами 2.3-2.4 σ^A -субъединицы, вовлеченными во взаимодействия с «-10» промоторным элементом (рис. 4.3 А). В работе (Mekler *et al*, 2012) в σ^A -субъединицу *T. aquaticus* вносили замену L245C, что соответствует L230 σ^A -субъединицы *T. thermophilus* и R167 σ^A -субъединицы *D. radiodurans*.

Как и ожидалось, холофермент РНКП *D. radiodurans* с флуоресцентно меченным σ^A -фактором в составе усиливал флуоресценцию при связывании промоторного участка ДНК. После добавления гепарина – конкурентного ингибитора связывания ДНК РНКП – мы наблюдали быстрое падение сигнала флуоресценции, отражающее диссоциацию промоторного комплекса. С использованием этого подхода мы регистрировали кинетики диссоциации промоторных комплексов на промоторах T5N25, T5N25cons и T7A1cons (рис. 4.3 Б, В и Г).

Кривая падения флуоресценции описывается уравнением с двумя экспонентами. Поскольку более медленная константа скорости не зависит от условий эксперимента, мы предположили, что она соответствует выцветанию флуорофора. Таким образом, для сравнения мы использовали только первую константу скорости реакции. Времена полураспада промоторных комплексов оказались сравнимы для промоторов T7A1cons (~25 с), T5N25 (~14 с), T5N25cons (~14 с). Gfh1 влияет на стабильность транскрипционных комплексов на всех трех промоторах незначительно, а Gfh2 примерно в 2 раза снижает время полураспада T5N25-содержащего промоторного комплекса. Однако столь слабые эффекты на стабильность промоторных комплексов вряд ли могут объяснить ингибирование инициации транскрипции Gfh-факторами *D. radiodurans*.

Мы использовали ту же экспериментальную систему для анализа влияния Gfh-факторов на процесс перехода от инициации к элонгации РНКП *D. radiodurans*. Для этого мы измеряли кинетики снижения флуоресценции после добавления к инициаторному комплексу всех четырех НТФ в отсутствие гепарина. Для предотвращения вторичной сборки промоторных комплексов, содержащих флуоресцентно меченую σ^A -субъединицу, мы добавляли в реакционную смесь избыток немеченой σ^A -субъединицы до внесения НТФ. Добавление НТФ приводило к резкому падению уровня флуоресценции в результате ухода транскрипционного комплекса с промоторного участка ДНК и диссоциации σ^A -субъединицы (рис. 4.3 Д). Мы обнаружили, что в условиях нашей экспериментальной системы скорость ухода РНКП *D. radiodurans* с промотора T5N25cons примерно в 3 раза выше, чем с промотора T7A1cons. В то же время, Gfh1-фактор в обоих случаях не оказывает значимого ингибиторного эффекта на этот процесс.

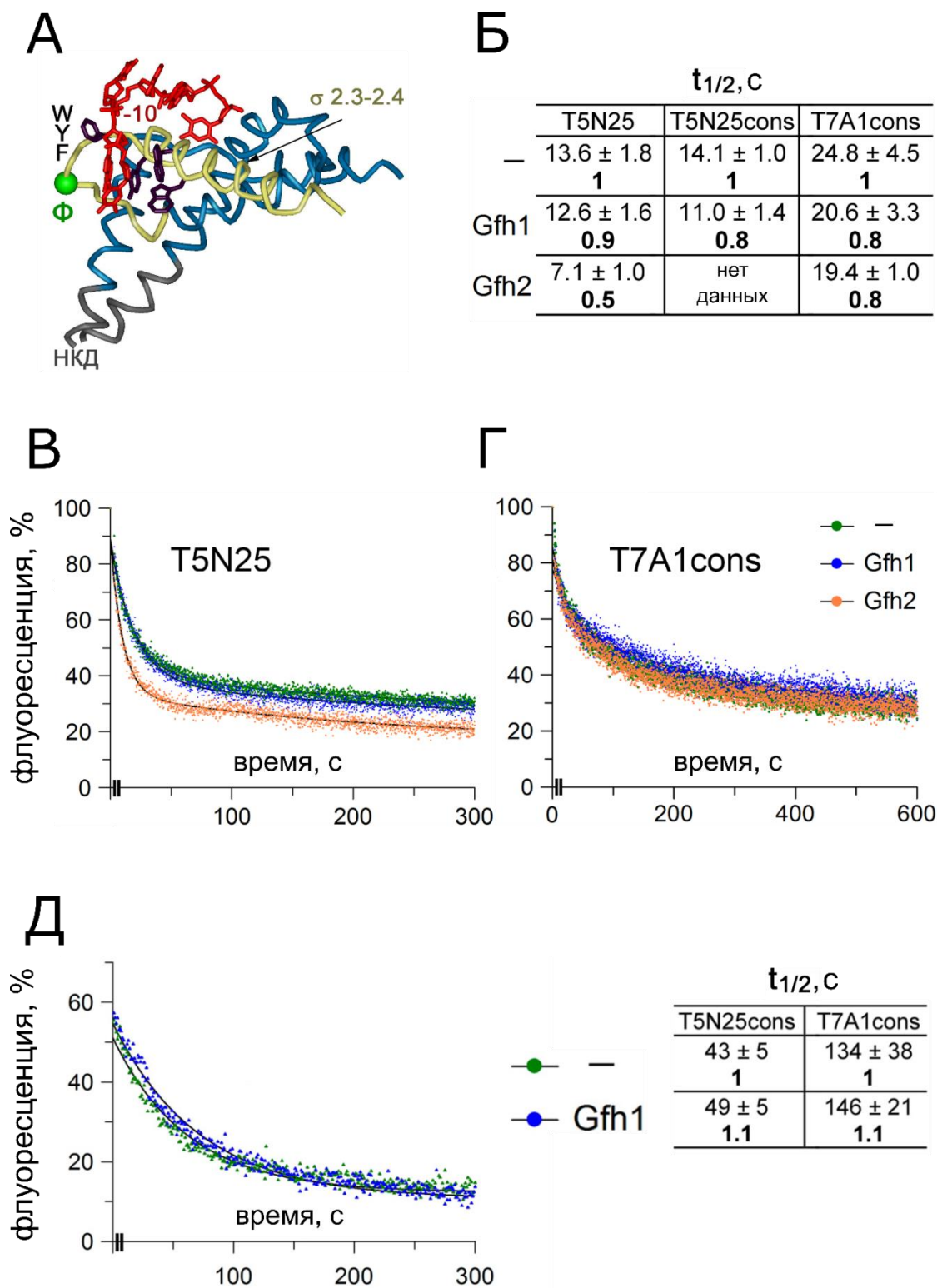


Рисунок 4.3. Данные по влиянию Gfh-факторов на инициацию транскрипции РНКП *D. radiodurans*, полученные методом молекулярных маячков. **(А)** Структура σ^A -субъединицы в составе открытого промоторного комплекса РНКП *T. thermophilus*. Показаны позиции регионов 2.3-2.4 (желтые), вовлеченные в узнавание «-10» элемента промотора (красный). Положение единственного остатка цистеина, использованного для мечения флуорофором (Ф), показано зеленым шаром (L245C в σ^A -субъединице *T. aquaticus* и соответствующий ему остаток R167C в σ^A -субъединице *D. radiodurans*). Ароматические аминокислоты триптофан, тирозин и фенилаланин в ДНК-узнающем регионе σ -субъединицы показаны черным. Регионы 1.2, 2.1 и 2.2 показаны синим, а серым – неконсервативный домен (НКД) между регионами 1.2 и 2.1. **(Б)** Время полужизни инициаторных комплексов в зависимости от присутствия Gfh-факторов на разных промоторах. Полуужирным показаны изменения относительно $t_{1/2}$ для реакции без факторов. **(В и Г)** Кинетики изменения флуоресценции при диссоциации инициаторных

комплексов на промоторах T5N25 и T7A1cons после добавления гепарина. Для каждой реакции интенсивность флуоресценции была нормализована к амплитуде увеличения флуоресценции при образовании открытого инициаторного комплекса. Нулевая точка соответствует началу измерения флуоресценции после смешивания реагентов. (Д) Кинетики изменения флуоресценции при уходе РНКП с промотора после добавления полного набора 100 мкМ НТФ к инициаторному комплексу на промоторе T5N25cons. В таблице показаны $t_{1/2}$ ухода с промотора для исследованных промоторов. Полужирным показаны изменения относительно $t_{1/2}$ для реакции без факторов

4.7. Влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на эндонуклеазную активность РНКП

Основная активность Gre-факторов – стимуляция эндонуклеазного расщепления РНК в активном центре РНКП. Gfh1-фактор *T. thermophilus* ингибирует эту реакцию, а также конкурирует с GreA за связывание с РНКП (Hogan *et al*, 2002; Laptenko *et al*, 2006; Symersky *et al*, 2006). В связи с этим, нашей следующей задачей была проверка влияния Gfh-факторов *D. radiodurans* на эндонуклеазную активность РНКП. Для измерения скорости этой реакции мы собирали искусственные элонгационные комплексы (ИЭК) с неспаренным 3'-концевым нуклеотидом в РНК (рис. 4.4 А). Такие комплексы имитируют природные элонгационные комплексы, образующиеся при обратном смещении РНКП после включения неправильного нуклеотида. Мы обнаружили, что Gfh-факторы *D. radiodurans* в присутствии Mn^{2+} не влияют на расщепление РНК, а в присутствии Mg^{2+} даже ускоряют эту реакцию (рис. 4.4 Б).

Чтобы проверить конкуренцию с GreA, в реакционную смесь одновременно добавляли GreA-фактор и один из Gfh-факторов. Эту реакцию мы проводили не только в стандартных условиях при 37°C и pH 7,9, но и при пониженных pH (6,5) и температуре (20°C), чтобы замедлить её для более удобного наблюдения за изменением скорости в присутствии транскрипционных факторов. Оказалось, что даже при пятикратном избытке Gfh-факторов над GreA они не влияют на скорость расщепления РНК (рис. 4.4 В). Таким образом, в отличие от Gfh1-фактора *T. thermophilus* Gfh-факторы *D. radiodurans* не ингибируют эндонуклеазную активность РНКП и не могут эффективно конкурировать с фактором GreA.

4.8. Влияние Gfh-факторов на синтез полноразмерной РНК

Ранее было показано, что Gfh1-фактор *T. thermophilus* ингибирует синтез РНК на стадии элонгации транскрипции (Laptenko *et al*, 2006). Чтобы проверить, обладают ли Gfh-факторы *D. radiodurans* подобными свойствами, мы использовали ДНК, содержащую промотор λP_R , за которым следует участок длиной 26 пар оснований без остатков гуанинов в матричной цепи (рис. 4.5 А). Это позволяло получать остановленные в +26 положении относительно старта транскрипции элонгационные комплексы, добавляя к инициаторному комплексу ограниченный набор субстратов (в том числе, радиоактивно меченый по α -фосфату УТФ), не содержащий ЦТФ. К таким комплексам добавляли Gfh-факторы, после чего запускали

A



--	--	--	--

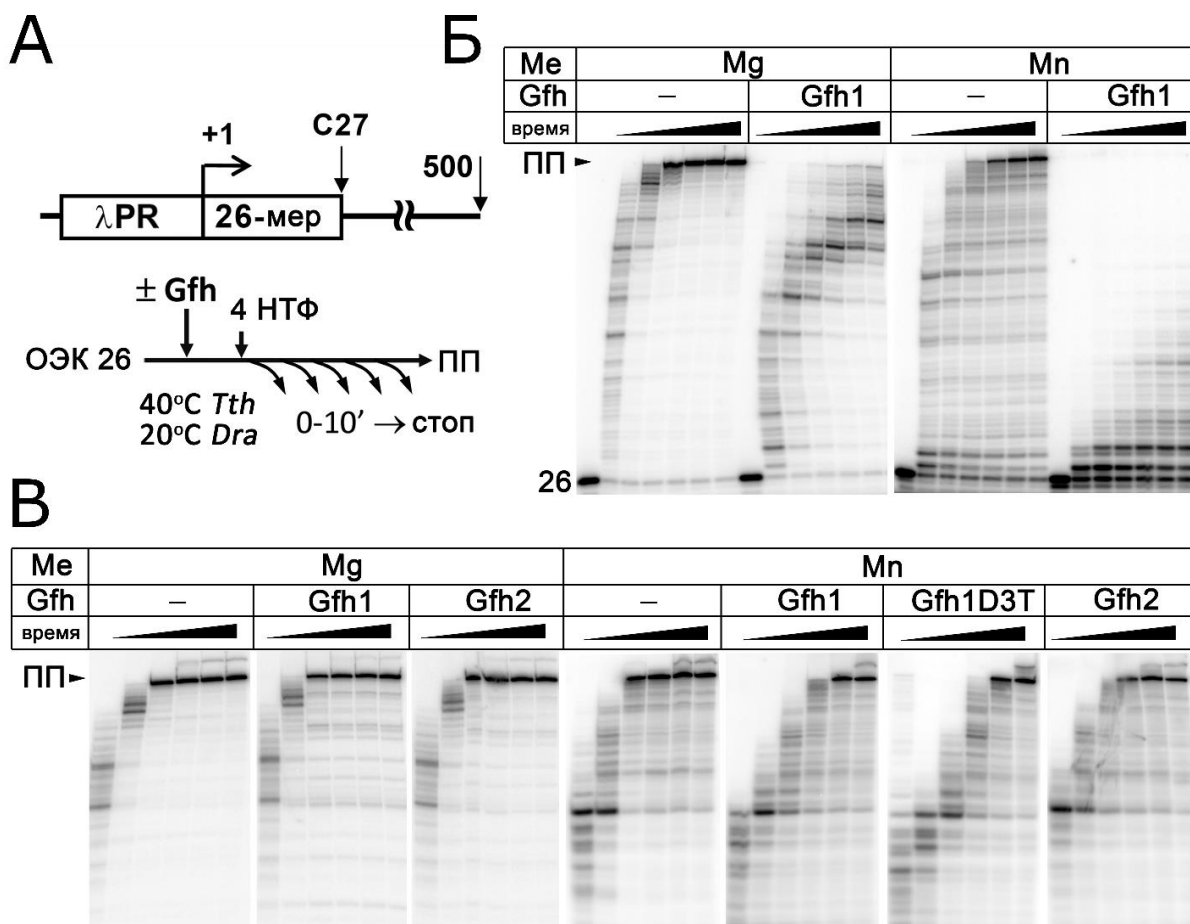


Рисунок 4.5. Влияние Gfh-факторов на элонгацию транскрипции. (А) Схема матрицы ДНК и схема проведения эксперимента. Указаны P_R -промотор фага λ , 26-нуклеотидный регион, не содержащий цитозина в РНК и 500-нуклеотидный полноразмерный продукт (ПП). Реакции проводили в присутствии ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} при pH 7.9 и останавливали после 15 с, 30 с, 1, 2, 4, и 10 мин. **(Б)** Кинетики синтеза полноразмерных продуктов РНКП *T. thermophilus*. **(В)** Кинетики синтеза полноразмерных продуктов РНКП *D. radiodurans*

Было обнаружено, что в присутствии Mg^{2+} Gfh-факторы *D. radiodurans* не влияют на скорость синтеза РНК, а в присутствии Mn^{2+} замедляют реакцию (рис. 4.5 В). Следует отметить, что в соответствии с ранее опубликованными данными Gfh1-фактор *T. thermophilus* ингибирует элонгацию транскрипции даже в присутствии Mg^{2+} (рис. 4.5 Б). При этом замена каталитического иона на Mn^{2+} значительным образом усиливает этот эффект, почти полностью блокируя удлинение РНК. Таким образом, Mn^{2+} -зависимое ингибирование элонгации транскрипции – общее свойство Gfh-факторов *D. radiodurans* и *T. thermophilus*.

Мутантный фактор Gfh1D3T, содержащий в петле N-концевого домена аминокислотные остатки, соответствующие фактору Gfh1 *T. thermophilus*, не отличается по активности в элонгации транскрипции от Gfh1-фактора *D. radiodurans* дикого типа (рис. 4.5 В). Это позволяет предполагать, что более сильный ингибиторный эффект Gfh1-фактора *T. thermophilus*, как и на стадии инициации транскрипции, не связан со строением петли N-концевого домена, а может быть объяснен особенностями структуры РНКП *T. thermophilus* и взаимодействий с другими участками Gfh1.

4.9. Влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на продолжительность транскрипционных пауз

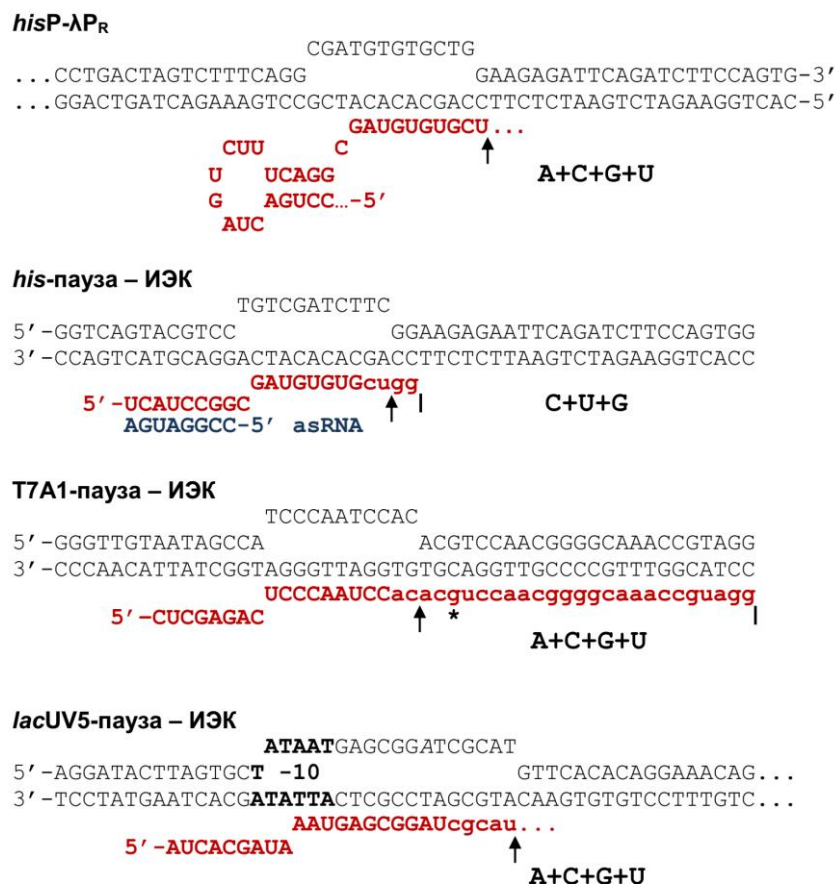


Рисунок 4.6. Матрицы и ИЭК, использованные для анализа транскрипционных пауз.

hisP- λ P_R – ДНК-матрица, содержащая промотор λ P_R (расположен левее представленной области) и сигнал *his*-паузы. Остальные последовательности – ИЭК. Верхняя цепь ДНК – нематричная, нижняя – матричная, красным выделена РНК. Стрелка указывает на положение паузы. Дополнительная пауза на T7A1 ИЭК обозначена звездочкой. Вертикальная черта обозначает место остановки транскрипции в ИЭК. Возле схем ИЭК указаны НТФ, добавляемые в реакцию для синтеза РНК

Элонгация транскрипции – не монотонный процесс. На некоторых последовательностях ДНК РНКП останавливается, сохраняя возможность продолжить синтез РНК. Такие остановки называются паузами транскрипции, а эти последовательности – сигналами паузы. Предполагается, что РНКП в состоянии паузы претерпевает конформационные перестройки, не совместимые с синтезом РНК. Элонгационный комплекс в состоянии паузы может находиться в претранслокационном состоянии (например, *his*-пауза), пост-транслокационном состоянии (T7A1-пауза и «элементарная» пауза) и смещенном состоянии (*lacUV5*-пауза) (рис. 4.6). Мы предположили, что эффект Gfh-факторов на скорость синтеза полноразмерной РНК связан именно с усилением различных пауз транскрипции, за счет избирательного связывания Gfh-факторов с такими комплексами. Для проверки этой гипотезы мы провели измерения кинетических параметров работы РНКП *D. radiodurans* на матрицах ДНК,

содержащих сигналы разных пауз. Для этого мы собирали ИЭК, в состав которых входили ДНК-матрицы, содержащие сигналы пауз (рис. 4.6) и измеряли продолжительность пауз в присутствии и в отсутствие Gfh-факторов.

4.9.1. Влияние Gfh-факторов на шпилькозависимые паузы

Сначала мы проверили активность Gfh-факторов *D. radiodurans* на паузе гистидинового оперона (*his*-пауза). Сигнал этой паузы включает последовательность, транскрибируемую в шпильку (рис. 4.6). В нашей экспериментальной системе мы имитировали шпильку добавлением короткой РНК (антисмысловая РНК – асРНК), комплементарной продукту транскрипции (рис. 4.7 А). По кинетике соотношения транскрипционных комплексов, находящихся в состоянии паузы и преодолевших паузу, вычисляли значения времени полужизни паузированного состояния. Мы обнаружили, что в присутствии ионов Mg^{2+} Gfh-факторы лишь немного увеличивают продолжительность паузы, а в буфере, содержащем Mn^{2+} , время полужизни паузы в присутствии Gfh-факторов возрастает на порядок (25 с в отсутствие Gfh-факторов, 540 с и 380 с в присутствии Gfh1 и Gfh2) (рис. 4.7 Б и В).

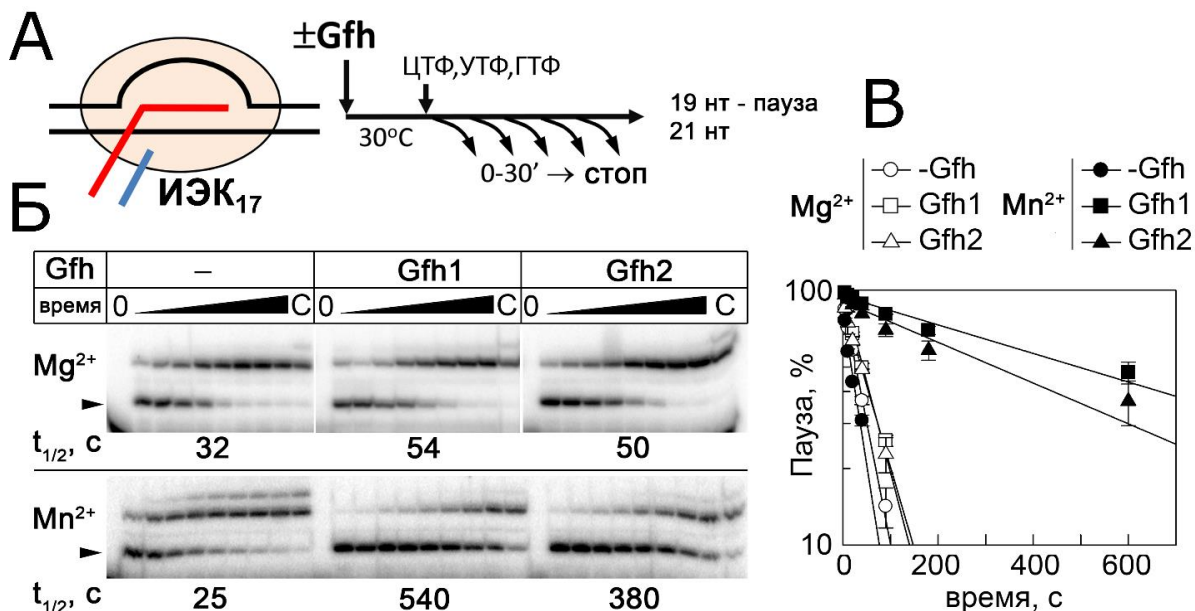


Рисунок 4.7. Влияние Gfh-факторов на *his*-паузу. (А) Схема эксперимента. ИЭК содержал РНК из 17 нуклеотидов. Реакцию запускали добавлением в смесь трех НТФ при температуре 30 °С. В результате синтезировались продукты длиной 19 нуклеотидов, что соответствует состоянию паузы, и 21 нуклеотид. (Б) Результаты эксперимента по элонгации транскрипции ИЭК, содержащим сигнал *his*-паузы в отсутствие и в присутствии Gfh-факторов *D. radiodurans* в буферах с Mg^{2+} и Mn^{2+} . Отмечена РНК, соответствующая положению паузы. Числа под графиками соответствуют времени полужизни паузированного состояния. (В) Кинетики перехода РНКП из паузированного состояния в состояние активного элонгационного комплекса, полученные на основе данных, представленных в части «Б» этого рисунка. Ось ординат логарифмическая

Для выяснения механизма этого феномена мы поставили серию схожих опытов в буферах с различными концентрациями каталитических ионов. В этом случае мы использовали РНК длиной 19 нуклеотидов, соответствующую состоянию паузы. Измеряя скорость выхода

РНКП из состояния паузы, можно понять, с чем связан ингибиторный эффект Gfh-факторов. При добавлении к таким ИЭК ГТФ получался РНК-продукт длиной 21 нуклеотид (рис. 4.8 А). Было показано, что добавление к реакционной смеси Mg^{2+} или Mn^{2+} ожидаемо приводит к появлению и возрастанию активности РНКП (рис. 4.8 Б). Полученные данные позволили вычислить кажущиеся константы диссоциации каталитических ионов: 200 ± 35 мкМ для магния и 30 ± 12 мкМ для марганца (рис. 4.8 В). Gfh1-фактор слабо влияет на аффинность ионов магния. Известно, что в активном центре РНКП помещается два каталитических иона. По-видимому, полученные нами константы относятся ко второму иону, который связан с РНКП слабее (Sosunov *et al*, 2005).

Однако кривая титрования ионов марганца в присутствии Gfh1 выглядит куполообразно: при определенной концентрации ионов марганца начинается подавление активности РНКП, за счет того, что Gfh1 усиливает транскрипционную паузу в данном комплексе (рис. 4.8 Б). Мы предполагаем, что Gfh1 увеличивает аффинность РНКП для дополнительного, третьего иона марганца, обладающего ингибирующим эффектом на фермент. Если эта гипотеза верна, то константы диссоциации для второго (необходимого для катализа) и третьего (вызывающего ингибирование) ионов Mn^{2+} , вычисленные на основе кривой титрования, составляют 117 ± 11 и 520 ± 105 мкМ, соответственно. Эти значения находятся в пределах колебаний концентрации ионов марганца в клетках *D. radiodurans* в условиях стресса (Daly *et al*, 2010; Leibowitz *et al*, 1976), следовательно, Mn^{2+} -зависимое усиление влияния Gfh-факторов на паузирование РНКП может иметь физиологическое значение.

Предположение о связывании третьего иона марганца подтверждается тем, что кривая титрования Mn^{2+} в присутствии мутантного фактора Gfh1-Ala почти не отличается от кривой для РНКП без факторов, а значит, отрицательно заряженные аминокислотные остатки петли N-концевого домена, необходимы для стимуляции паузирования РНКП Gfh-факторами *D. radiodurans* и могут участвовать в связывании третьего иона марганца.

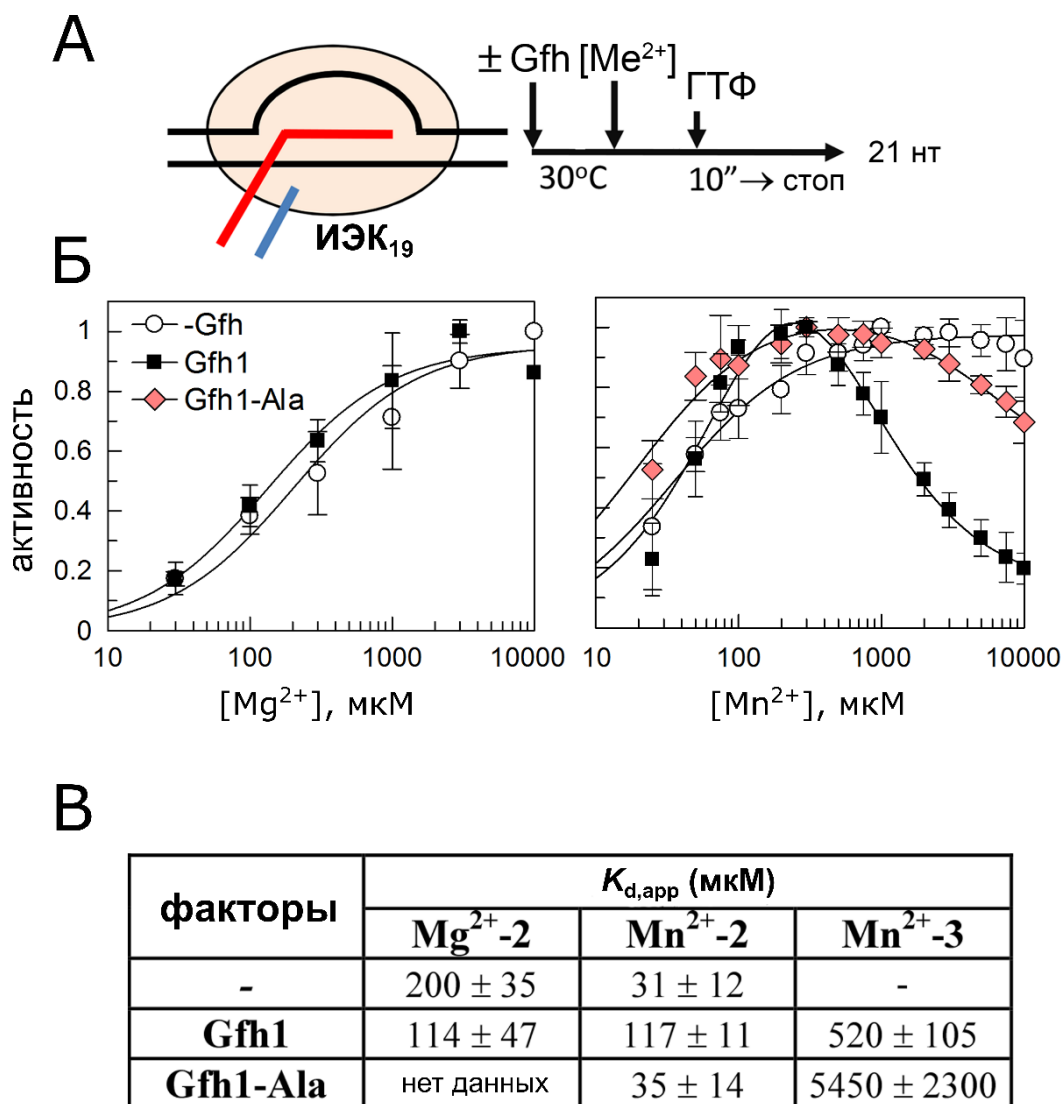


Рисунок 4.8. Влияние Gfh-факторов на кажущуюся аффинность ионов двухвалентных металлов к РНКП. (А) Схема эксперимента. К ИЭК₁₉, находившемуся в состоянии паузы, добавляли Gfh-факторы (5 μM) и MgCl_2 либо MnCl_2 в различной концентрации. Реакцию запускали добавлением в смесь ГТФ (2 μM) при температуре 30°C . В результате синтезировался продукт длиной 21 нуклеотид. **(Б) Эффективность синтеза РНК в зависимости от концентрации двухвалентных ионов в присутствии Gfh1 либо Gfh-Ala.** Активность РНКП при каждой концентрации иона нормировали к максимальной активности в том же эксперименте по титрованию ионов. **(В) Значения кажущихся констант диссоциации ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} .** 2 – второй двухвалентный ион в активном центре фермента, 3 – третий

4.9.2. Совместное влияние факторов Gfh и NusA *D. radiodurans* на продолжительность *his*-паузы

Белок NusA у *E. coli* стимулирует шпилькозависимые паузы транскрипции (Touloukhanov & Landick, 2003; Ha *et al*, 2010). Мы проверили влияние фактора NusA *D. radiodurans* на паузирование РНКП *D. radiodurans* на матрице *hisP*- λP_R , содержащей сигнал *his*-паузы, следующий за промотором λP_R (рис. 4.6). Начальный участок матрицы был устроен так же, как и в случае матрицы для измерения скорости элонгации транскрипции: за промотором следовал участок длиной 26 пар оснований без остатков гуанинов в матричной цепи, за счет

чего мы могли получать остановленные в +26 положении относительно старта транскрипции элонгационные комплексы. Затем мы добавляли транскрипционные факторы и запускали элонгацию внесением в реакционную смесь полного набора НТФ. Таким образом, мы исключали влияние исследуемых белков на инициацию транскрипции.

В соответствии с ранее полученными результатами с использованием ИЭК (раздел 4.9.1), РНКП *D. radiodurans* узнает сигнал паузы в составе этой матрицы как в присутствии Mg^{2+} , так и Mn^{2+} ($t_{1/2} = 16.1$ с и 19.1 с, соответственно) (рис. 4.9, табл. 4.2). NusA *D. radiodurans* увеличивает продолжительность *his*-паузы, причем этот эффект гораздо сильнее выражен в присутствии ионов Mg^{2+} (усиление паузы в ~ 7 раз против ~ 2 -кратного в присутствии Mn^{2+}). Gfh1 также ожидаемо усиливает паузу, но только в присутствии ионов Mn^{2+} (примерно в 4 раза). Таким образом, влияние Gfh-факторов на узнавание *his*-паузы в составе природных матриц похоже на эффекты, наблюдаемые в ИЭК. Интересно, что эффекты Gfh1 и NusA синергичны (совместно в транскрипционном буфере с Mn^{2+} увеличивают время полужизни паузы в ~ 14 раз) Это говорит о различных механизмах их активности и позволяет предполагать возможность их совместного влияния на активность РНКП в клетках *D. radiodurans*.

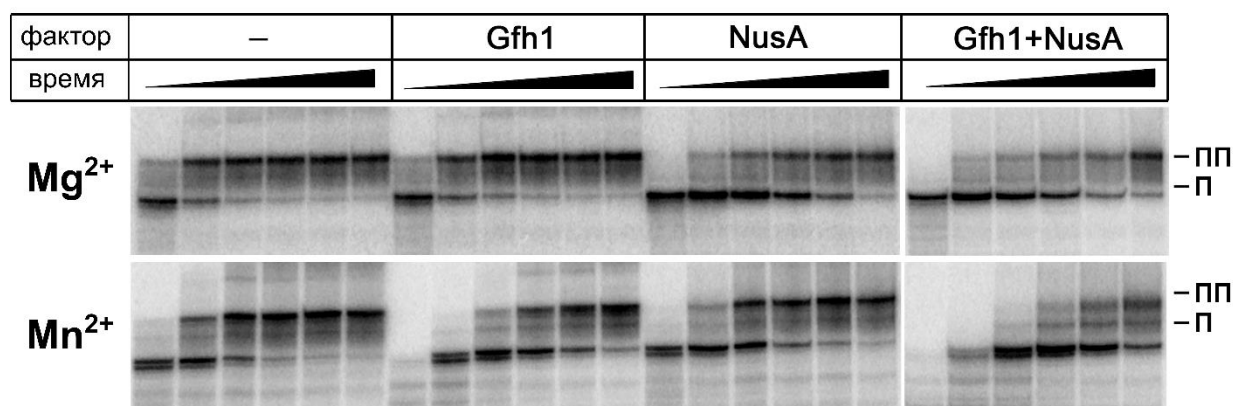
4.9.3. Активность факторов Gfh1 и NusA *D. radiodurans* в стимуляции других типов пауз

Помимо *his*-паузы, когда элонгационный комплекс находится в претранслокационном состоянии, мы исследовали влияние Gfh-факторов на паузированные элонгационные комплексы, находящиеся в пост-транслокационном и в смещенном состояниях (рис. 4.6). В этих экспериментах мы использовали Gfh1, поскольку он стимулирует паузу сильнее Gfh2. Кроме того, мы исследовали эффекты NusA в тех же модельных *in vitro* системах.

Сначала мы проверили влияние Gfh1 и NusA на формирование «элементарной» паузы. Ранее было показано, что элементарная пауза предшествует образованию других типов пауз (Komissarova & Kashlev, 1997a; Kireeva & Kashlev, 2009; Kang *et al*, 2018a). В частности, элементарная пауза является первым этапом образования шпилькозависимых пауз, и её можно детектировать даже в отсутствие шпильки в РНК. При формировании элементарной паузы элонгационный комплекс находится в пост-трансляционном состоянии.

Анализ элементарной паузы проводили в тех же ИЭК, что использовались для моделирования *his*-паузы, но в отсутствие короткой РНК, имитирующей шпильку (табл. 4.2). Было показано, что в присутствии Mn^{2+} РНКП, хоть и менее эффективно, чем при наличии шпильки, узнает сигнал паузы (табл. 4.2; $t_{1/2} = 23.3$ с, по сравнению с $t_{1/2} = 32$ с на рис. 4.7 Б). Gfh1 несколько увеличивает (в 3 раза) продолжительность этой паузы, а NusA не оказывает на неё никакого влияния, ни сам по себе, ни в присутствии Gfh1-фактора.

А



Б

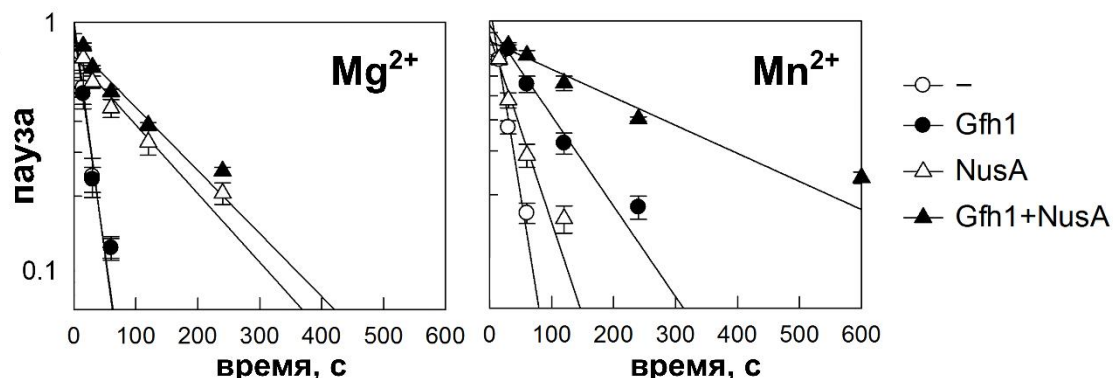


Рисунок 4.9. Влияние Gfh1 и NusA на *his*-паузу. (А) Результаты эксперимента по транскрипции на матрице λP_R -*hisP*, содержащей сигнал *his*-паузы, в присутствии 10 мМ Mg^{2+} или Mn^{2+} , а также факторов Gfh1 и NusA. Обозначены положения паузы (П) и полноразмерного продукта (ПП). (Б) Кинетика перехода РНКП из паузированного состояния в состояние активного элонгационного комплекса. Эффективность паузы считали как долю элонгационных комплексов, находящихся в состоянии паузы на основе данных из А. Ось ординат логарифмическая

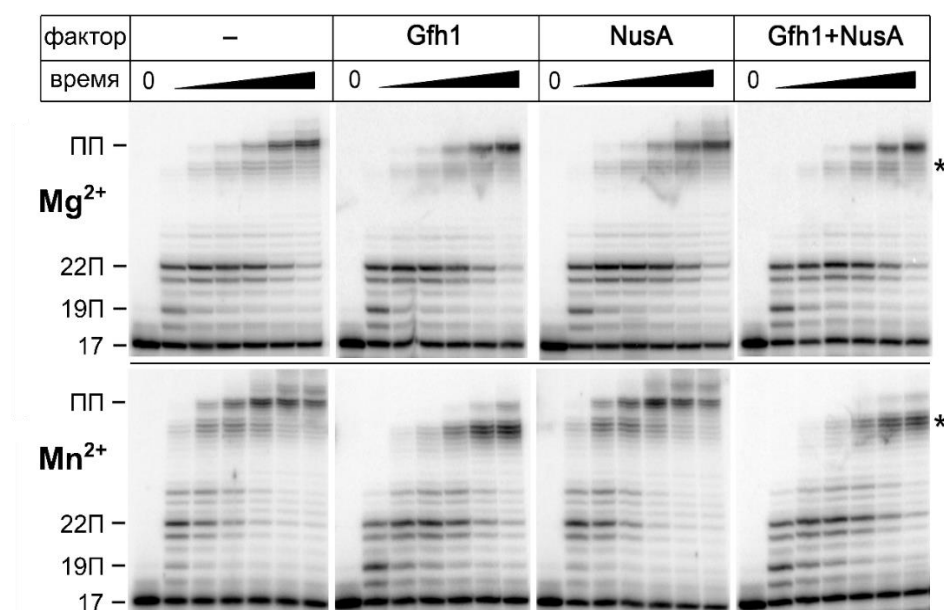
Таблица 4.2. Влияние Gfh1 и NusA на формирование шпилькозависимой и элементарной паузы транскрипции РНКП *D. radiodurans*

Ион	Время полужизни паузы $t_{1/2}$ (с)			
	-	+Gfh1	+NusA	+NusA +Gfh1
λP_R-<i>hisP</i>				
Mg^{2+}	16.1 ± 0.5 1	18.4 ± 3.2 1.1	117 ± 19 7.3	119 ± 7 7.4
Mn^{2+}	19.5 ± 1.0 1	80 ± 6 4.1	40.1 ± 5.1 2.1	270 ± 8 13.7
«Элементарная» пауза (ИЭК <i>hisP</i>-acРНК)				
Mn^{2+}	23.3 ± 1.0 1	69.9 ± 6.2 3.0	19.2 ± 1.8 0.8	69.8 ± 1.8 3.0

Транскрипцию проводили в присутствии 10 мМ $MgCl_2$ или $MnCl_2$. Полу жирным показаны изменения относительно $t_{1/2}$ для реакции без факторов.

Затем мы провели аналогичные опыты для Т7А1-паузы. В этом случае паузированный комплекс также может переходить в пост-транслокационное состояние и даже связывать следующий НТФ, но не может включать его в РНК (Kireeva & Kashlev, 2009). Мы обнаружили, что РНКП *D. radiodurans* на данной ДНК-матрице образует два типа паузированных комплексов: с РНК длиной 19 и 22 нуклеотида. Обе паузы подавляются в присутствии ионов Mn^{2+} (рис. 4.10). Аналогичные наблюдения ранее были сделаны для РНКП *E. coli* и *T. thermophilus* (Kireeva & Kashlev, 2009). Как и ожидалось, Gfh1 не влияет на эффективность паузы в присутствии ионов Mg^{2+} , однако значительным образом увеличивает её в присутствии Mn^{2+} . NusA в этом тесте не проявил никакой активности вне зависимости от присутствия в реакционной смеси ионов магния или марганца, а также Gfh1-фактора.

А



Б

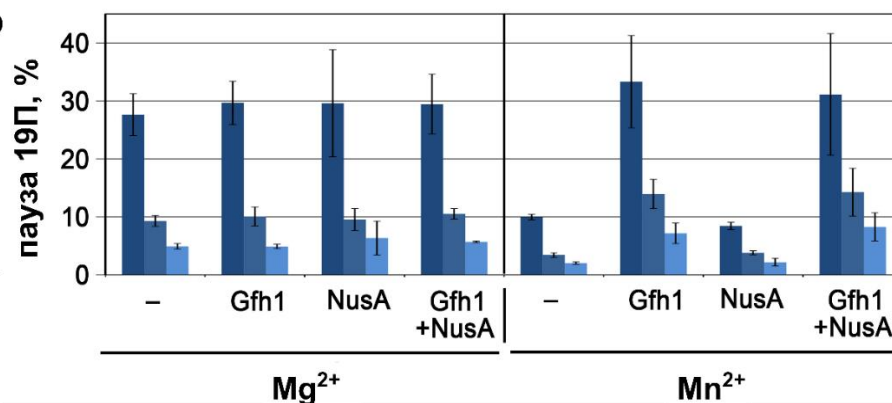


Рисунок 4.10. Влияние Gfh1 и NusA на Т7А1-паузу. (А) Анализ РНК-продуктов, синтезированных на Т7А1-матрице. Показаны позиции исходной РНК длиной 17 нуклеотидов, а также паузы на 19 и 22 нуклеотидах и полноразмерный продукт (ПП). Неохарактеризованная пауза вблизи конца матрицы указана звездочкой. Реакцию останавливали через 4, 10, 20, 40, 90 и 180 секунд. (Б) Эффективность 19-нуклеотидной паузы высчитывали как процентную долю 19-нуклеотидных продуктов от суммарного количества всех РНК длинее 18 нуклеотидов (на основе данных из А). Использованные временные точки: 4, 10 и 20 с

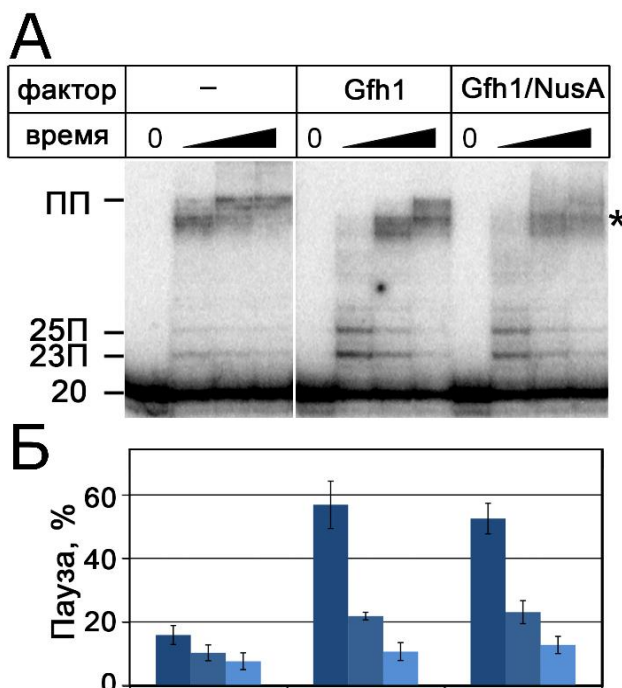


Рисунок 4.11. Влияние Gfh1 и NusA на паузу, зависящую от обратного смещения элонгационного комплекса. (А) РНК-продукты, синтезированные на матрице, содержащей сигнал *lacUV5*-паузы. Указана исходная 20-нуклеотидная РНК, 23- и 25-нуклеотидные продукты, соответствующие паузам транскрипции, а также полноразмерный продукт (ПП). Звездочкой обозначена Gfh1-зависимая остановка РНКП вблизи конца матрицы. Реакции проводили в течение 30, 120 и 600 с

(Б) Процентная доля 23- и 25-нуклеотидных продуктов от суммы всех продуктов длиной более 22 нуклеотидов в дорожках, соответствующих трем временным точкам

Обратное смещение РНКП – один из наиболее распространенных механизмов образования транскрипционных пауз и необходимое событие для исправления ошибок транскрипции. Некоторые последовательности ДНК способствуют обратному смещению РНКП. Например, такая последовательность располагается в начально-транскрибируемой области промотора *lacUV5*; она вызывает обратное смещение РНКП и паузу транскрипции, которая стимулируется σ -субъединицей РНКП. Ранее такая пауза была охарактеризована для РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* (Жилина *et al*, 2011; Perdue & Roberts, 2010).

Мы исследовали данный тип паузы на РНКП *D. radiodurans*. Для этого мы собирали ИЭК (рис. 4.6), содержащий последовательность *lacUV5*-паузы в составе ДНК, и анализировали влияние Gfh1 и NusA на эту паузу в присутствии ионов марганца. Мы обнаружили, что Gfh1 значительно усиливает паузу (~55% комплексов в паузированном состоянии после 30 секунд протекания реакции против ~15% в отсутствие Gfh1), а NusA не оказывает на неё никакого влияния (рис. 4.11).

4.10. Активность факторов Gfh и NusA *D. radiodurans* в терминеции транскрипции

Обнаруженное нами влияние Gfh-факторов на паузы позволило предположить, что они также могут усиливать терминецию транскрипции, так как процессу терминеции также предшествует пауза в синтезе РНК. Для измерения эффективности терминеции транскрипции мы использовали ДНК-матрицу, содержащую промотор *galP1*, за которым следует 20-ти нуклеотидная последовательность без остатков урацила и терминаторная последовательность tR2 фага λ (рис. 4.12 А). Таким образом, мы могли получать остановленные элонгационные комплексы добавлением неполного набора субстратов, а

затем вносить в реакционную смесь исследуемые факторы, тем самым исключив их влияние на инициацию транскрипции.

Было показано, что РНКП *D. radiodurans* способна узнавать данный терминатор транскрипции. Замена каталитического иона Mg^{2+} на Mn^{2+} приводит к снижению эффективности терминации транскрипции (~60% в присутствии Mg^{2+} и ~20% в присутствии Mn^{2+} ; рис. 4.12 Б). Как и ожидалось, Gfh-факторы не оказывают влияния на терминацию в присутствии ионов Mg^{2+} . В присутствии Mn^{2+} Gfh-факторы значительно повышают эффективность терминации (до ~60% в случае Gfh1). NusA стимулирует терминацию в обоих вариантах транскрипционных буферов, причем этот эффект суммируется с действием Gfh-факторов. В результате совместно Gfh и NusA повышают эффективность терминации в присутствии Mn^{2+} до уровня, наблюдаемого в реакциях с ионами магния.

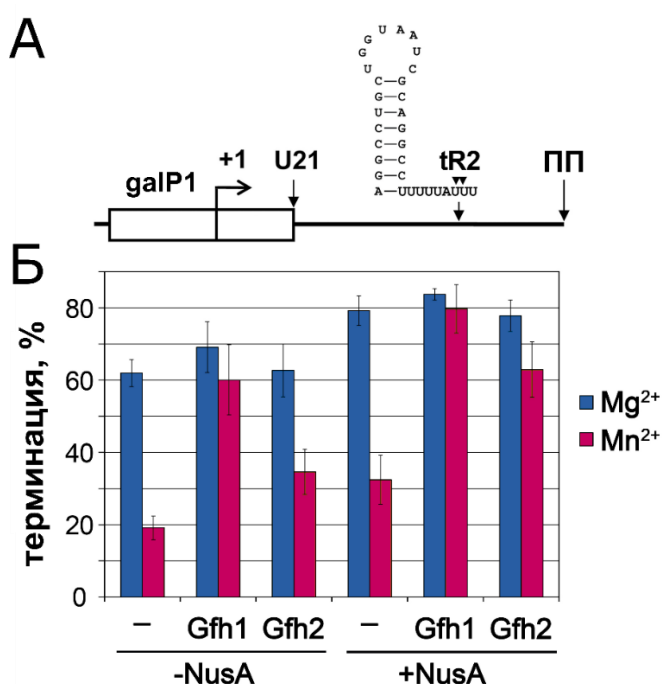


Рисунок 4.12. Влияние Gfh1 и NusA на терминацию транскрипции. (А) Схема матрицы *galP1*-tR2, использованной в эксперименте. Показаны промотор *galP1*, точка старта транскрипции, 20-нуклеотидный фрагмент РНК, не содержащий урацилов и последовательность терминаторной шпильки. ПП – полноразмерный продукт.

(Б) Эффективность терминации транскрипции [tR2/(tR2+ПП)] на матрице *galP1*-tR2 в зависимости от присутствия в реакции ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} , а также Gfh-факторов и NusA *D. radiodurans*

4.11. Транскрипция поврежденной ДНК РНКП *D. radiodurans*

ДНК любого живого организма постоянно повреждается. Это может быть результатом ошибок работы белковых систем, обслуживающих наследственный аппарат клетки, а может являться следствием воздействия экзогенных факторов, таких как алкилирующие агенты или ионизирующее излучение (Friedberg, 2003). Поврежденные участки ДНК нередко представляют собой препятствия для РНКП (Saxowsky & Doetsch, 2006). Основная часть исследований была проведена на РНКП *E. coli*. Было показано, что такие препятствия осложняют транскрипцию, поскольку снижают точность и скорость работы РНКП (Viswanathan & Doetsch, 1998; Zhou & Doetsch, 1993; Liu & Doetsch, 1996). С другой стороны, РНКП может выступать в роли сенсора повреждений в ДНК и способствовать эффективной репарации (Mellon *et al*, 1987; Selby & Sancar, 1993; Selby, 2017). Поскольку *D. radiodurans*

переносит неблагоприятные условия, приводящие к многочисленным повреждениям ДНК (см. Обзор литературы), можно было ожидать, что РНКП этой бактерии отличается по своей способности к транскрипции поврежденных матриц. Для проверки этой гипотезы мы исследовали активность РНКП *D. radiodurans* в составе ИЭК, содержащих поврежденную ДНК. Мы проверили в различных тестах 6 повреждений ДНК: 8-оксогуанин, 6-О-метилгуанин, тимин-гликоль, АП-сайт, тиминовый димер и 1,N6-этенoadенин (рис. 4.13). С использованием этих матриц мы исследовали эффективность и точность транскрипции РНКП *D. radiodurans* на поврежденных матрицах. В контрольных экспериментах были использованы аналогичные матрицы, не содержащие поврежденных нуклеотидов.

4.12. Точность синтеза РНКП *D. radiodurans* на поврежденных матрицах

Для измерения точности синтеза РНК на поврежденной ДНК мы собирали минимальные ИЭК, содержащие поврежденный нуклеотид в матричной цепи ДНК в следующем положении после 3'-конца РНК, и добавляли к таким комплексам один из четырех НТФ (рис. 4.14). В случае контрольных неповрежденных матриц РНКП *D. radiodurans* встраивает новые нуклеотиды в РНК-продукт согласно принципу комплементарности. Интересно отметить, что в буфере с Mn^{2+} точность РНКП несколько падает: например, напротив G включается некомплементарный U вместо C.

Наличие поврежденного нуклеотида в матрице значительно влияет на точность включения нуклеотидов. Напротив 8-оксогуанина включается не только C, но и A, причем в присутствии Mn^{2+} A встраивается с большей эффективностью. Напротив 6-О-метилгуанина преимущественно встраивается U. Напротив АП-сайта РНКП включает A, U и G в присутствии Mn^{2+} и демонстрирует лишь очень слабое включение A в присутствии Mg^{2+} . На матрице с тимин-гликолем РНКП включает напротив повреждения только A в буфере с Mg^{2+} , а при замене каталитического иона на Mn^{2+} также встраивает в небольшой пропорции G. Во всех указанных выше случаях НТФ добавляли в небольшой концентрации 10 мкМ. Для того, чтобы детектировать синтез РНК на матрицах, содержащих тиминовый димер и 1,N6-этенoadенин, которые значительно нарушают структуру ДНК, концентрация НТФ была повышена до 1 мМ. В этих условиях на контрольных матрицах наблюдается включение некомплементарных нуклеотидов из-за отсутствия в смеси правильных субстратов. При этом РНКП *D. radiodurans* в присутствии Mg^{2+} не может проводить синтез на матрице с 1,N6-этенoadенином, а в присутствии Mn^{2+} примерно с одинаково низкой эффективностью включает все 4 НТФ. При синтезе РНК на матрице с тиминовым димером РНКП отдает предпочтение пуриновым нуклеотидам, при этом в присутствии Mg^{2+} включает только один нуклеотид, а в присутствии Mn^{2+} включает напротив повреждения два A подряд.

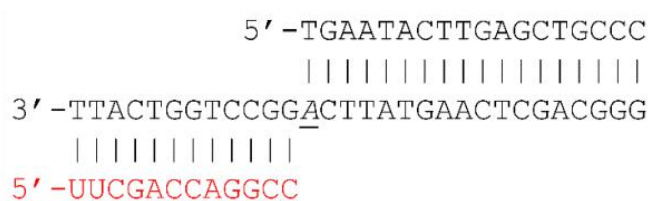
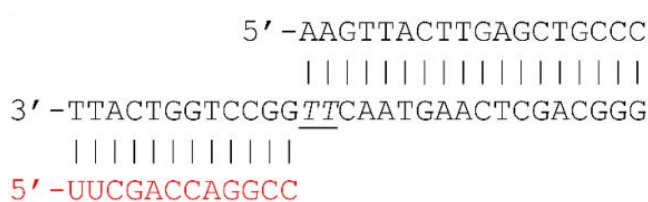
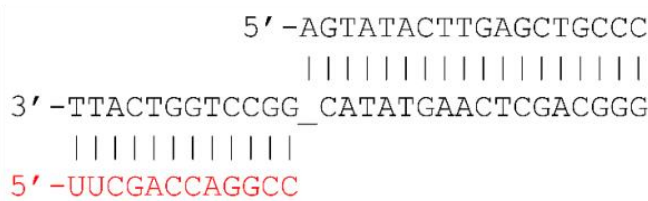
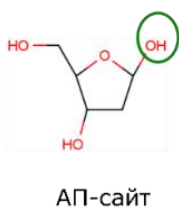
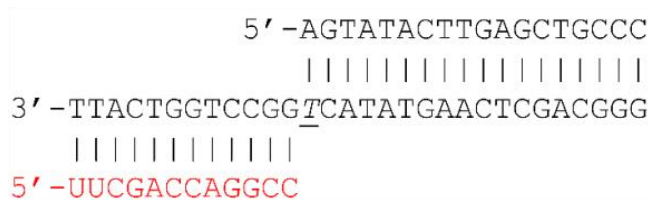
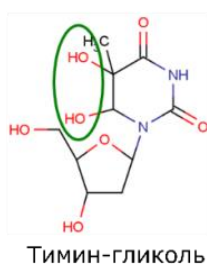
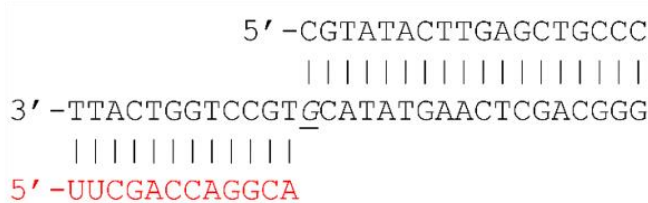
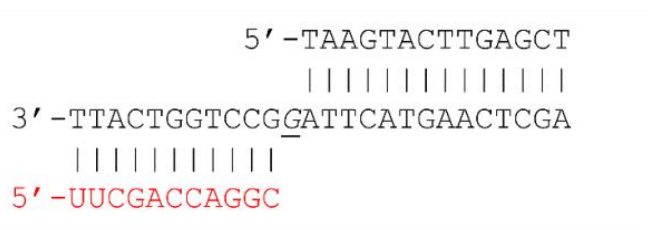


Рисунок 4.13. Исследованные повреждения ДНК и минимальные ИЭК. Верхняя цепь ДНК – нематричная, нижняя – матричная, красным выделена последовательность РНК. Изображенные повреждения находятся в матричной цепи ДНК в позициях, обозначенных подчеркиванием

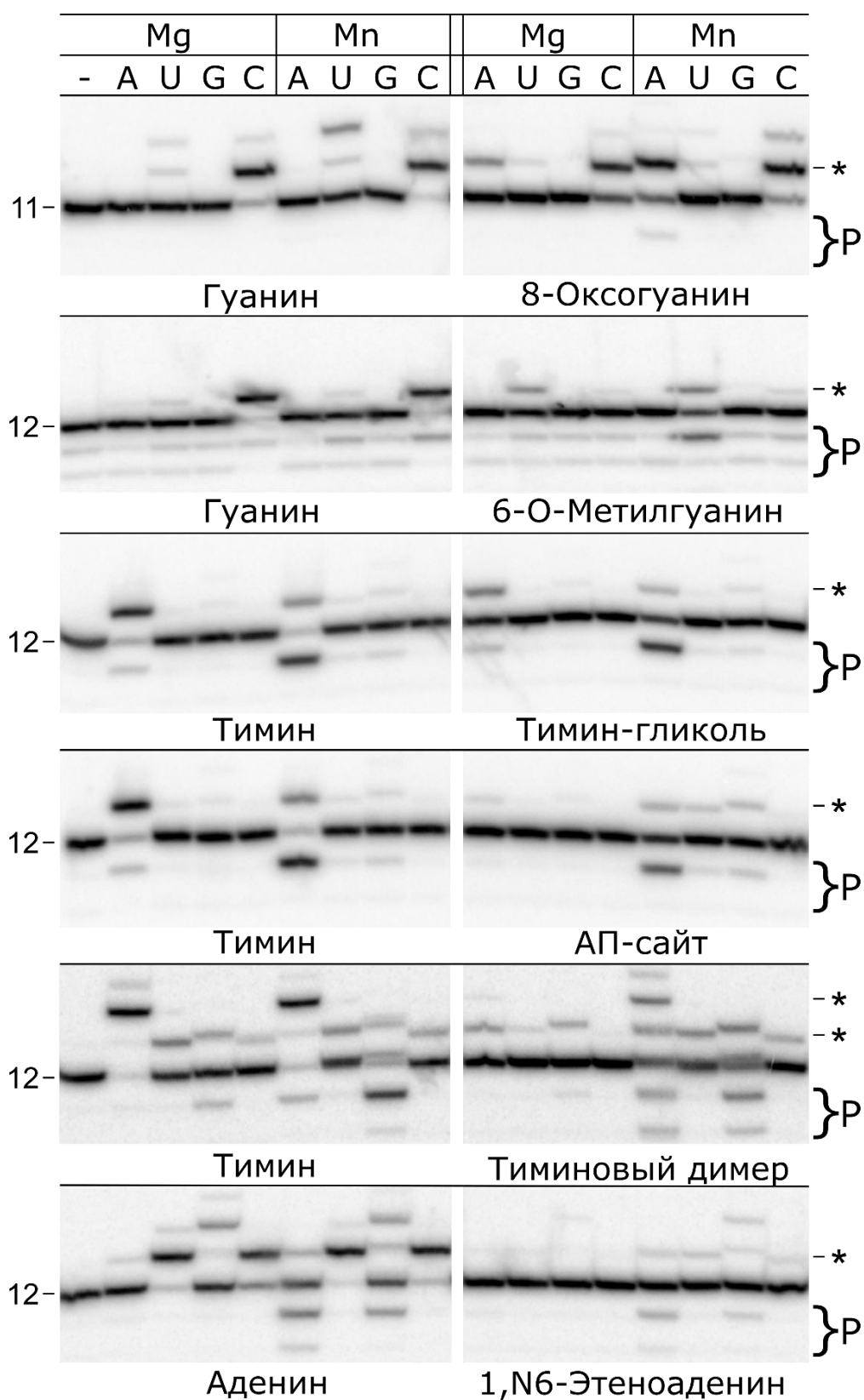


Рисунок 4.14. Точность работы РНКП на поврежденных матрицах. Представлены результаты синтеза РНК на минимальных ИЭК после добавления одного из НТФ в присутствии 10 мМ Mg^{2+} или Mn^{2+} . Отмечены положения исходной РНК (11 или 12 нуклеотидов), поврежденных нуклеотидов в матрице (звездочкой) и продуктов расщепления РНК (Р) Реакцию на матрицах с 8-оксогуанином, 6-О-метилгуанином, тимин-гликолем и АП-сайтом проводили в присутствии 10 мкМ НТФ, а на матрицах с тиминовым димером и 1,N6-этенoadенином – в присутствии 1 мМ НТФ

Во всех случаях Mn^{2+} не только снижает точность включения нуклеотида, но и стимулирует расщепление РНК в активном центре РНКП *D. radiodurans*. Эндонуклеазное расщепление чаще всего происходит по второй с 3'-конца фосфоэфирной связи в РНК после включения нуклеотида напротив повреждения, поэтому продукт оказывается на один нуклеотид короче исходной РНК (рис. 4.14). РНКП практически не расщепляет РНК в буфере с Mg^{2+} . В то же время в буфере с ионами Mn^{2+} значительная часть удлиненной РНК подвергается расщеплению на матрицах, содержащих 6-О-метилгуанин, АП-сайт, тиминовый димер и тимин-гликоль. Можно предполагать, что присутствие Mn^{2+} стимулирует обратное смещение РНКП либо её эндонуклеазную активность. Полученные результаты не позволяют однозначно ответить на этот вопрос.

4.13. Влияние Gfh на РНКП *D. radiodurans* при транскрипции поврежденных матриц

Следующим этапом работы стала оценка влияния повреждений на эффективность удлинения РНК в зависимости от присутствия Gfh-факторов. Для этого мы использовали те же ИЭК, только добавляли к ним набор из трех НТФ, что позволяло остановить синтез РНК вскоре после поврежденного нуклеотида (за счет отсутствия четвертого НТФ) (рис. 4.15). Чтобы исследовать влияние на транскрипцию поврежденной ДНК Gfh-факторов, которые активны в присутствии Mn^{2+} , мы проводили все реакции в транскрипционном буфере с этим ионом. Минимальный ИЭК, содержащий 8-оксогуанин, оказался неподходящим для этих экспериментов: мы наблюдали образование дополнительных неспецифических пауз транскрипции вызванных, предположительно, слишком малой длиной дуплекса ДНК, находящегося спереди от РНКП (данные не приведены). Поэтому в случае этого повреждения мы собирали ИЭК, содержащий 8-оксогуанин в составе длинной двунитевой ДНК, и добавляли в реакционную смесь полный набор НТФ (рис. 4. 16). В случае большинства контрольных матриц наблюдалось образование некоторых неспецифических пауз транскрипции. Вероятно, это связано с не установленными особенностями использованных олионуклеотидов.

Тем не менее, это не мешает заметить, что все исследованные в этой работе повреждения ДНК приводят к образованию транскрипционных пауз РНКП *D. radiodurans* (рис. 4.15 и 4.16). Видно, что РНКП испытывает трудности с включением нуклеотидов напротив повреждения: в случае тиминового димера и 1,N6-этенoadенина значительная часть исходной РНК не удлиняется, а на матрицах с остальными повреждениями нуклеотиды

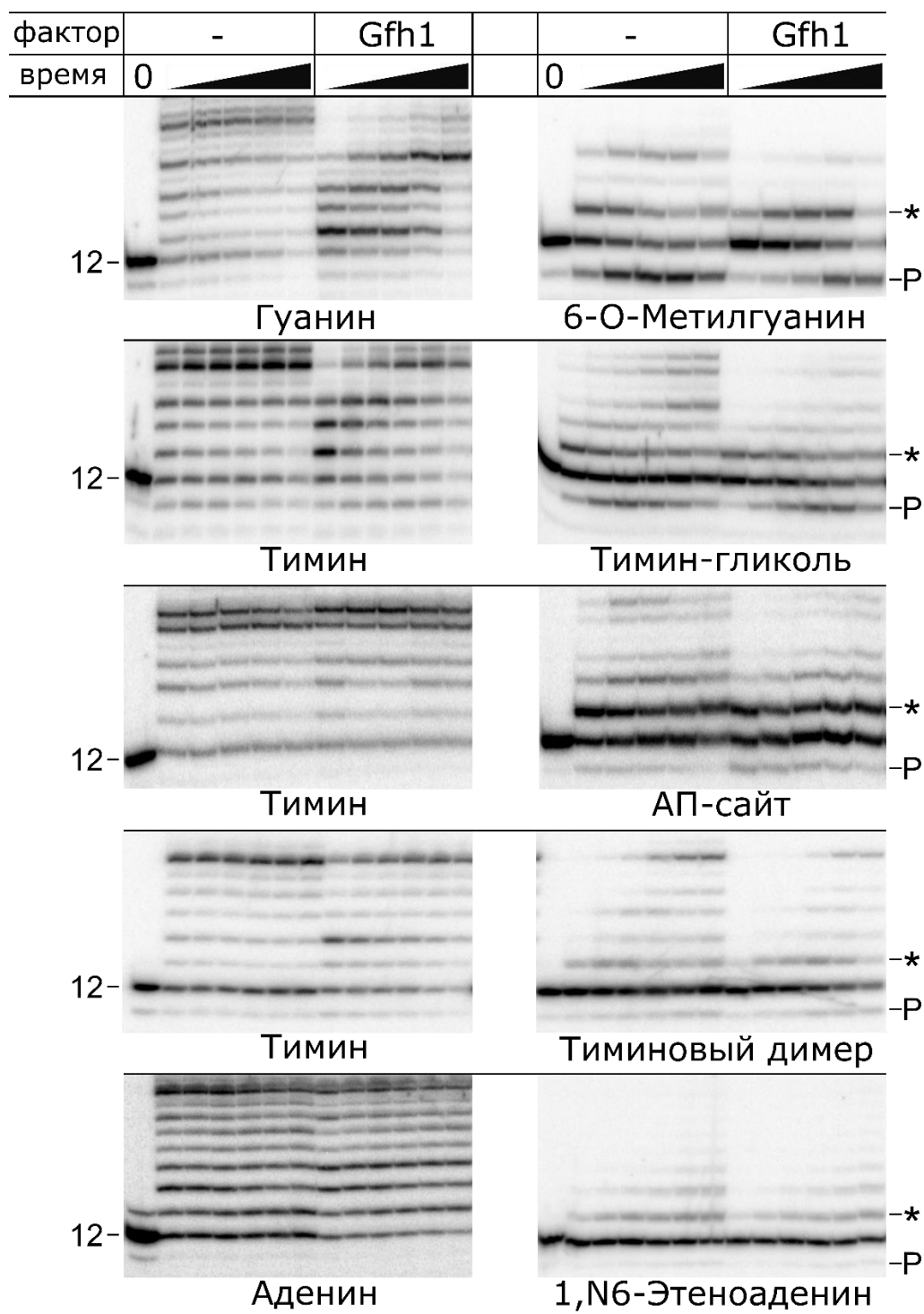


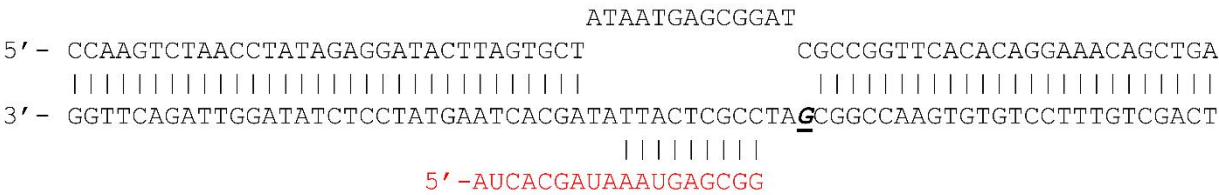
Рисунок 4.15. Влияние Gfh1-фактора *D. radiodurans* на эффективность транскрипции поврежденных матриц. Представлены результаты синтеза РНК на минимальных ИЭК после добавления набора из трех НТФ в присутствии 10 мМ Mn^{2+} . Отмечены позиции исходной РНК (12 нуклеотидов), повреждения (звездочкой) и продукта расщепления РНК (Р)

напротив повреждения присоединяются медленнее, чем в контрольных экспериментах. Кроме того, даже если исходная РНК удлиняется на 1 нуклеотид, то нарушенная геометрия дуплекса ДНК-РНК, по-видимому, осложняет дальнейший синтез РНК. В этой ситуации РНКП может смещаться в обратную относительно направления синтеза сторону и отщеплять динуклеотид с 3'-конца РНК с образованием РНК-продукта длиной на один нуклеотид

короче исходной. Это хорошо видно на примере матриц, содержащих 6-О-метилгуанин и тимин-гликоль. На матрице, содержащей 1,N6-этенoadенин, расщепление РНК практически не детектируется. Можно предположить, что это азотистое основание, находясь в активном центре фермента, препятствует обратному смещению элонгационного комплекса. Отсутствие расщепленных продуктов в случае 8-оксогуанина можно объяснить тем, что в присутствии полного набора субстратов (добавлявшихся в случае именно этой матрицы) РНК очень быстро вновь удлиняется. Кроме того, на длинных матрицах РНКП может быть менее склонна к обратному смещению.

Затем аналогичные опыты были проведены в присутствии Gfh1-фактора. Было показано, что Gfh1 во всех случаях усиливает паузы, ингибируя присоединение нуклеотидов напротив поврежденного основания ДНК, включение последующих нуклеотидов, а также расщепление РНК. Интересно, что эффекты Gfh1 можно заметить также и на контрольных матрицах, что, по-видимому, объясняется его способностью действовать на разные типы транскрипционных пауз, в том числе, не связанных с повреждением ДНК.

А



Б

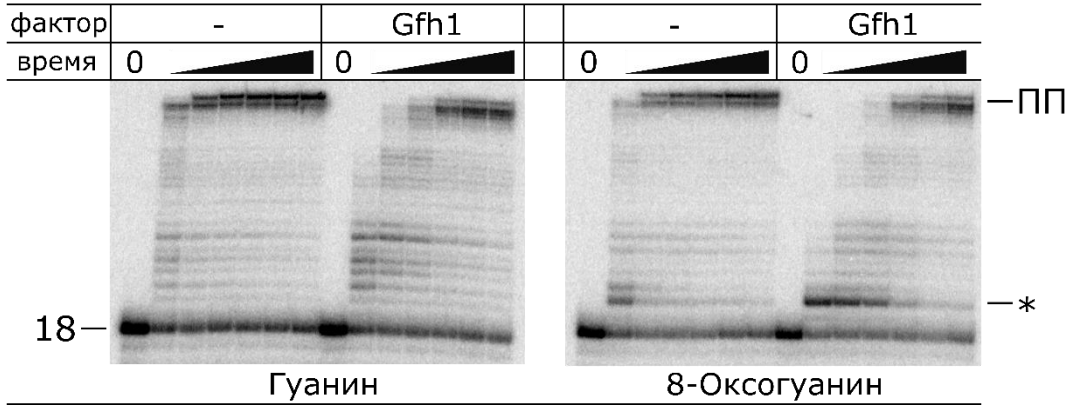


Рисунок 4.16. Влияние Gfh1-фактора *D. radiodurans* на эффективность транскрипции матрицы ДНК, содержащей 8-оксогуанин. (А) Схема ИЭК. Верхняя цепь ДНК – нематричная, нижняя – матричная, красным выделена последовательность РНК. В подчеркнутой позиции матричной ДНК находится 8-оксогуанин. (Б) Результаты синтеза РНК на ИЭК после добавления четырех НТФ в присутствии 10 мМ Мп²⁺. Отмечены позиции исходной РНК (18 нуклеотидов), повреждения (звездочкой) и полноразмерного продукта (ПП)

4.14. Влияние факторов Gfh и Mfd *D. radiodurans* на транскрипцию поврежденных матриц

Транслоказа Mfd – это один из белков, способных взаимодействовать с элонгационными комплексами, находящимися в состоянии паузы в клетке *E. coli*, и приводить к их диссоциации (Park *et al*, 2002; Deaconescu *et al*, 2006; Selby & Sancar, 1993; Selby, 2017). Для проверки воздействия Mfd на РНКП *D. radiodurans* мы клонировали ген *mfd* *D. radiodurans* в экспрессионный вектор, экспрессировали его в клетках *E. coli* и получили белок Mfd в очищенном виде.

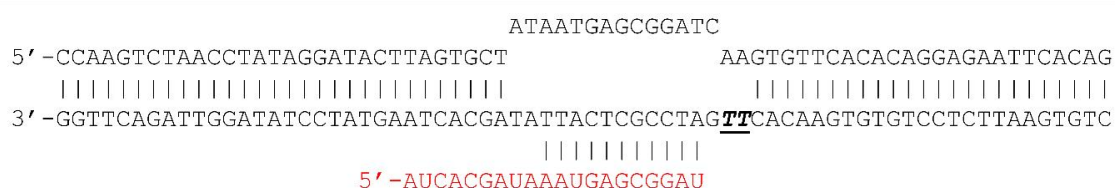
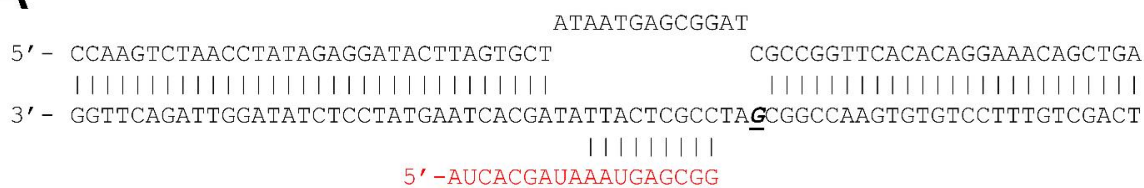
При исследовании белка Mfd *E. coli* ранее было показано, что он связывается с ДНК позади РНКП, а затем с затратой АТФ смещает РНКП вперед, что приводит к диссоциации элонгационного комплекса (Park *et al*, 2002; Deaconescu *et al*, 2006; Le *et al*, 2018). Для того, чтобы Mfd мог связаться с ДНК сзади от РНКП, мы использовали ИЭК, содержащие достаточно длинный дуплекс ДНК сзади от места посадки РНКП (43 пары нуклеотидов от 3'-конца РНК). Эксперименты были проведены на примере матриц с 8-оксогуанином, 6-О-метилгуанином, тимин-гликолем либо тиминовым димером (рис. 4.17 А). Эти реакции также проводили в буфере, содержащем ионы Mn^{2+} . В качестве источника энергии для Mfd мы добавляли в реакции 1 мМ дАТФ, поскольку было показано, что Mfd может использовать его вместо АТФ, а РНКП, наоборот, обладает высокой селективностью против дНТФ (Smith & Savery, 2008; Svetlov *et al*, 2004).

Было показано, что, как и в случае коротких матриц (рис. 4.15), повреждения ДНК вызывают остановку транскрипции, а Gfh1 в этих условиях усиливает паузу на поврежденном участке ДНК (рис. 4.17 Б). Так как белок Mfd приводит к необратимой инактивации транскрипционного комплекса, его эффект можно детектировать по количеству РНК-продуктов, не удлиняющихся даже в последней временной точке (20 минут). Было показано, что Mfd в разной степени влияет на транскрипцию на разных матрицах: например, присутствие Mfd заметно увеличивает количество продукта, соответствующего состоянию элонгационного комплекса, остановившегося напротив тиминового димера, в то время как на матрице с 8-оксогуанином этот эффект почти не заметен.

В то же время совместное действие Gfh1 и Mfd несколько увеличивает количество РНК-продукта, соответствующего состоянию паузы, в последней временной точке на матрице, содержащей тиминовый димер и 8-оксогуанин. Это может являться результатом диссоциации паузированных элонгационных комплексов под действием Mfd. Чтобы проверить это предположение, мы провели аналогичный опыт с использованием ИЭК, который был связан со стрептавидиновой смолой через биотин, присоединенный к 5'-концу нематричной цепи ДНК. Это позволило нам отделять РНК, находящуюся на смоле в составе

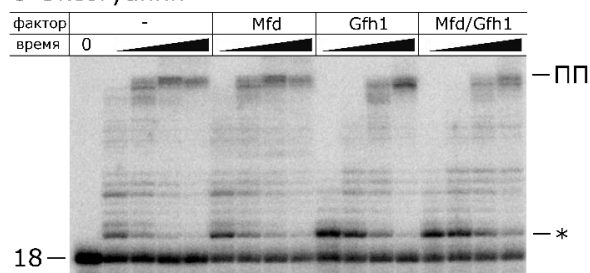
элонгационных комплексов, от РНК, высвобождаемой в раствор в результате их диссоциации (рис. 4.18).

А

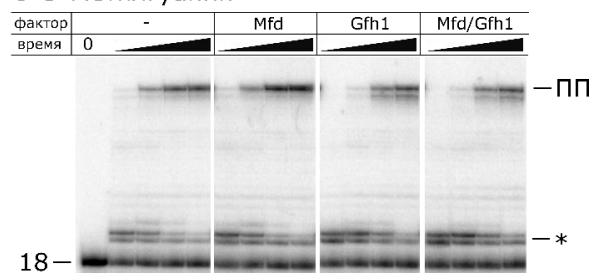


Б

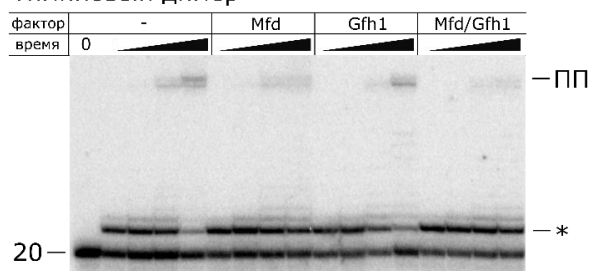
8-Оксогуанин



6-О-Метилгуанин



Тиминовый димер



Тимин-гликоль

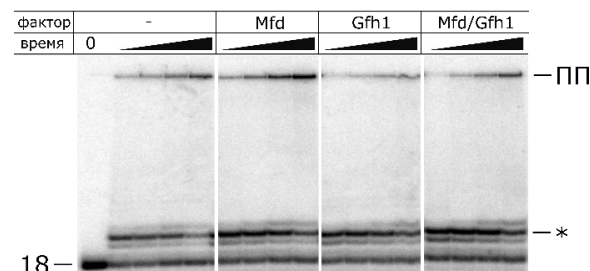


Рисунок 4.17. Влияние Mfd и Gfh1-фактора *D. radiodurans* на эффективность транскрипции поврежденных матриц. (А) Схемы ИЭК. Верхняя цепь ДНК – нематричная, нижняя – матричная, красным выделена последовательность РНК. В подчеркнутой позиции матричной ДНК находится 8-оксогуанин, 6-О-метилгуанин, тимин-гликоль, либо тиминовый димер. (Б) Результаты синтеза РНК на ИЭК после добавления четырех НТФ и 1мМ дАТФ в присутствии 10 мМ Mn^{2+} . Отмечены позиции исходной РНК (18 или 20 нуклеотидов), повреждения (звездочкой) и полноразмерного продукта (ПП)

В реакции, не содержащей транскрипционных факторов, в супернатанте появляется только полноразмерная РНК, поскольку элонгационный комплекс диссоциирует только после достижения конца матрицы. Gfh1-фактор ожидаемо не влияет на транскрипцию в присутствии ионов Mg^{2+} и усиливает транскрипционные паузы, вызванные наличием 8-оксогуанина в матричной ДНК в присутствии Mn^{2+} , но при этом РНК при образовании пауз остается в составе элонгационных комплексов. В присутствии Mfd появляется большое количество диссоциировавших в раствор РНК-продуктов разного размера, в том числе заметное количество РНК, соответствующей паузам перед включением нуклеотида напротив 8-оксогуанина и перед включением следующего нуклеотида (РНК длиной 20 и 21 нт, рис. 4.18).

8-Оксогуанин

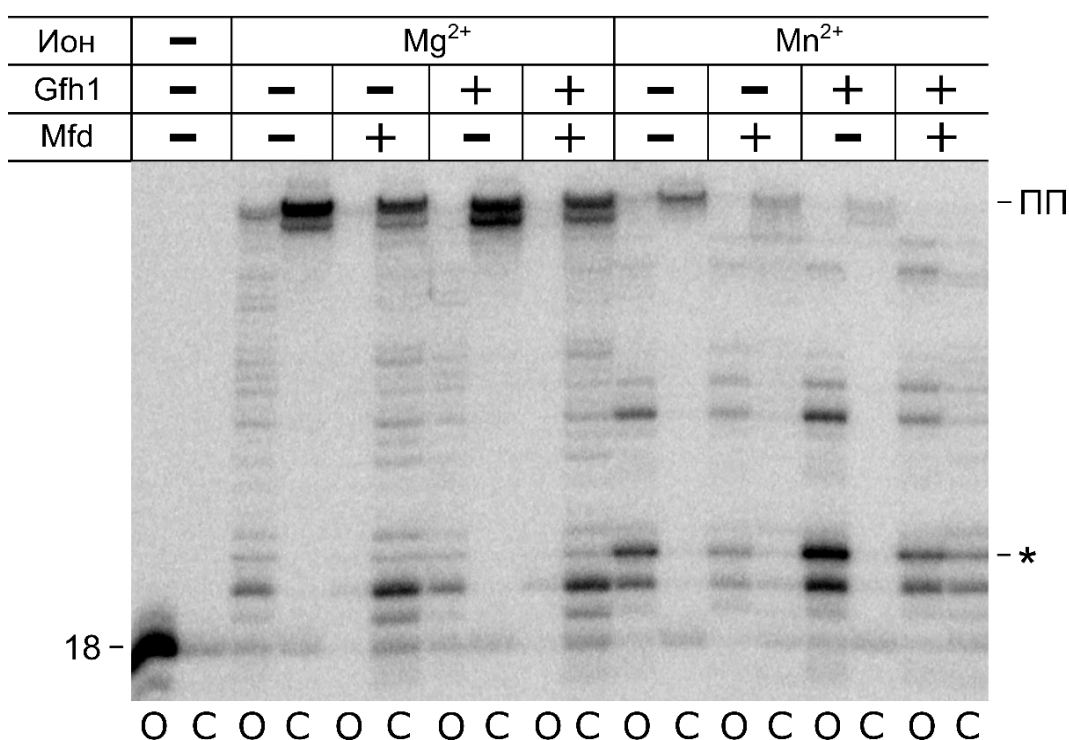


Рисунок 4.18. Влияние Mfd и Gfh1-фактора *D. radiodurans* на диссоциацию элонгационных комплексов на матрице, содержащей 8-оксогуанин. Результаты синтеза РНК на ИЭК после добавления 10 мкМ четырех НТФ и 1мМ дАТФ в присутствии 10 мМ Mg^{2+} или Mn^{2+} . Отмечены позиции исходной РНК (18 нуклеотидов), повреждения (звездочкой – 21 нуклеотид) и полноразмерного продукта (ПП). Реакцию проводили в течение 20 минут на элонгационных комплексах, связанных со стрептавидиновой смолой. О – фракция осадка, С – супернатанта

Этот эффект сильнее выражен в буфере, содержащим ионы Mg^{2+} : практически все элонгационные комплексы в этих условиях диссоциируют. В присутствии Mn^{2+} транслоказа Mfd менее активна: значительная часть РНК-продуктов в этой временной точке (20 минут) остается связанной в составе элонгационных комплексов. Однако в присутствии ионов Mn^{2+} наличие Gfh1-фактора приводит к увеличению количества высвободившейся в раствор РНК под действием Mfd. Таким образом, Mfd действительно приводит к диссоциации

элонгационных комплексов, и Gfh1-фактор способствует этому, усиливая паузы транскрипции в присутствии ионов Mn^{2+} .

4.15. Транскрипционные свойства Gfh-факторов *D. peraridilitoris*

D. peraridilitoris – близкородственный *D. radiodurans* вид бактерий, также устойчивых к ионизирующему облучению (Raine et al, 2007). Чтобы установить способность его четырех Gfh-факторов влиять на транскрипцию, мы клонировали кодирующие их гены и экспрессировали их в клетках *E. coli*, после чего получили очищенные препараты этих белков.

Мы проверили транскрипционную активность четырех Gfh-факторов бактерии *D. peraridilitoris* в тех же *in vitro* системах, что использовали для исследования Gfh-факторов *D. radiodurans*. При этом мы использовали препарат РНКП *D. radiodurans*; поскольку РНКП является высококонсервативным ферментом, можно надеяться, что полученные результаты скорее всего применимы для описания регуляции РНКП *D. peraridilitoris*.

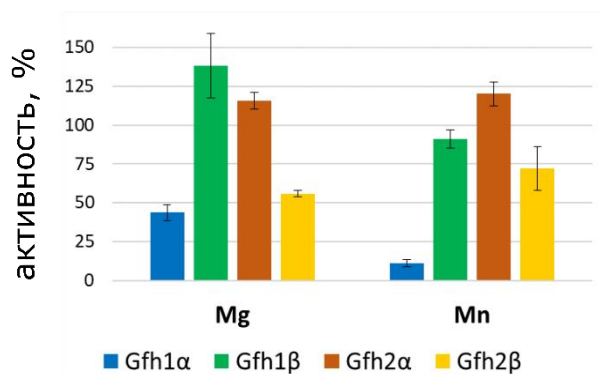
Тест по абортивной транскрипции показал, что только два из четырех факторов (Gfh1 α и Gfh2 β) ингибируют активность РНКП на стадии инициации в присутствии ионов Mg^{2+} (примерно в 2 раза). Замена каталитического иона на Mn^{2+} приводит к значительному усилению ингибиторного эффекта Gfh1 α (остаточная активность РНКП ~10%), но при этом к некоторому ослаблению активности Gfh2 β (рис. 4.19 А).

В опыте по измерению скорости образования полноразмерного продукта в условиях нашего эксперимента ингибиторные свойства проявил только белок Gfh1 α (рис. 4.19 Б). На продолжительность *his*-паузы влияют Gfh2 β (увеличивает время полужизни паузы в ~2 раза вне зависимости от каталитического иона) и Gfh1 α (усиливает паузу в ~3 раза в транскрипционном буфере с Mg^{2+} и в ~10 раз в присутствии Mn^{2+}) (рис. 4.19 В).

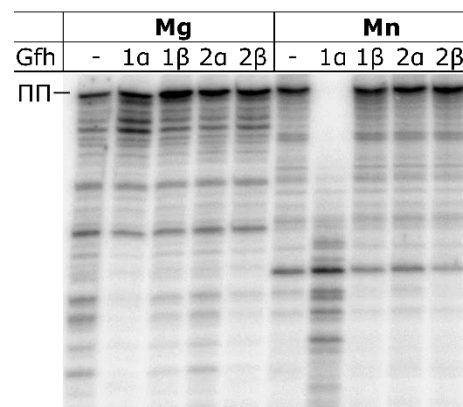
На эффективность терминации в транскрипционном буфере, содержащем ионы Mg^{2+} , ни один из четырех факторов влияния не оказывает (рис. 4.19 Г). При замене каталитического иона на Mn^{2+} уровень терминации падает до ~10%, при этом Gfh1 α повышает эффективность терминации до исходных значений (около 60%). Остальные три фактора на терминацию транскрипции не действуют.

Таким образом, фактор Gfh1 α *D. peraridilitoris* проявляет сходие с Gfh-факторами *D. radiodurans* транскрипционные свойства, Gfh2 β оказывает ингибирующий эффект только на стадию инициации транскрипции, а факторы Gfh1 β и Gfh2 α не проявляют активности в проведенных тестах по транскрипции.

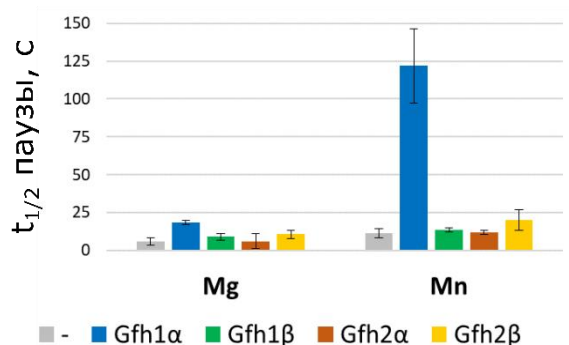
А



Б



В



Г

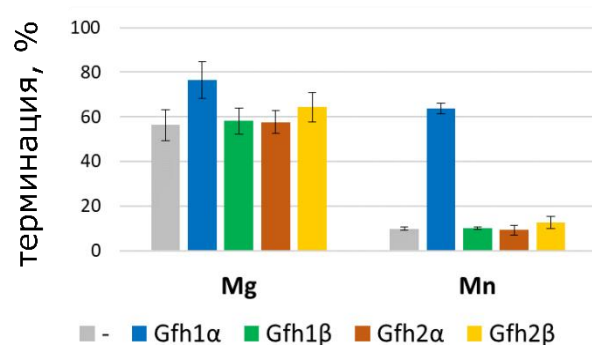


Рисунок 4.19. Влияние Gfh-факторов *D. peraridilitoris* на транскрипцию. (А) Активность РНКП *D. radiodurans* в abortивном синтезе на промоторе T7A1cons в присутствии Gfh-факторов *D. peraridilitoris*, нормированная на реакцию без добавления Gfh-факторов. (Б) Анализ синтеза полноразмерных продуктов РНКП *D. radiodurans* в присутствии Gfh-факторов *D. peraridilitoris*. Реакцию проводили в течение 5 мин. при 37°C (В) Время полужизни паузированного состояния элонгационного комплекса РНКП *D. radiodurans* на ИЭК, содержащем сигнал *his*-паузы, в зависимости от присутствия Gfh-факторов *D. peraridilitoris*. (Г) Процентная доля продуктов терминирования в общем количестве продуктов транскрипции на матрице *galP1-tR2* в зависимости от присутствия в реакции Gfh-факторов *D. peraridilitoris*.

Все реакции проводили в тех же условиях, что были описаны выше в экспериментах по исследованию транскрипционных свойств Gfh-факторов *D. radiodurans*, в присутствии ионов Mg^{2+} или Mn^{2+}

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Gfh-факторы *D. radiodurans* не являются анти-Gre-факторами

В этой работе мы исследовали влияние ранее неизученных Gre-подобных факторов бактерий рода *Deinococcus* (Gfh-факторы *D. radiodurans* и *D. peraridilitoris*) на работу РНКП на стадиях инициации, элонгации и терминации транскрипции.

Основной эффект Gre-факторов – стимуляция расщепления РНК в активном центре РНКП. Ранее для Gfh1-фактора *T. thermophilus* не только не было показано такой активности, но даже был продемонстрирован слабый (в 2-4 раза) ингибирующий эффект на эту реакцию (Hogan *et al*, 2002; Laptenko *et al*, 2006; Symersky *et al*, 2006). Кроме того, была показана анти-Gre активность этого белка: в присутствии Gfh1 *T. thermophilus* фактор GreA теряет способность к активации эндонуклеазной активности РНКП за счет конкурентного ингибирования. Мы показали, что Gfh-факторы *D. radiodurans* сами по себе не оказывают выраженного эффекта на расщепление РНК в активном центре РНКП. Удивительно, но мы также не обнаружили анти-Gre эффекта у Gfh-факторов *D. radiodurans*, хотя сайты связывания обоих факторов (GreA и Gfh) с РНКП почти совпадают. Это, вероятно, свидетельствует о том, что, в отличие от Gre-факторов, эти белки неспособны связываться со смещенными элонгационными комплексами, находящимися в благоприятной для эндонуклеазной реакции конформации.

5.2. Влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на инициацию транскрипции

Из опубликованных данных было известно, что Gfh1-фактор *T. thermophilus* на два порядка ингибирует синтез РНК на стадии инициации транскрипции, причем этот эффект сильно зависит от кислотности среды и проявляется при низких значениях pH. Было предположено, что этот эффект вызван pH-зависимым изменением конформации белка. Низкий pH стимулирует переход Gfh1 *T. thermophilus* в активную, Gre-подобную конформацию, а повышение pH приводит к переходу белка в неактивную конформацию (Laptenko & Borukhov, 2003; Laptenko *et al*, 2006). Эти свойства Gfh1-белка *T. thermophilus* подтвердились в наших экспериментах. Мы показали, что оба Gfh-фактора *D. radiodurans* также ингибируют синтез коротких РНК-продуктов, но слабее, чем белок Gfh1 *T. thermophilus*, и этот эффект практически не зависит от pH. Анализ гибридных вариантов Gfh-факторов *D. radiodurans*/*T. thermophilus* показал, что наблюдаемые различия не связаны с разницей в структуре N-КД Gfh-факторов этих бактерий, а, вероятно, объясняются специфическими чертами строения РНКП *D. radiodurans* и/или особенностями её взаимодействий с Gfh-факторами.

Основное влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на стадию инициации транскрипции заключается в изменении $K_{M,app}$ для инициаторных субстратов. Ранее было показано, что Gfh1-фактор *T. thermophilus* снижает сродство инициаторного комплекса ко второму инициаторному нуклеотиду, находящемуся в « $i+1$ » сайте, и почти не влияет на связывание 5'-концевого субстрата в « i » сайте (Laptenko *et al*, 2006). Удивительно, но оказалось, что Gfh-факторы *D. radiodurans*, наоборот, увеличивают $K_{M,app}$ для 5'-субстрата (и в случае использования динуклеотидной затравки, и в случае использования НТФ) гораздо сильнее, чем для 3'-субстрата. При этом в активном центре РНКП Gfh-фактор располагается ближе к 3'-инициаторному нуклеотиду (по данным анализа структуры комплекса РНКП-Gfh1 *T. thermophilus* (Tagami *et al*, 2010)). Мы предполагаем, что Gfh-факторы *D. radiodurans* влияют на K_M аллостерически, изменяя конформацию активного центра в районе связывания 5'-концевого нуклеотида.

Для Gfh1-фактора *T. thermophilus* было показано влияние на связывание второго каталитического иона в активном центре РНКП: он понижает $K_{d,app}$ для ионов Mg^{2+} , ингибируя активность РНКП – возможно, неправильно позиционируя Mg^{2+} в активном центре (Laptenko *et al*, 2006). Для Gfh-факторов *D. radiodurans* мы не обнаружили такого эффекта: они лишь немного снижают $K_{d,app}$ для Mg^{2+} и не влияют на $K_{d,app}$ для Mn^{2+} . Замены аминокислотных остатков в петле N-КД Gfh1-фактора *D. radiodurans*, для которых предполагалась важная роль в связывании каталитических ионов, не привели к изменению его влияния на связывание Mg^{2+} или Mn^{2+} в активном центре РНКП. В то же время, эти замены понизили активность Gfh-фактора, что дает основания предполагать важную роль петли N-КД в ингибировании РНКП через взаимодействия с другими элементами активного центра. Возможно, Gfh-факторы *D. radiodurans* могут ингибировать синтез коротких РНК, затрудняя выход abortивных продуктов из активного центра РНКП. Подобное предложение было сделано ранее для объяснения эффекта Gfh1-фактора *T. thermophilus* на инициацию транскрипции (Laptenko *et al*, 2006).

В данной работе мы адаптировали метод молекулярных маячков для анализа взаимодействий РНКП *D. radiodurans* с промоторами и исследования кинетики инициации транскрипции. Такой подход ранее применялся для изучения образования открытых промоторных комплексов у *E. coli* и *T. aquaticus* (Mekler *et al*, 2012, 2011). Мы впервые использовали этот метод для изучения транскрипции у *D. radiodurans* и показали, что, в отличие от РНКП *E. coli* и подобно РНКП *T. aquaticus*, РНКП *D. radiodurans* образует нестабильные инициаторные комплексы даже на сильных промоторах. Это подтверждает результаты, полученные ранее с использованием стандартных методов транскрипции *in vitro* (Kulbachinskiy *et al*, 2004). Однако Gfh-факторы *D. radiodurans* не оказывают значимого

влияния ни на стабильность инициаторных комплексов, ни на переход от инициации к элонгации. Это говорит о том, что на данных промоторах стадия связывания инициаторных субстратов, на которую воздействуют Gfh-факторы, не является лимитирующей. В то же время нельзя исключать, что Gfh-факторы *D. radiodurans* могут влиять на скорость перехода от инициации к элонгации транскрипции на таких промоторах, активность которых сильно зависит от концентрации нуклеотидов.

Нам также удалось зарегистрировать ингибиторное воздействие Gfh-факторов *D. radiodurans* на abortивный синтез холоферментом РНКП, содержащим альтернативную σ -субъединицу Sig1. Известно, что этот σ -фактор регулирует экспрессию генов теплового шока (Schmid & Lidstrom, 2002), но свойства РНКП, содержащей данную субъединицу, оставались не исследованными. Таким образом, Gfh-факторы могут регулировать инициацию транскрипции в клетках *D. radiodurans* не только в оптимальных условиях роста, но и при воздействии стрессовых факторов.

5.3. Влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на паузы и терминацию транскрипции

В отличие от ингибирующего эффекта Gfh-факторов *D. radiodurans* на инициацию транскрипции, который почти не зависит от выбора каталитического иона, на стадии элонгации транскрипции Gfh-факторы *D. radiodurans* влияют на активность РНКП только в присутствии ионов Mn^{2+} . Мы продемонстрировали, что этот эффект не связан с общим подавлением катализа полимеризации в активном центре РНКП, а объясняется избирательным усилением Gfh-факторами пауз транскрипции, причем этот эффект наблюдается для различных типов пауз. Ранее было показано, что в паузированном состоянии РНКП претерпевает ряд конформационных перестроек, которые препятствуют дальнейшему синтезу (Landick, 2006; Kang *et al*, 2018a; Guo *et al*, 2018). Вероятно, Gfh-факторы избирательно связываются с такими элонгационными комплексами. Действительно, структурные и биохимические исследования показали, что фактор Gfh1 *T. thermophilus* связывается с РНКП в необычной конформации (R-форма, см. Обзор литературы) (Tagami *et al*, 2010; Sekine *et al*, 2015). Полученные в работе результаты свидетельствуют о привлечении Gfh-факторами *D. radiodurans* дополнительного, третьего иона Mn^{2+} (но не Mg^{2+}) в активный центр РНКП, что, по-видимому, ингибирует её активность. Кроме того, Gfh-факторы *D. radiodurans* стимулируют терминацию транскрипции, и этот эффект тоже зависит от ионов Mn^{2+} .

Мы также проверили активность транскрипционного фактора NusA в стимуляции образования пауз транскрипции. Этот белок у других бактерий, в том числе *E. coli* и *T.*

thermophilus, способствует паузированию РНКП (Kolb *et al*, 2014; Guo *et al*, 2018; Berdygulova *et al*, 2012). Мы впервые выделили фактор NusA *D. radiodurans* и показали, что он стимулирует шпилькозависимые паузы, а также способствует терминации транскрипции РНК-полимеразой, этой бактерии, как в присутствии ионов Mg^{2+} , так и Mn^{2+} . Ранее при исследованиях РНКП *E. coli* было показано, что шпилька при образовании *his*-паузы или терминации транскрипции располагается вблизи сайта связывания NusA (Touloukhonov & Landick, 2003; На *et al*, 2010; Guo *et al*, 2018). Предполагается, что NusA может стабилизировать вторичную структуру РНК-шпильки и/или способствовать конформационным перестройкам, индуцируемым образованием этой шпильки (На *et al*, 2010; Guo *et al*, 2018). Вероятно, NusA *D. radiodurans* действует по похожему механизму.

Мы обнаружили, что NusA значительным образом усиливает влияние Gfh-факторов на шпилькозависимые паузы и терминацию, причем этот эффект наблюдается только в присутствии ионов Mn^{2+} . Таким образом, сильная стимуляция паузы требует одновременного воздействия обоих транскрипционных факторов, что указывает на их независимое влияние на процесс транскрипции. Gfh-факторы, вероятно, стабилизируют неактивную конформацию элонгационного комплекса и стимулируют связывание дополнительного иона Mn^{2+} в активном центре РНКП, а NusA, скорее всего, влияет на трансклокационное состояние РНКП (Zhou *et al*, 2011).

Феномен Mn^{2+} -зависимой стимуляции пауз транскрипции Gfh-факторами *D. radiodurans* может иметь физиологическое значение, поскольку известно, что концентрация ионов Mn^{2+} в клетках этой бактерии при стрессе возрастает до миллимолярных (Leibowitz *et al*, 1976; Paulino-Lima *et al*, 2016). Кроме того, после радиоактивного облучения концентрации Gfh1-фактора и NusA в клетках *D. radiodurans* тоже повышаются (Liu *et al*, 2003). Таким образом, именно в условиях стресса Gfh-факторы, действуя совместно с NusA, могут усиливать транскрипционные паузы и терминацию. При этом стоит отметить, что ионы Mn^{2+} сами по себе снижают эффективность терминации РНКП *D. radiodurans*, а Gfh1 и NusA поднимают её до того же уровня, который наблюдается в присутствии ионов Mg^{2+} . Возможно, это важно для поддержания правильного уровня терминации в стрессовых условиях, когда в клетке накапливаются ионы Mn^{2+} .

5.4. Влияние Gfh-факторов *D. radiodurans* на транскрипцию поврежденных матриц

Хорошо известно, что ионизирующее излучение, а также другие виды стрессовых воздействий повреждают ДНК (Friedberg, 2003). Мы проанализировали активность РНКП *D. radiodurans* на поврежденных матрицах ДНК, и обнаружили, что при этом падает как

точность, так и эффективность транскрипции. Было показано, что напротив поврежденных нуклеотидов ДНК РНКП *D. radiodurans*, как и другие полимеразы нуклеиновых кислот, с высокой частотой встраивает ошибочные нуклеотиды. Согласно данным, полученным в ЛМГМ ИМГ РАН, РНКП *E. coli* при транскрипции поврежденных ДНК-матриц проявляет похожие свойства. Таким образом, РНКП *D. radiodurans* сама по себе не проявляет каких-то особенных свойств при транскрипции поврежденной ДНК, которые могли бы объяснить высокую стрессоустойчивость *D. radiodurans*. Более того, в присутствии ионов Mn^{2+} точность синтеза РНК этой РНКП дополнительно падает, в том числе, при наличии повреждений в ДНК-матрице.

Мы проверили активность Gfh1-фактора *D. radiodurans* в стимулировании транскрипционных пауз, образующихся на поврежденных участках ДНК. Оказалось, что в присутствии Mn^{2+} Gfh1 усиливает такие паузы. Кроме того, в присутствии Gfh1-фактора ингибируется не только синтез, но и расщепление РНК, которое нам также удалось детектировать при транскрипции поврежденных ДНК-матриц. Это подтверждает гипотезу о том, что Gfh-факторы стабилизируют неактивную конформацию РНКП, в которой подавляются все каталитические активности фермента.

Известно, что РНКП может играть роль сенсора повреждений в ДНК и привлекать к этому сайту системы репарации (Mellon *et al*, 1987; Selby & Sancar, 1993). Считается, что с РНКП сначала связывается ДНК-транслоказа Mfd, которая с затратами АТФ перемещает остановленную РНК-полимеразу вперед в направлении транскрипции, приводя тем самым к диссоциации элонгационного комплекса (Park *et al*, 2002; Le *et al*, 2018). Далее с Mfd связываются факторы репарации ДНК (Fan *et al*, 2016). Эти данные были получены только для *E. coli*. В данной работе мы показали, что белок Mfd *D. radiodurans* приводит к диссоциации элонгационных комплексов, паузированных в поврежденном участке ДНК, причем этот эффект усиливается Gfh-факторами. Мы предполагаем, что основная роль Gfh-факторов может заключаться в том, что они увеличивают время остановки РНКП в поврежденном участке ДНК, таким образом предоставляя Mfd больше времени для воздействия на такие комплексы до того, как они преодолеют паузу. Кроме того, не исключено, что Mfd с большей эффективностью действует на элонгационные комплексы в неактивной конформации, стабилизируемой Gfh-факторами, но эта гипотеза требует дальнейшей проверки. Потенциальная роль Gfh-факторов в сопряжении транскрипции и репарации у *D. radiodurans* может иметь компенсаторное значение, поскольку повышение концентрации Mn^{2+} при стрессе приводит к падению точности РНКП, а также к снижению эффективности действия Mfd-транслоказы.

5.5. Транскрипционные свойства Gfh-факторов *D. peraridilitoris*

Для того, чтобы выяснить, являются ли обнаруженные нами свойства Gfh-факторов уникальными для *D. radiodurans*, мы также исследовали транскрипционную активность Gfh-факторов другой стрессоустойчивой бактерии из рода *Deinococcus*, а именно *D. peraridilitoris*. Эта бактерия имеет целых четыре Gfh-фактора. Один из них, Gfh1 α , проявляет свойства, схожие с Gfh-факторами *D. radiodurans*: ингибирует РНКП в абортном синтезе, стимулирует паузирование и терминацию транскрипции в присутствии ионов Mn^{2+} . Фактор Gfh2 β также проявляет схожие свойства, хоть и в менее выраженной степени. Это свидетельствует о консервативности функций Gfh-факторов у бактерий рода *Deinococcus*, что может косвенно свидетельствовать об их важной роли в стрессоустойчивости. Два других белка Gre-семейства, Gfh1 β и Gfh2 α , не продемонстрировали никакой транскрипционной активности в наших экспериментальных системах. Возможно, эти близкие гомологи транскрипционных факторов приобрели в клетках *D. peraridilitoris* иные функции, либо проявляют свою активность в других, не исследованных нами условиях.

5.6. Заключение

В результате проведенной работы мы описали активность Gfh-факторов *D. radiodurans* на всех этапах транскрипционного цикла. Эти факторы слабо ингибируют синтез РНК на стадии инициации за счет снижения сродства РНКП к инициаторным субстратам. Они не являются анти-Gre-факторами и не влияют на расщепление РНК в смещенных транскрипционных комплексах. В то же время в присутствии Mn^{2+} Gfh-факторы совместно с NusA стимулируют транскрипционные паузы, в том числе вызванные повреждениями в ДНК. Gfh-факторы способствуют диссоциации паузированных элонгационных комплексов ДНК-трансферазой Mfd. Поскольку концентрация Mn^{2+} , Gfh1 и NusA повышается при стрессе, описанный механизм может быть актуален для сопряжения транскрипции с репарацией ДНК. Кроме того, усиление терминации и диссоциация паузированных комплексов должно предотвращать конфликты РНКП с репликацией, что может иметь ключевое значение для сохранения целостности ДНК и поддержания стабильности генома.

Мы также описали Gfh-факторы бактерии *D. peraridilitoris*, демонстрирующие схожие транскрипционные свойства. Это свидетельствует о важной роли данной группы транскрипционных факторов в регуляции активности РНКП у стрессоустойчивых бактерий рода *Deinococcus*.

6. ВЫВОДЫ

- 1) Gfh-факторы *D. radiodurans* ингибируют инициацию транскрипции с участием главной и альтернативной σ -субъединиц РНК-полимеразы, повышая $K_{M,app}$ для инициаторных субстратов.
- 2) Gfh-факторы *D. radiodurans* являются Mn^{2+} -зависимыми стимуляторами пауз и терминации транскрипции.
- 3) Транскрипционный фактор NusA *D. radiodurans* кооперирует с Gfh-факторами в усилении шпилькозависимых пауз и терминации транскрипции.
- 4) Повреждения ДНК-матрицы снижают точность синтеза РНК РНК-полимеразой *D. radiodurans* и вызывают транскрипционные паузы.
- 5) Gfh1-фактор *D. radiodurans* в присутствии ионов Mn^{2+} усиливает транскрипционные паузы на поврежденной ДНК и способствует диссоциации остановленных элонгационных комплексов под действием Mfd-транслоказы.
- 6) Факторы Gfh1 α и Gfh2 β *D. peraridilitoris* ингибируют синтез РНК на стадии инициации транскрипции, а фактор Gfh1 α также усиливает паузы и терминацию транскрипции. Таким образом, белки Gfh являются филум-специфичными регуляторами транскрипции у бактерий рода *Deinococcus*.

7. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность А.В. Кульбачинскому за возможность заниматься крайне интересной темой, чуткое научное руководство, ценные советы и замечания при выполнении работы и участие в обсуждении её результатов, а также за помощь в редактировании текста диссертации. Автор благодарен Д. Есюниной за неоценимую помощь в освоении методик, предоставление препаратов ДНК и белков, ценные советы и участие в обсуждении результатов. Автор благодарит Д. Пупова и И. Петушкова за помощь в освоении методик и моральную поддержку. Автор признателен А. Олиной за помощь в работе и редактировании текста диссертации. Автор благодарен Н. Миропольской, А. Кузьменко, Т.С. Логутенковой, М.А. Петровой и всем сотрудникам ЛМГК и ЛБРИЭ ИМГ РАН за доброжелательное отношение и продуктивные научные дискуссии. Автор признателен Л. Минахину и И. Арцимович за предоставленные плазмиды и препараты белков. Автор выражает огромную благодарность преподавателям Кафедры молекулярной биологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за полученные ценные знания и привитые навыки экспериментальной работы.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Есюнина ДМ & Кульбачинский АВ (2015) Выделение и очистка рекомбинантной РНК-полимеразы *Deinococcus radiodurans*. *Биохимия* **80**: 1271–1279
2. Жарков ДО (2007) Структура и конформационная динамика гликозилаз эксцизионной репарации оснований ДНК. *Мол. биол.* **41**: 772–286
3. Жилина ЕВ, Миропольская НА, Басс ИА, Бродолин КЛ & Кульбачинский АВ (2011) Особенности формирования σ -зависимых пауз транскрипции РНК-полимеразами *Escherichia coli* и *Thermus aquaticus*. *Биохимия* **76**: 1348–1358
4. Пупов ДВ, Баринаева НА & Кульбачинский АВ (2008) Анализ РНК-расщепляющей активности РНК-полимераз *E. coli* и *D. radiodurans*. *Биохимия* **73**: 903–908
5. Пупов ДВ & Кульбачинский АВ (2010) Структурная динамика активного центра много субъединичных РНК-полимераз в процессе синтеза и редактирования РНК. *Биохимия* **44**: 573–590
6. Adebali O, Chiou Y-Y, Hu J, Sancar A & Selby CP (2017) Genome-wide transcription-coupled repair in *Escherichia coli* is mediated by the Mfd translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E2116–E2125
7. Anderson A, Nordan H, Cain R, Parrish G & Duggan D (1956) Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to radiation. *Food Technol.* **10**: 575–577
8. Bae B, Feklistov A, Lass-Napiorkowska A, Landick R & Darst SA (2015) Structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme open promoter complex. *Elife* **4**:
9. Bai L, Shundrovsky A & Wang MD (2004) Sequence-dependent kinetic model for transcription elongation by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **344**: 335–349
10. Barinova N, Kuznedelov K, Severinov K & Kulbachinskiy A (2008) Structural modules of RNA polymerase required for transcription from promoters containing downstream basal promoter element GGGA. *J. Biol. Chem.* **283**: 22482–9
11. Barne KA, Bown JA, Busby SJ & Minchin SD (1997) Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the ‘extended-10’ motif at promoters. *EMBO J.* **16**: 4034–40
12. Baumeister W, Barth M, Hegerl R, Guckenberger R, Hahn M & Saxton WO (1986) Three-dimensional structure of the regular surface layer (HPI layer) of *Deinococcus radiodurans*. *J. Mol. Biol.* **187**: 241–250
13. Belogurov GA & Artsimovitch I (2015) Regulation of transcript elongation. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**: 49–69
14. Bentchikou E, Servant P, Coste G & Sommer S (2010) A major role of the RecFOR pathway in

- DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet.* **6**: e1000774
15. Berdyuglova Z, Esyunina D, Miropolskaya N, Mukhamedyarov D, Kuznedelov K, Nickels BE, Severinov K, Kulbachinskiy A & Minakhin L (2012) A novel phage-encoded transcription antiterminator acts by suppressing bacterial RNA polymerase pausing. *Nucleic Acids Res.* **40**: 4052–4063
16. Berlett BS & Levine RL (2014) Designing antioxidant peptides. *Redox Rep.* **19**: 80–6
17. Blanchard L, Guérin P, Roche D, Cruveiller S, Pignol D, Vallenet D, Armengaud J & de Groot A (2017) Conservation and diversity of the IrrE/DdrO-controlled radiation response in radiation-resistant *Deinococcus* bacteria. *Microbiologyopen* **6**: e00477
18. Blankschien MD, Potrykus K, Grace E, Choudhary A, Vinella D, Cashel M & Herman C (2009) TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS Genet.* **5**: e1000345
19. Blasius M, Shevelev I, Jolivet E, Sommer S & Hubscher U (2006) DNA polymerase X from *Deinococcus radiodurans* possesses a structure-modulated 3'-5' exonuclease activity involved in radioresistance. *Mol. Microbiol.* **60**: 165–176
20. Bochkareva A, Yuzenkova Y, Tadigotla VR & Zenkin N (2012) Factor-independent transcription pausing caused by recognition of the RNA-DNA hybrid sequence. *EMBO J.* **31**: 630–9
21. Borsetti F, Dal Piaz F, D'Alessio F, Stefan A, Brandimarti R, Sarkar A, Datta A, Montón Silva A, den Blaauwen T, Alberto M, Spisni E & Hochkoeppler A (2018) Manganese is a *Deinococcus radiodurans* growth limiting factor in rich culture medium. *Microbiology*
22. Borukhov S, Polyakov A, Nikiforov V & Goldfarb A (1992) GreA protein: a transcription elongation factor from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 8899–902
23. Borukhov S, Sagitov V & Goldfarb A (1993) Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell* **72**: 459–66
24. Bouthier de la Tour C, Boissard S, Norais C, Toueille M, Bentchikou E, Vannier F, Cox MM, Sommer S & Servant P (2011) The deinococcal DdrB protein is involved in an early step of DNA double strand break repair and in plasmid transformation through its single-strand annealing activity. *DNA Repair (Amst).* **10**: 1223–1231
25. Bouthier de la Tour C, Mathieu M, Meyer L, Dupaigne P, Passot F, Servant P, Sommer S, Le Cam E & Confalonieri F (2017) In vivo and in vitro characterization of DdrC, a DNA damage response protein in *Deinococcus radiodurans* bacterium. *PLoS One* **12**: e0177751
26. Bruch EM, Thomine S, Tabares LC & Un S (2015) Variations in Mn(II) speciation among organisms: what makes *D. radiodurans* different. *Metallomics* **7**: 136–44

27. Bubunenko M, Court DL, Al Refaii A, Saxena S, Korepanov A, Friedman DI, Gottesman ME & Alix J-H (2013) Nus transcription elongation factors and RNase III modulate small ribosome subunit biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **87**: 382–393
28. Cardinale CJ, Washburn RS, Tadigotla VR, Brown LM, Gottesman ME & Nudler E (2008) Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science* (80-.). **320**: 935–938
29. Chan CL, Wang D & Landick R (1997) Multiple interactions stabilize a single paused transcription intermediate in which hairpin to 3' end spacing distinguishes pause and termination pathways. *J. Mol. Biol.* **268**: 54–68
30. Chen H, Shiroguchi K, Ge H & Xie XS (2015) Genome-wide study of mRNA degradation and transcript elongation in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **11**: 781
31. Chen H, Xu G, Zhao Y, Tian B, Lu H, Yu X, Xu Z, Ying N, Hu S & Hua Y (2008) A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* **3**: e1602
32. Cheng K, Xu G, Xu H, Zhao Y & Hua Y (2017) *Deinococcus radiodurans* DR1088 is a novel RecF-interacting protein that stimulates single-stranded DNA annealing. *Mol. Microbiol.* **106**: 518–529
33. Cheng K, Xu X, Zhao Y, Wang L, Xu G & Hua Y (2014) The key residue for SSB–RecO interaction is dispensable for *Deinococcus radiodurans* DNA repair in vivo. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **46**: 368–376
34. China A, Mishra S & Nagaraja V (2011) A transcript cleavage factor of *Mycobacterium tuberculosis* important for its survival. *PLoS One* **6**: e21941
35. China A, Mishra S, Tare P & Nagaraja V (2012) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase by binding of a Gre factor homolog to the secondary channel. *J. Bacteriol.* **194**: 1009–17
36. Chou FI & Tan ST (1990) Manganese(II) induces cell division and increases in superoxide dismutase and catalase activities in an aging deinococcal culture. *J. Bacteriol.* **172**: 2029–35
37. Dai S, Jin Y, Li T, Weng Y, Xu X, Zhang G, Li J, Pang R, Tian B & Hua Y (2018) DR1440 is a potential iron efflux protein involved in maintenance of iron homeostasis and resistance of *Deinococcus radiodurans* to oxidative stress. *PLoS One* **13**: e0202287
38. Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, Fukumoto R, Lee D-Y, Wehr NB, Viteri GA, Berlett BS & Levine RL (2010) Small-Molecule Antioxidant Proteome-Shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* **5**: e12570
39. Daly MJ & Minton KW (1996) An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes recA-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus*

- radiodurans. *J. Bacteriol.* **178**: 4461–4471
40. Daly MJ, Ouyang L, Fuchs P & Minton KW (1994) In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **176**: 3508–3517
41. Deaconescu AM, Chambers AL, Smith AJ, Nickels BE, Hochschild A, Savery NJ & Darst SA (2006) Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair. *Cell* **124**: 507–20
42. Demo G, Rasouly A, Vasilyev N, Svetlov V, Loveland AB, Diaz-Avalos R, Grigorieff N, Nudler E & Korostelev AA (2017) Structure of RNA polymerase bound to ribosomal 30S subunit. *Elife* **6**:
43. Devigne A, Guérin P, Lisboa J, Quevillon-Cheruel S, Armengaud J, Sommer S, Bouthier de la Tour C & Servant P (2016) PprA protein is involved in chromosome segregation via its physical and functional interaction with DNA gyrase in irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *mSphere* **1**: e00036-15
44. Devigne A, Ithurbide S, Bouthier de la Tour C, Passot F, Mathieu M, Sommer S & Servant P (2015) DdrO is an essential protein that regulates the radiation desiccation response and the apoptotic-like cell death in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium. *Mol. Microbiol.* **96**: 1069–1084
45. Devigne A, Mersaoui S, Bouthier-de-la-Tour C, Sommer S & Servant P (2013) The PprA protein is required for accurate cell division of γ -irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *DNA Repair (Amst)*. **12**: 265–272
46. Driedger AA (1970) The DNA content of single cells of *Micrococcus radiodurans*. *Can. J. Microbiol.* **16**: 1136–1137
47. Dutta D, Chalissery J & Sen R (2008) Transcription termination factor rho prefers catalytically active elongation complexes for releasing RNA. *J. Biol. Chem.* **283**: 20243–20251
48. Dutta D, Shatalin K, Epshtein V, Gottesman ME & Nudler E (2011) Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell* **146**: 533–543
49. Earl AM, Mohundro MM, Mian IS & Battista JR (2002a) The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *J. Bacteriol.* **184**: 6216–24
50. Earl AM, Rankin SK, Kim K-P, Lamendola ON & Battista JR (2002b) Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J. Bacteriol.* **184**: 1003–9
51. Eisen JA & Wu M (2002) Phylogenetic Analysis and Gene Functional Predictions: Phylogenomics in Action. *Theor. Popul. Biol.* **61**: 481–487
52. Epshtein V, Kamarthapu V, McGary K, Svetlov V, Ueberheide B, Proshkin S, Mironov A & Nudler E (2014) UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards. *Nature* **505**:

53. Erie DA, Hajiseyedjavadi O, Young MC & von Hippel PH (1993) Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. *Science* (80-.). **262**: 867–73
54. Fan J, Leroux-Coyau M, Savery NJ & Strick TR (2016) Reconstruction of bacterial transcription-coupled repair at single-molecule resolution. *Nature* **536**: 234–237
55. Farci D, Slavov C, Tramontano E & Piano D (2016) The S-layer protein DR_2577 binds deinoxanthin and under desiccation conditions protects against UV-radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Front. Microbiol.* **7**: 155
56. Fishman-Lobell J, Rudin N & Haber JE (1992) Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1292–303
57. Fredrickson JK, Li SW, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Zhai M, Sulloway HM, Scholten JC, Brown MG, Balkwill DL & Daly MJ (2008) Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *ISME J.* **2**: 393–403
58. Friedberg EC (2003) DNA damage and repair. *Nature* **421**: 436–440
59. Furman R, Sevostyanova A & Artsimovitch I (2012) Transcription initiation factor DksA has diverse effects on RNA chain elongation. *Nucleic Acids Res.* **40**: 3392–3402
60. Gamba P, James K & Zenkin N (2017) A link between transcription fidelity and pausing in vivo. *Transcription* **8**: 99–105
61. Gérard E, Jolivet E, Prieur D & Forterre P (2001) DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 72–8
62. Ghosal D, Omelchenko M V., Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Venkateswaran A, Zhai M, Kostandarithes HM, Brim H, Makarova KS, Wackett LP, Fredrickson JK & Daly MJ (2005) How radiation kills cells: Survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 361–375
63. Gopalkrishnan S, Ross W, Chen AY & Gourse RL (2017) TraR directly regulates transcription initiation by mimicking the combined effects of the global regulators DksA and ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E5539–E5548
64. Gourse RL, Chen AY, Gopalkrishnan S, Sanchez-Vazquez P, Myers A & Ross W (2018) Transcriptional responses to ppGpp and DksA. *Annu. Rev. Microbiol.* **72**: 163–184
65. Gourse RL, Gaal T, Aiyar SE, Barker MM, Estrem ST, Hirvonen CA & Ross W (1998) Strength and regulation without transcription factors: lessons from bacterial rRNA promoters. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**: 131–9
66. Grigorova IL, Phleger NJ, Mutalik VK & Gross CA (2006) Insights into transcriptional

- regulation and competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 5332–5337
67. Gross CA, Chan C, Dombroski A, Gruber T, Sharp M, Tupy J & Young B (1998) The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**: 141–55
68. Guo X, Myasnikov AG, Chen J, Crucifix C, Papai G, Takacs M, Schultz P & Weixlbaumer A (2018) Structural basis for NusA stabilized transcriptional pausing. *Mol. Cell* **69**: 816–827.e4
69. Gupta P, Gayen M, Smith JT, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Grichenko O, Knollmann-Ritschel B, Daly MJ, Kiang JG & Maheshwari RK (2016) MDP: a *Deinococcus* Mn²⁺-decapeptide complex protects mice from ionizing radiation. *PLoS One* **11**: e0160575
70. Gusarov I & Nudler E (1999) The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* **3**: 495–504
71. Ha KS, Touloukhonov I, Vassilyev DG & Landick R (2010) 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.* **401**: 708–725
72. Haines NM, Kim Y-IT, Smith AJ & Savery NJ (2014) Stalled transcription complexes promote DNA repair at a distance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 4037–4042
73. Hansler A, Chen Q, Ma Y & Gross SS (2016) Untargeted metabolite profiling reveals that nitric oxide bioynthesis is an endogenous modulator of carotenoid biosynthesis in *Deinococcus radiodurans* and is required for extreme ionizing radiation resistance. *Arch. Biochem. Biophys.* **589**: 38–52
74. Harris DR, Pollock S V., Wood EA, Goiffon RJ, Klingele AJ, Cabot EL, Schackwitz W, Martin J, Eggington J, Durfee TJ, Middle CM, Norton JE, Popelars MC, Li H, Klugman SA, Hamilton LL, Bane LB, Pennacchio LA, Albert TJ, Perna NT, et al (2009) Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**: 5240–5252
75. Harris DR, Tanaka M, Saveliev S V, Jolivet E, Earl AM, Cox MM & Battista JR (2004) Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS Biol.* **2**: e304
76. Hein PP, Kolb KE, Windgassen T, Bellecourt MJ, Darst SA, Mooney RA & Landick R (2014) RNA polymerase pausing and nascent-RNA structure formation are linked through clamp-domain movement. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**: 794–802
77. Hein PP & Landick R (2010) The bridge helix coordinates movements of modules in RNA polymerase. *BMC Biol.* **8**: 141
78. Heinz K & Marx A (2007) Lesion bypass activity of DNA polymerase A from the extremely radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *J. Biol. Chem.* **282**: 10908–10914
79. Hogan BP, Hartsch T & Erie DA (2002) Transcript cleavage by *Thermus thermophilus* RNA

- polymerase. Effects of GreA and anti-GreA factors. *J. Biol. Chem.* **277**: 967–975
80. Hua X, Wang H, Wang C, Tian B & Hua Y (2011) Global effect of an RNA polymerase β -subunit mutation on gene expression in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Sci. China Life Sci.* **54**: 854–862
 81. Im S, Joe M, Kim D, Park D-H & Lim S (2013a) Transcriptome analysis of salt-stressed *Deinococcus radiodurans* and characterization of salt-sensitive mutants. *Res. Microbiol.* **164**: 923–932
 82. Im S, Song D, Joe M, Kim D, Park D-H & Lim S (2013b) Comparative survival analysis of 12 histidine kinase mutants of *Deinococcus radiodurans* after exposure to DNA-damaging agents. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**: 781–789
 83. Imlay JA (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* **59**: 1073–1082
 84. Ithurbide S, Bentchikou E, Coste G, Bost B, Servant P & Sommer S (2015) Single strand annealing plays a major role in RecA-independent recombination between repeated sequences in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium. *PLOS Genet.* **11**: e1005636
 85. Izban MG & Luse DS (1992) The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII. *Genes Dev.* **6**: 1342–56
 86. James K, Gamba P, Cockell SJ & Zenkin N (2016) Misincorporation by RNA polymerase is a major source of transcription pausing in vivo. *Nucleic Acids Res.* **45**: gkw969
 87. Jeong S-W, Jung J-H, Kim M-K, Seo HS, Lim H-M & Lim S (2016a) The three catalases in *Deinococcus radiodurans*: Only two show catalase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**: 443–448
 88. Jeong S-W, Seo HS, Kim M-K, Choi J-I, Lim H-M & Lim S (2016b) PprM is necessary for up-regulation of katE1, encoding the major catalase of *Deinococcus radiodurans*, under unstressed culture conditions. *J. Microbiol.* **54**: 426–431
 89. Jishage M & Ishihama A (1998) A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4953–8
 90. Joe M-H, Jung S-W, Im S-H, Lim S-Y, Song H-P, Kwon O & Kim D-H (2011) Genome-wide response of *Deinococcus radiodurans* on cadmium toxicity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 438–47
 91. Joshi B, Schmid R, Altendorf K & Apte SK (2004) Protein recycling is a major component of post-irradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* strain R1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**: 1112–1117
 92. Kaczanowska M & Ryden-Aulin M (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 477–494
 93. Kamarthapu V, Epshtein V, Benjamin B, Proshkin S, Mironov A, Cashel M & Nudler E (2016)

- ppGpp couples transcription to DNA repair in *E. coli*. *Science* (80-.). **352**: 993–996
94. Kang JY, Mishanina T V., Bellecourt MJ, Mooney RA, Darst SA & Landick R (2018a) RNA polymerase accommodates a pause RNA hairpin by global conformational rearrangements that prolong pausing. *Mol. Cell* **69**: 802–815.e1
 95. Kang JY, Mooney RA, Nedialkov Y, Saba J, Mishanina T V., Artsimovitch I, Landick R & Darst SA (2018b) Structural basis for transcript elongation control by NusG family universal regulators. *Cell* **173**: 1650–1662.e14
 96. Kettenberger H, Armache K-J & Cramer P (2003) Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* **114**: 347–57
 97. Khairnar NP & Misra HS (2009) DNA polymerase X from *Deinococcus radiodurans* implicated in bacterial tolerance to DNA damage is characterized as a short patch base excision repair polymerase. *Microbiology* **155**: 3005–3014
 98. Kim J-I & Cox MM (2002) The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 7917–21
 99. Kim J-I, Sharma AK, Abbott SN, Wood EA, Dwyer DW, Jambura A, Minton KW, Inman RB, Daly MJ & Cox MM (2002) RecA Protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: expression, purification, and characterization. *J. Bacteriol.* **184**: 1649–60
 100. Kireeva M, Kashlev M & Burton ZF (2010) Translocation by multi-subunit RNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1799**: 389–401
 101. Kireeva ML & Kashlev M (2009) Mechanism of sequence-specific pausing of bacterial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 8900–8905
 102. Kolb KE, Hein PP & Landick R (2014) Antisense oligonucleotide-stimulated transcriptional pausing reveals RNA exit channel specificity of RNA polymerase and mechanistic contributions of NusA and RfaH. *J. Biol. Chem.* **289**: 1151–1163
 103. Komissarova N, Becker J, Solter S, Kireeva M & Kashlev M (2002) Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol. Cell* **10**: 1151–62
 104. Komissarova N & Kashlev M (1997a) 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.* **94**: 1755–60
 105. Komissarova N & Kashlev M (1997b) RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J. Biol. Chem.* **272**: 15329–38
 106. Kota S, Rajpurohit YS, Charaka VK, Satoh K, Narumi I & Misra HS (2016) DNA Gyrase of *Deinococcus radiodurans* is characterized as Type II bacterial topoisomerase and its activity is

- differentially regulated by PprA in vitro. *Extremophiles* **20**: 195–205
107. Koulich D, Nikiforov V & Borukhov S (1998) Distinct functions of N and C-terminal domains of GreA, an Escherichia coli transcript cleavage factor. *J. Mol. Biol.* **276**: 379–389
 108. Koulich D, Orlova M, Malhotra A, Sali A, Darst SA & Borukhov S (1997) Domain organization of Escherichia coli transcript cleavage factors GreA and GreB. *J. Biol. Chem.* **272**: 7201–10
 109. Krishna Leela J, Syeda AH, Anupama K & Gowrishankar J (2013) Rho-dependent transcription termination is essential to prevent excessive genome-wide R-loops in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 258–263
 110. Krisko A & Radman M (2010) Protein damage and death by radiation in Escherichia coli and Deinococcus radiodurans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 14373–14377
 111. Kulbachinskiy A, Bass I, Bogdanova E, Goldfarb A & Nikiforov V (2004) Cold sensitivity of thermophilic and mesophilic RNA polymerases. *J. Bacteriol.* **186**: 7818–20
 112. Kulish D, Lee J, Lomakin I, Nowicka B, Das A, Darst S, Normet K & Borukhov S (2000) The functional role of basic patch, a structural element of Escherichia coli transcript cleavage factors GreA and GreB. *J. Biol. Chem.* **275**: 12789–98
 113. De la Tour CB, Passot FM, Toueille M, Mirabella B, Guérin P, Blanchard L, Servant P, de Groot A, Sommer S & Armengaud J (2013) Comparative proteomics reveals key proteins recruited at the nucleoid of Deinococcus after irradiation-induced DNA damage. *Proteomics* **13**: 3457–3469
 114. Lamour V, Hogan BP, Erie DA & Darst SA (2006) Crystal structure of Thermus aquaticus Gfh1, a Gre-factor paralog that inhibits rather than stimulates transcript cleavage. *J. Mol. Biol.* **356**: 179–188
 115. Lamour V, Rutherford ST, Kuznedelov K, Ramagopal UA, Gourse RL, Severinov K & Darst SA (2008) Crystal structure of Escherichia coli Rnk, a new RNA polymerase-interacting protein. *J. Mol. Biol.* **383**: 367–379
 116. Landick R (2006) The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 1062–1066
 117. Laptenko O & Borukhov S (2003) Biochemical assays of Gre factors of Thermus thermophilus. In *Methods in enzymology* pp 219–232
 118. Laptenko O, Kim S-S, Lee J, Starodubtseva M, Cava F, Berenguer J, Kong X-P & Borukhov S (2006) pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *EMBO J.* **25**: 2131–41
 119. Laptenko O, Lee J, Lomakin I & Borukhov S (2003) Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *EMBO J.* **22**: 6322–34
 120. Larson MH, Mooney RA, Peters JM, Windgassen T, Nayak D, Gross CA, Block SM,

- Greenleaf WJ, Landick R & Weissman JS (2014) A pause sequence enriched at translation start sites drives transcription dynamics in vivo. *Science* (80-.). **344**: 1042–1047
121. Le TT, Yang Y, Tan C, Suhanovsky MM, Fulbright RM, Inman JT, Li M, Lee J, Perelman S, Roberts JW, Deaconescu AM & Wang MD (2018) Mfd dynamically regulates transcription via a release and catch-up mechanism. *Cell* **172**: 344–357
122. Lecointe F, Shevelev I V., Bailone A, Sommer S & Hübscher U (2004) Involvement of an X family DNA polymerase in double-stranded break repair in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **53**: 1721–1730
123. Lee H-Y, Wong T-Y, Kuo J & Liu J-K (2014) The effect of Mn(II) on the autoinducing growth inhibition factor in *Deinococcus radiodurans*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **44**: 645–652
124. Lee J-H, Lennon CW, Ross W & Gourse RL (2012) Role of the coiled-coil tip of *Escherichia coli* DksA in promoter control. *J. Mol. Biol.* **416**: 503–17
125. Leibowitz PJ, Schwartzberg LS & Bruce AK (1976) The in vivo association of manganese with the chromosome of *Micrococcus radiodurans*. *Photochem. Photobiol.* **23**: 45–50
126. Lennon CW, Ross W, Martin-Tumasz S, Touloukhonov I, Vrentas CE, Rutherford ST, Lee J-H, Butcher SE & Gourse RL (2012) Direct interactions between the coiled-coil tip of DksA and the trigger loop of RNA polymerase mediate transcriptional regulation. *Genes Dev.* **26**: 2634–2646
127. Levin-Zaidman S, Englander J, Shimoni E, Sharma AK, Minton KW & Minsky A (2003) Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* (80-.). **299**: 254–256
128. Li M, Sun H, Feng Q, Lu H, Zhao Y, Zhang H, Xu X, Jiao J, Wang L & Hua Y (2013) Extracellular dGMP enhances *Deinococcus radiodurans* tolerance to oxidative stress. *PLoS One* **8**: e54420
129. Liu J & Doetsch PW (1996) Template strand gap bypass is a general property of prokaryotic RNA polymerases: implications for elongation mechanisms. *Biochemistry* **35**: 14999–15008
130. Liu Y, Zhou J, Omelchenko M V., Beliaev AS, Venkateswaran A, Stair J, Wu L, Thompson DK, Xu D, Rogozin IB, Gaidamakova EK, Zhai M, Makarova KS, Koonin E V. & Daly MJ (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 4191–4196
131. Lu H, Xia W, Chen H, Yin L, Zhao X, Xu G & Hua Y (2011) Characterization of the role of DR0171 in transcriptional response to radiation in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Arch. Microbiol.* **193**: 741–750
132. Luan H, Meng N, Fu J, Chen X, Xu X, Feng Q, Jiang H, Dai J, Yuan X, Lu Y, Roberts AA, Luo X, Chen M, Xu S, Li J, Hamilton CJ, Fang C & Wang J (2014) Genome-Wide Transcriptome and Antioxidant Analyses on Gamma-Irradiated Phases of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS One*

133. Maeda H, Fujita N & Ishihama A (2000) Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3497–503
134. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin E V. & Daly MJ (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 44–79
135. Markillie LM, Varnum SM, Hradecky P & Wong KK (1999) Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*katA*) and superoxide dismutase (*sodA*) mutants. *J. Bacteriol.* **181**: 666–9
136. Marr MT & Roberts JW (2000) Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site. *Mol. Cell* **6**: 1275–85
137. Martinez A & Kolter R (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.* **179**: 5188–94
138. Meima R, Rothfuss HM, Gewin L & Lidstrom ME (2001) Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **183**: 3169–75
139. Mekler V, Minakhin L, Kuznedelov K, Mukhamedyarov D & Severinov K (2012) RNA polymerase-promoter interactions determining different stability of the *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus* transcription initiation complexes. *Nucleic Acids Res.* **40**: 11352–11362
140. Mekler V, Pavlova O & Severinov K (2011) Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase $\sigma 70$ subunit with promoter elements in the context of free $\sigma 70$, RNA polymerase holoenzyme, and the β' - $\sigma 70$ complex. *J. Biol. Chem.* **286**: 270–279
141. Mellon I & Hanawalt PC (1989) Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* **342**: 95–98
142. Mellon I, Spivak G & Hanawalt PC (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**: 241–9
143. Menecier S, Coste G, Servant P, Bailone A & Sommer S (2004) Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 460–469
144. Merrikh H, Machón C, Grainger WH, Grossman AD & Soutanas P (2011) Co-directional replication–transcription conflicts lead to replication restart. *Nature* **470**: 554–557
145. Meyer L, Coste G, Sommer S, Oberto J, Confalonieri F, Servant P & Pasternak C (2018) DdrI, a cAMP receptor protein family member, acts as a major regulator for adaptation of *Deinococcus radiodurans* to various stresses. *J. Bacteriol.* **200**
146. Minton KW (1994) DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **13**: 9–15

147. Miropolskaya N, Esyunina D, Klimašauskas S, Nikiforov V, Artsimovitch I & Kulbachinskiy A (2014) Interplay between the trigger loop and the F loop during RNA polymerase catalysis. *Nucleic Acids Res.* **42**: 544–552
148. Miropolskaya N, Esyunina D & Kulbachinskiy A (2017) Conserved functions of the trigger loop and Gre factors in RNA cleavage by bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **292**: 6744–6752
149. Mishanina T V., Palo MZ, Nayak D, Mooney RA & Landick R (2017) Trigger loop of RNA polymerase is a positional, not acid–base, catalyst for both transcription and proofreading. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: 201702383
150. Mitra P, Ghosh G, Hafeezunnisa M & Sen R (2017) Rho protein: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**: 687–709
151. Molodtsov V, Sineva E, Zhang L, Huang X, Cashel M, Ades SE & Murakami KS (2018) Allosteric effector ppGpp potentiates the inhibition of transcript initiation by DksA. *Mol. Cell* **69**: 828–839.e5
152. Morimatsu K & Kowalczykowski SC (2014) RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: E5133–E5142
153. Murakami KS, Masuda S, Campbell EA, Muzzin O & Darst SA (2002) Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science (80-.).* **296**: 1285–1290
154. Nedialkov YA, Nudler E & Burton ZF (2012) RNA polymerase stalls in a post-translocated register and can hyper-translocate. *Transcription* **3**: 260–9
155. Neuman KC, Abbondanzieri EA, Landick R, Gelles J & Block SM (2003) Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell* **115**: 437–47
156. Newton WA, Beckwith JR, Zipser D & Brenner S (1965) Nonsense mutants and polarity in the Lac operon of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **14**: 290–296
157. Norais CA, Chitteni-Pattu S, Wood EA, Inman RB & Cox MM (2009) DdrB Protein, an alternative Deinococcus radiodurans SSB induced by ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **284**: 21402–21411
158. Ohba H, Satoh K, Sghaier H, Yanagisawa T & Narumi I (2009) Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in Deinococcus radiodurans. *Extremophiles* **13**: 471–479
159. Omelchenko M V, Wolf YI, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Daly MJ, Koonin E V & Makarova KS (2005) Comparative genomics of Thermus thermophilus and Deinococcus radiodurans: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance.

160. Onodera T, Satoh K, Ohta T & Narumi I (2013) Deinococcus radiodurans YgjD and YeaZ are involved in the repair of DNA cross-links. *Extremophiles* **17**: 171–179
161. Opalka N, Chlenov M, Chacon P, Rice WJ, Wriggers W & Darst SA (2003) Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. *Cell* **114**: 335–45
162. Orlova M, Newlands J, Das A, Goldfarb A & Borukhov S (1995) Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4596–600
163. Pani B & Nudler E (2017) Mechanistic insights into transcription coupled DNA repair. *DNA Repair (Amst)*. **56**: 42–50
164. Park J-S, Marr MT & Roberts JW (2002) E. coli transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell* **109**: 757–67
165. Passot FM, Nguyen HH, Dard-Dascot C, Thermes C, Servant P, Espéli O & Sommer S (2015) Nucleoid organization in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans. *Mol. Microbiol.* **97**: 759–774
166. Patel BA, Moreau M, Widom J, Chen H, Yin L, Hua Y & Crane BR (2009) Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans from exposure to UV light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 18183–18188
167. Paul BJ, Berkmen MB & Gourse RL (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 7823–7828
168. Paulino-Lima IG, Fujishima K, Navarrete JU, Galante D, Rodrigues F, Azua-Bustos A & Rothschild LJ (2016) Extremely high UV-C radiation resistant microorganisms from desert environments with different manganese concentrations. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **163**: 327–336
169. Peana M, Chasapis CT, Simula G, Medici S & Zoroddu MA (2018) A Model for Manganese interaction with Deinococcus radiodurans proteome network involved in ROS response and defense. *J. Trace Elem. Med. Biol.*
170. Peana M, Medici S, Pangburn HA, Lamkin TJ, Ostrowska M, Gumienna-Kontecka E & Zoroddu MA (2016) Manganese binding to antioxidant peptides involved in extreme radiation resistance in Deinococcus radiodurans. *J. Inorg. Biochem.* **164**: 49–58
171. Perdue SA & Roberts JW (2010) A backtrack-inducing sequence is an essential component of Escherichia coli σ 70-dependent promoter-proximal pausing. *Mol. Microbiol.* **78**: 636–650
172. Perederina A, Svetlov V, Vassilyeva MN, Tahirov TH, Yokoyama S, Artsimovitch I & Vassilyev DG (2004) Regulation through the secondary channel - structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* **118**: 297–309

173. Peters JM, Mooney RA, Kuan PF, Rowland JL, Keles S & Landick R (2009) Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 15406–15411
174. Petushkov I, Esyunina D & Kulbachinskiy A (2017) Possible roles of σ -dependent RNA polymerase pausing in transcription regulation. *RNA Biol.* **14**: 1678–1682
175. Polyakov A, Richter C, Malhotra A, Koulich D, Borukhov S & Darst SA (1998) Visualization of the binding site for the transcript cleavage factor GreB on Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **281**: 465–473
176. Poteete AR (2011) Recombination phenotypes of Escherichia coli greA mutants. *BMC Mol. Biol.* **12**: 12
177. Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A & Nudler E (2010) Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science (80-.).* **328**: 504–8
178. Rainey FA, Ferreira M, Nobre MF, Ray K, Bagaley D, Earl AM, Battista JR, Gómez-Silva B, McKay CP & da Costa MS (2007) Deinococcus peraridilitoris sp. nov., isolated from a coastal desert. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1408–12
179. Rajpurohit YS, Bihani SC, Waldor MK & Misra HS (2016) Phosphorylation of Deinococcus radiodurans RecA regulates its activity and may contribute to radioresistance. *J. Biol. Chem.* **291**: 16672–16685
180. Ray-Soni A, Bellecourt MJ & Landick R (2016) Mechanisms of bacterial transcription termination: all good things must end. *Annu. Rev. Biochem.* **85**: 319–347
181. Ray-Soni A, Mooney RA & Landick R (2017) Trigger loop dynamics can explain stimulation of intrinsic termination by bacterial RNA polymerase without terminator hairpin contact. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E9233–E9242
182. Revyakin A, Ebright RH & Strick TR (2004) Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 4776–4780
183. Revyakin A, Liu C, Ebright RH & Strick TR (2006) Abortive Initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science (80-.).* **314**: 1139–1143
184. Richardson JP (2002) Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**: 251–260
185. Roghanian M, Yuzenkova Y & Zenkin N (2011) Controlled interplay between trigger loop and Gre factor in the RNA polymerase active centre. *Nucleic Acids Res.* **39**: 4352–4359
186. Roghanian M, Zenkin N & Yuzenkova Y (2015) Bacterial global regulators DksA/ppGpp increase fidelity of transcription. *Nucleic Acids Res.* **43**: 1529–1536
187. Ross W, Sanchez-Vazquez P, Chen AY, Lee J-H, Burgos HL & Gourse RL (2016) ppGpp

- binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response. *Mol. Cell* **62**: 811–823
188. Ross W, Vrentas CE, Sanchez-Vazquez P, Gaal T & Gourse RL (2013) The magic spot: a ppGpp binding site on E. coli RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol. Cell* **50**: 420–429
189. Rutherford ST, Lemke JJ, Vrentas CE, Gaal T, Ross W & Gourse RL (2007) Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **366**: 1243–1257
190. Satoh K, Ohba H, Sghaier H & Narumi I (2006) Down-regulation of radioresistance by LexA2 in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* **152**: 3217–3226
191. Saxowsky TT & Doetsch PW (2006) RNA polymerase encounters with DNA damage: transcription-coupled repair or transcriptional mutagenesis? *Chem. Rev.* **106**: 474–488
192. Schmid AK, Howell HA, Battista JR, Peterson SN & Lidstrom ME (2005a) HspR is a global negative regulator of heat shock gene expression in *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **55**: 1579–1590
193. Schmid AK, Howell HA, Battista JR, Peterson SN & Lidstrom ME (2005b) Global Transcriptional and Proteomic Analysis of the Sig1 Heat Shock Regulon of *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **187**: 3339–3351
194. Schmid AK & Lidstrom ME (2002) Involvement of two putative alternative sigma factors in stress response of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **184**: 6182–9
195. Schmidt MC & Chamberlin MJ (1987) NusA protein of *Escherichia coli* is an efficient transcription termination factor for certain terminator sites. *J. Mol. Biol.* **195**: 809–18
196. Schmier BJ, Chen X, Wolin S & Shuman S (2017) Deletion of the *rnl* gene encoding a nick-sealing RNA ligase sensitizes *Deinococcus radiodurans* to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* **45**: 3812–3821
197. Schmier BJ & Shuman S (2018) *Deinococcus radiodurans* HD-Pnk, a Nucleic Acid End-Healing Enzyme, Abets Resistance to Killing by Ionizing Radiation and Mitomycin C. *J. Bacteriol.* **200**: e00151-18
198. Sekine S, Murayama Y, Svetlov V, Nudler E & Yokoyama S (2015) The ratcheted and ratchetable structural states of RNA polymerase underlie multiple transcriptional functions. *Mol. Cell* **57**: 408–421
199. Selby C & Sancar A (1993) Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science (80)*. **260**: 53–58
200. Selby CP (2017) Mfd Protein and Transcription-Repair Coupling in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.* **93**: 280–295

201. Selvam K, Duncan JR, Tanaka M & Battista JR (2013) DdrA, DdrD, and PprA: components of UV and mitomycin C resistance in *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS One* **8**: e69007
202. Servant P, Jolivet E, Bentchikou E, Menecier S, Bailone A & Sommer S (2007) The ClpPX protease is required for radioresistance and regulates cell division after γ -irradiation in *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **66**: 1231–1239
203. Shankar S, Schlichtman D & Chakrabarty AM (1995) Regulation of nucleoside diphosphate kinase and an alternative kinase in *Escherichia coli*: role of the *sspA* and *rnk* genes in nucleoside triphosphate formation. *Mol. Microbiol.* **17**: 935–43
204. Sharma A, Gaidamakova EK, Grichenko O, Matrosova VY, Hoeke V, Klimenkova P, Conze IH, Volpe RP, Tkavc R, Gostinčar C, Gunde-Cimerman N, DiRuggiero J, Shuryak I, Ozarowski A, Hoffman BM & Daly MJ (2017) Across the tree of life, radiation resistance is governed by antioxidant Mn^{2+} , gauged by paramagnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E9253–E9260
205. Sheng D, Jao J, Li M, Xu P & Zhang J (2009) RecX is involved in the switch between DNA damage response and normal metabolism in *D. radiodurans*. *J. Biochem.* **146**: 337–342
206. Sheng D, Liu R, Xu Z, Singh P, Shen B & Hua Y (2005) Dual negative regulatory mechanisms of RecX on RecA functions in radiation resistance, DNA recombination and consequent genome instability in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst).* **4**: 671–678
207. Shi Y, Wu W, Qiao H, Yue L, Ren L, Zhang S, Yang W & Yang Z (2016) The protein PprI provides protection against radiation injury in human and mouse cells. *Sci. Rep.* **6**: 26664
208. Sivaramakrishnan P, Sepúlveda LA, Halliday JA, Liu J, Núñez MAB, Golding I, Rosenberg SM & Herman C (2017) The transcription fidelity factor GreA impedes DNA break repair. *Nature* **550**: 214–218
209. Slade D & Radman M (2011) Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**: 133–191
210. Smith AJ & Savery NJ (2008) Effects of the bacterial transcription-repair coupling factor during transcription of DNA containing non-bulky lesions. *DNA Repair (Amst).* **7**: 1670–1679
211. Sosunov V, Sosunova E, Mustaev A, Bass I, Nikiforov V & Goldfarb A (2003) Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *EMBO J.* **22**: 2234–2244
212. Sosunov V, Zorov S, Sosunova E, Nikolaev A, Zakeyeva I, Bass I, Goldfarb A, Nikiforov V, Severinov K & Mustaev A (2005) The involvement of the aspartate triad of the active center in all catalytic activities of multisubunit RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **33**: 4202–4211
213. Sosunova E, Sosunov V, Epshtein V, Nikiforov V & Mustaev A (2013) Control of transcriptional fidelity by active center tuning as derived from RNA polymerase endonuclease reaction. *J. Biol. Chem.* **288**: 6688–703
214. Sosunova E, Sosunov V, Kozlov M, Nikiforov V, Goldfarb A & Mustaev A (2003) Donation

- of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor Gre. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 15469–74
215. Stebbins CE, Borukhov S, Orlova M, Polyakov A, Goldfarb A & Darst SA (1995) Crystal structure of the GreA transcript cleavage factor from *Escherichia coli*. *Nature* **373**: 636–640
216. Sugiman-Marangos SN, Weiss YM & Junop MS (2016) Mechanism for accurate, protein-assisted DNA annealing by *Deinococcus radiodurans* DdrB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 4308–13
217. Svetlov V & Nudler E (2009) Macromolecular micromovements: how RNA polymerase translocates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**: 701–707
218. Svetlov V, Vassylyev DG & Artsimovitch I (2004) Discrimination against deoxyribonucleotide substrates by bacterial RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **279**: 38087–38090
219. Symersky J, Perederina A, Vassylyeva MN, Svetlov V, Artsimovitch I & Vassylyev DG (2006) Regulation through the RNA polymerase secondary channel. Structural and functional variability of the coiled-coil transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**: 1309–1312
220. Tagami S, Sekine S, Kumarevel T, Hino N, Murayama Y, Kamegamori S, Yamamoto M, Sakamoto K & Yokoyama S (2010) Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein. *Nature* **468**: 978–982
221. Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park M-J, Eisen JA, Peterson SN & Battista JR (2004) Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. *Genetics* **168**: 21–33
222. Tehranchi AK, Blankschien MD, Zhang Y, Halliday JA, Srivatsan A, Peng J, Herman C & Wang JD (2010) The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell* **141**: 595–605
223. Tian B, Wu Y, Sheng D, Zheng Z, Gao G & Hua Y (2004) Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*. *Luminescence* **19**: 78–84
224. Tian B, Xu Z, Sun Z, Lin J & Hua Y (2007) Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1770**: 902–911
225. Timmins J, Gordon E, Caria S, Leonard G, Acajjaoui S, Kuo M-S, Monchois V & McSweeney S (2009) Structural and mutational analyses of *Deinococcus radiodurans* UvrA2 provide insight into DNA binding and damage recognition by UvrAs. *Structure* **17**: 547–558
226. Timmins J & Moe E (2016) A Decade of biochemical and structural studies of the DNA repair machinery of *Deinococcus radiodurans*: major findings, functional and mechanistic insight and challenges. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **14**: 168–176

227. Touloukhonov I, Artsimovitch I & Landick R (2001) Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins. *Science* (80-.). **292**: 730–733
228. Touloukhonov I & Landick R (2003) The flap domain is required for pause RNA hairpin inhibition of catalysis by RNA polymerase and can modulate intrinsic termination. *Mol. Cell* **12**: 1125–36
229. Touloukhonov I, Zhang J, Palangat M & Landick R (2007) A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing. *Mol. Cell* **27**: 406–419
230. Ul Hussain Shah AM, Zhao Y, Wang Y, Yan G, Zhang Q, Wang L, Tian B, Chen H & Hua Y (2014) A Mur regulator protein in the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* **9**: e106341
231. Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Perederina A, Tahirov TH & Artsimovitch I (2007a) Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature* **448**: 157–162
232. Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Zhang J, Palangat M, Artsimovitch I & Landick R (2007b) Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. *Nature* **448**: 163–168
233. Vassylyeva MN, Svetlov V, Dearborn AD, Klyuyev S, Artsimovitch I & Vassylyev DG (2007) The carboxy-terminal coiled-coil of the RNA polymerase β' -subunit is the main binding site for Gre factors. *EMBO Rep.* **8**: 1038–1043
234. Viswanathan A & Doetsch PW (1998) Effects of nonbulky DNA base damages on *Escherichia coli* RNA polymerase-mediated elongation and promoter clearance. *J. Biol. Chem.* **273**: 21276–81
235. Vrentas CE, Gaal T, Ross W, Ebright RH & Gourse RL (2005) Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the β' subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev.* **19**: 2378–2387
236. Wang D, Bushnell DA, Westover KD, Kaplan CD & Kornberg RD (2006) Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* **127**: 941–954
237. Wang D & Hawley DK (1993) Identification of a 3'-5' exonuclease activity associated with human RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 843–7
238. Wang L, Xu G, Chen H, Zhao Y, Xu N, Tian B & Hua Y (2008) DrRRA: a novel response regulator essential for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **67**: 1211–1222
239. Wang Y, Xu Q, Lu H, Lin L, Wang L, Xu H, Cui X, Zhang H, Li T & Hua Y (2015) Protease activity of PprI facilitates DNA damage response: Mn(2+)-dependence and substrate sequence-specificity of the proteolytic reaction. *PLoS One* **10**: e0122071
240. Warfel JD & LiCata VJ (2015) Enhanced DNA binding affinity of RecA protein from *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)*. **31**: 91–96

241. Wen L, Yue L, Shi Y, Ren L, Chen T, Li N, Zhang S, Yang W & Yang Z (2016) Deinococcus radiodurans pprI expression enhances the radioresistance of eukaryotes. *Oncotarget* **7**: 15339–55
242. White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin H, Jiang L, Pamphile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, et al (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans R1. *Science* (80). **286**: 1571–1577
243. Wilkinson SP & Grove A (2004) HucR, a novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from Deinococcus radiodurans. *J. Biol. Chem.* **279**: 51442–51450
244. Wösten MM (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 127–50
245. Yang P, Chen Z, Shan Z, Ding X, Liu L & Guo J (2014) Effects of FMN riboswitch on antioxidant activity in Deinococcus radiodurans under H₂O₂ stress. *Microbiol. Res.* **169**: 411–416
246. Yanofsky C & Ito J (1966) Nonsense codons and polarity in the tryptophan operon. *J. Mol. Biol.* **21**: 313–334
247. Yuzenkova Y, Bochkareva A, Tadigotla VR, Roghanian M, Zorov S, Severinov K & Zenkin N (2010) Stepwise mechanism for transcription fidelity. *BMC Biol.* **8**: 54
248. Yuzenkova Y & Zenkin N (2010) Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 10878–10883
249. Zaychikov E, Martin E, Denissova L, Kozlov M, Markovtsov V, Kashlev M, Heumann H, Nikiforov V, Goldfarb A & Mustaev A (1996) Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science* (80-.). **273**: 107–9
250. Zenkin N & Yuzenkova Y (2015) New insights into the functions of transcription factors that bind the RNA polymerase secondary channel. *Biomolecules* **5**: 1195–1209
251. Zenkin N, Yuzenkova Y & Severinov K (2006) Transcript-assisted transcriptional proofreading. *Science* (80-.). **313**: 518–520
252. Zhang C, Wei J, Zheng Z, Ying N, Sheng D & Hua Y (2005) Proteomic analysis of Deinococcus radiodurans recovering from gamma-irradiation. *Proteomics* **5**: 138–143
253. Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K & Darst SA (1999) Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* **98**: 811–24
254. Zhang H, Xu Q, Lu M, Xu X, Wang Y, Wang L, Zhao Y & Hua Y (2014) Structural and functional studies of MutS2 from Deinococcus radiodurans. *DNA Repair (Amst)*. **21**: 111–119
255. Zhao P, Zhou Z, Zhang W, Lin M, Chen M & Wei G (2015) Global transcriptional analysis of Escherichia coli expressing IrrE, a regulator from Deinococcus radiodurans, in response to NaCl shock. *Mol. Biosyst.* **11**: 1165–71
256. Zhao Z, Zhou Z, Li L, Xian X, Ke X, Chen M & Zhang Y (2014) A copper-responsive gene

cluster is required for copper homeostasis and contributes to oxidative resistance in *Deinococcus radiodurans* R1. *Mol. Biosyst.* **10**: 2607–16

257. Zhou J, Ha KS, La Porta A, Landick R & Block SM (2011) Applied force provides insight into transcriptional pausing and its modulation by transcription factor NusA. *Mol. Cell* **44**: 635–46

258. Zhou Q, Zhang X, Xu H, Xu B & Hua Y (2006) RadA: A protein involved in DNA damage repair processes of *Deinococcus radiodurans* R1. *Chinese Sci. Bull.* **51**: 2993–2999

259. Zhou W & Doetsch PW (1993) Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 6601–5

ПРИЛОЖЕНИЕ

Схемы клонирования генов

Плазмида	Использованные праймеры	Стадии
pET28 Gfh1 D3T	Dr-Gfh1-d 5'-GATATACCATGGTGACCCAGACCAAGCAAGTAGCGC-3' Dr-Gfh1-r 5'-GTGGTGCTCGAGGTAAGTCTGATGCCCTTGACCTTG-3' gfh1d3t-r 5'-GGCCGGTGTCGTCGATGCTGCTGGTTTCC-3'	1. ПЦР с праймерами Dr-Gfh1-d и gfh1d3t-r на матрице pET28 Gfh1 Dra. 2. Использование ПЦР-продукта из предыдущей реакции в качестве мегапраймера в ПЦР с Dr-Gfh1-r на матрице pET28 Gfh1 Dra. 3. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.
pET28 Gfh1 NTCD	Tth-Gfh-d 5'-GATATACCATGGCGCGCGAGGTGAAGCTC-3' Dra-Gfh1-r 5'-GTGGTGGCGGCCGCTACTCGATGCCCTTGACCTTG-3' Dra-Gfh-CTD-d 5'-CGTGATCCTGGAGGAGGAAATGGCGGGCGCTCGAAC-3'	1. ПЦР с праймерами Dra-Gfh-CTD-d и Dra-Gfh1-r на матрице pET28 Gfh1 Dra. 2. Использование ПЦР-продукта из предыдущей реакции в качестве мегапраймера в ПЦР с Tth-Gfh-d на матрице pET28 Gfh1 Tth, кодирующей Gfh1-фактор <i>T. thermophilus</i> . 3. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.
pET28 Gfh1 Ala	Dr-Gfh1-d 5'-GATATACCATGGTGACCCAGACCAAGCAAGTAGCGC-3' Dr-Gfh1-r 5'-GTGGTGCTCGAGGTAAGTCTGATGCCCTTGACCTTG-3' gfh1_4a_r 5'-GGCCGGTGGCTGCGTTGGCGGCGCTGGTTTCC-3'	1. ПЦР с праймерами Dr-Gfh1-d и gfh1_4a_r на матрице pET28 Gfh1 Dra. 2. Использование ПЦР-продукта из предыдущей реакции в качестве мегапраймера в ПЦР с Dr-Gfh1-r на матрице pET28 Gfh1 Dra. 3. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.
pET28 Gfh2 Ala	Dr-Gfh2-d 5'-GATATACCATGGTGACAATGCAACAGCAGATCAGCC-3' Dr-Gfh2-r 5'-GTGGTGCTCGAGGCTTTCCACCATCAGCACCCGG-3' gfh2_2a-r 5'-GAGGTCGAGGCTCGCGTTGCGGTTGGCCTC-3'	1. ПЦР с праймерами Dr-Gfh2-d и gfh2_2a_r на матрице pET28 Gfh2 Dra. 2. Использование ПЦР-продукта из предыдущей реакции в качестве мегапраймера в ПЦР с Dr-Gfh2-r на матрице pET28 Gfh1 Dra. 3. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.
pET28 Gfh1α Dper	DP_gfh1A-d 5'-CTATCACCATGGCAGCTGAAATCAAAGTACGCG-3' DP_gfh1A-r 5'-CATCATGCGGCCGCGTATTCGATGCTCTTGACCTTGAC-3'	1. ПЦР с праймерами DP_gfh1A-d и DP_gfh1A-r на матрице геномной ДНК <i>D. peraridillitoris</i> . 2. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.
pET28 Gfh1β Dper	DP_gfh1M-d 5'-CTATCACCATGGCCAGAGAGTGAAGTGACCCGCAAG-3' DP_gfh1M-r 5'-CATCATCTCGAGTTCGACGGACTTCACGGTGTAGCGCATC-3'	1. ПЦР с праймерами DP_gfh1M-d и DP_gfh1M-r на матрице геномной ДНК <i>D. peraridillitoris</i> . 2. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.
pET28 Gfh2α Dper	DP_gfh2E-d 5'-TCATCACCATGGTGAGGACGACGCCAAATTGACGCGAG-3' DP_gfh2E-r 5'-CATCATGCGGCCGCGCGTCTGATGCTTTTACGG-3'	1. ПЦР с праймерами DP_gfh2E-d и DP_gfh2E-r на матрице геномной ДНК <i>D. peraridillitoris</i> . 2. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.
pET28 Gfh2β Dper	DP_gfh2N-d 5'-CTATCACCATGGCCTCCAGACCTTCCACACTGACCCCGC-3' DP_gfh2N-r 5'-CATCATCTCGAGGCCCTCGAAGGTACCTGCTGTACCATG-3'	1. ПЦР с праймерами DP_gfh2N-d и DP_gfh2N-r на матрице геномной ДНК <i>D. peraridillitoris</i> . 2. Клонирование в pET28 по рестриктивным сайтам NcoI, XhoI.

pET28 SigA R167C	Sigma_Dra_NdeI_d 5'-AGACACCATATGCAGGTCTACCTCGCCGGGCAG-3' Sigma_Dra_XhoI_r 5'-AGACACCTCGAGTCAGTCGAGGAAGTCGCGCAG-3' Sigma_Dra_R167C_r 5'-TTGTAGCGGCGGCAGTACTCGAACTTCTCG-3'	1. ПЦР с праймерами Sigma_Dra_NdeI_d и Sigma_Dra_R167C_r на матрице pET28 SigA Dra. 2. Использование ПЦР-продукта из предыдущей реакции в качестве мегапраймера в ПЦР с Sigma_Dra_XhoI_r на матрице pET28 SigA Dra. 3. Клонирование в pET28 по рестриктым сайтам NdeI, XhoI.
pET28 Sig1 Dra	Sig1_Dra_NdeI_d 5'-AGACACCATATGCGTGAAGGTCAGTGTGCCGG-3' Sig1_Dra_XhoI_r 5'-AGACACCTCGAGTCAATGCACGTCCGACACGT-3'	1. ПЦР с праймерами Sig1_Dra_NdeI_d и Sig1_Dra_XhoI_r на матрице геномной ДНК <i>D. radiodurans</i> . 2. Клонирование в pET28 по рестриктым сайтам NdeI, XhoI.
pET28 Mfd Dra	Dra-Mfd-NdeI-d 5'-AGTGAGCATATGACCCTTAGCGCTACCCCAACCTCG-3' Dra-Mfd-XhoI-r 5'-CAGACACTCGAGTCACCCGAAGTACCCAGCACC-3'	1. ПЦР с праймерами Dra-Mfd-NdeI-d и Dra-Mfd-XhoI-r на матрице геномной ДНК <i>D. radiodurans</i> . 2. Клонирование в pET28 по рестриктым сайтам NdeI, XhoI.
pBAD/HisB NusA Dra	Dra-NusA-NcoI-d 5'-AGCGAGCATATGTTACAAGGAGTGGTTATG-3' Dra-NusA-XhoI-r 5'-CAGCCACTCGAGTCAGCTTTCGGGGTTGACATCG-3'	1. ПЦР с праймерами Dra-NusA-NcoI-d и Dra-NusA-XhoI-r на матрице геномной ДНК <i>D. radiodurans</i> . 2. Клонирование в pBAD/HisB по рестриктым сайтам NcoI, XhoI.