

ЖИЛИНА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**Функции  $\sigma$ -субъединиц РНК-полимераз *Escherichia coli* и  
*Thermus aquaticus* на разных стадиях транскрипции**

03.01.03 - молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2012

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук (г. Москва).

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук

Кульбачинский Андрей Владимирович

**Официальные оппоненты:**

**Озолин Ольга Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, заведующая лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса.

**Ксензенко Владимир Николаевич**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН, старший научный сотрудник, руководитель группы генной инженерии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук.

Защита состоится «15» ноября 2012 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций).

Автореферат разослан \_\_\_\_ октября 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Крашенинников И.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

ДНК-зависимая РНК-полимераза (РНКП) является эволюционно консервативным ферментом, который осуществляет процесс транскрипции (синтез РНК на матрице ДНК) в клетках всех живых организмов. Транскрипцию разделяют на три основных этапа: инициацию, элонгацию и терминацию, которые сопровождаются различными перестройками структуры транскрипционного комплекса и изменениями контактов РНКП с ДНК и РНК, а также регулируются с участием множества факторов.

Инициация транскрипции включает несколько этапов: связывание РНКП со специфическими промоторными последовательностями ДНК; образование сначала закрытого, а затем открытого промоторного комплекса, которое сопровождается формированием расплавленной области в ДНК; начало синтеза РНК и переход к элонгации. У бактерий инициацию транскрипции осуществляет холофермент РНКП, который состоит из кор-фермента (субъединичный состав  $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ), содержащего активный центр и выполняющего функцию синтеза РНК, и фактора инициации -  $\sigma$ -субъединицы.  $\sigma$ -субъединица осуществляет сиквенс-специфическое узнавание промоторных элементов в ДНК и принимает непосредственное участие в расхождении цепей ДНК при формировании открытого промоторного комплекса. В клетках бактерий обычно присутствует несколько  $\sigma$ -субъединиц. Большинство промоторов узнаются при участии главной  $\sigma$ -субъединицы ( $\sigma^{70}$  *Escherichia coli*,  $\sigma^A$  у других бактерий). Наиболее характерными специфическими элементами таких промоторов являются -35 и -10 элементы; некоторые промоторы содержат дополнительный TG-элемент, расположенный слева от -10 элемента.

Элонгация представляет собой процессивный и точный синтез РНК, который может сопровождаться временными остановками - паузами, которые имеют важное регуляторное значение, и завершается терминацией. Недавно было показано, что  $\sigma$ -субъединица может присутствовать в элонгационном комплексе и вызывать формирование  $\sigma$ -зависимых пауз транскрипции на небольшом расстоянии от промотора, взаимодействуя с участками нематричной цепи ДНК, напоминающими -10 промоторный элемент.

В  $\sigma$ -субъединице РНКП бактерий выделяют четыре района (1, 2, 3 и 4), которые, в свою очередь, разделяют на подрайоны (1.1-1.2, 2.1-2.5, 3.1-3.2 и 4.1-4.2). Район 2  $\sigma$ -субъединицы осуществляет узнавание последовательности -10 промоторного элемента в ДНК, принимает непосредственное участие в расхождении цепей дуплекса ДНК при формировании открытого промоторного комплекса и играет ключевую роль в формировании  $\sigma$ -зависимой паузы в ходе элонгации. К настоящему времени подробно изучена роль консервативных аминокислотных остатков района 2  $\sigma$ -субъединицы в плавлении ДНК и в образовании открытого промоторного комплекса. В то же время, известно, что разные РНКП (в частности, РНКП термофильных и мезофильных бактерий) могут значительно различаться по транскрипционным свойствам, в том числе, на стадии инициации транскрипции. Молекулярные механизмы, обеспечивающие данные функциональные различия, во многом остаются неизвестными. В частности, мало известно о роли неконсервативных аминокислотных остатков района 2 и других районов  $\sigma$ -субъединицы в данном процессе. Кроме того, недостаточно изучены функции  $\sigma$ -субъединицы в регуляции элонгации транскрипции и

роль района 2 в образовании  $\sigma$ -зависимых пауз. Была высказана гипотеза, что в процессе формирования пауз, также как и в ходе инициации транскрипции, образуются напряженные транскрипционные комплексы, в которых внутри РНКП может находиться избыточная ДНК. Однако, экспериментальных данных, доказывающих образование таких комплексов, ранее получено не было. Кроме того, до настоящего времени все исследования  $\sigma$ -зависимых пауз проводили только с использованием РНКП *E. coli* и, следовательно, ничего не было известно о существовании таких пауз у других бактерий и о возможных видоспецифических особенностях данного процесса.

Следует отметить, что особый интерес для проведения сравнительных функциональных исследований механизмов транскрипции и анализа функций  $\sigma$ -субъединицы на разных стадиях этого процесса представляют РНКП термофильных бактерий, так как данные РНКП обладают рядом уникальных особенностей, связанных с адаптацией к высоким температурам. В частности, известно, что данные РНКП осуществляют плавление промоторной ДНК в ходе инициации при более высоких температурах, чем РНКП мезофильных бактерий. Кроме того, для РНКП термофильных бактерий (*Thermus aquaticus* и *Thermus thermophilus*) существуют данные высокого разрешения о трехмерной структуре фермента.

Изучение функций  $\sigma$ -субъединицы РНКП на разных стадиях транскрипции и ее роли в регуляции генной экспрессии представляет не только фундаментальный интерес, но также имеет важное практическое значение, поскольку терапия многих инфекционных заболеваний основана на применении антибиотиков, подавляющих активность РНКП болезнетворных бактерий, в том числе, на стадии инициации транскрипции.

### **Цели и задачи исследования**

Целью данной работы являлось исследование роли различных районов  $\sigma$ -субъединиц РНК-полимераз мезофильной бактерии *E. coli* и термофильной бактерии *T. aquaticus* в плавлении ДНК в процессе образования открытого промоторного комплекса и исследование механизма формирования  $\sigma$ -зависимых пауз транскрипции.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить структурно-функциональные особенности  $\sigma$ -субъединиц РНК-полимераз *E. coli* и *T. aquaticus*, оказывающие влияние на температуру плавления промоторной ДНК при формировании открытого промоторного комплекса.
2. Исследовать молекулярный механизм формирования  $\sigma$ -зависимых пауз транскрипции РНКП *E. coli*, изучить возможность образования данных пауз РНКП *T. aquaticus*; выявить участки кор-фермента и  $\sigma$ -субъединицы РНКП, оказывающие влияние на формирование данных пауз.

## Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе работы впервые проведено сравнение процесса образования открытого промоторного комплекса с участием  $\sigma$ -субъединиц РНК-полимераз мезофильной бактерии *E. coli* и термофильной *T. aquaticus* и выявлены различия в структуре данных  $\sigma$ -субъединиц, влияющие на температуру плавления промоторной ДНК данными РНКП. Показано, что замены *N*-концевой части (район 1 и линкер между районами 1 и 2) и района 2  $\sigma^{70}$ -субъединицы РНКП мезофильной бактерии *E. coli* на соответствующие участки  $\sigma^A$ -субъединицы термофильной бактерии *T. aquaticus* приводят к повышению температуры плавления промоторной ДНК. Установлено, что неконсервативные аминокислотные остатки района 2  $\sigma$ -субъединицы совместно определяют температуру открывания промотора, видимо, за счет влияния на взаимодействия между  $\sigma$ -субъединицей, кор-ферментом и ДНК. Таким образом, было показано, что замены неконсервативных аминокислотных остатков в функционально важных участках  $\sigma$ -субъединицы могут обеспечивать адаптацию высококонсервативного механизма формирования открытого промоторного комплекса к различным условиям обитания у термофильных и мезофильных бактерий.

Разработана модельная система *in vitro* для изучения  $\sigma$ -зависимых пауз на стадии элонгации транскрипции. С использованием данной модели установлено, что основную роль в формировании сигнала  $\sigma$ -зависимой паузы играет участок в транскрибируемой ДНК, соответствующий -10 элементу промотора; присутствие TG-элемента дополнительно стимулирует узнавание сигнала паузы РНКП. Показано, что РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* в присутствии главной  $\sigma$ -субъединицы ( $\sigma^{70}$  или  $\sigma^A$ , соответственно) могут узнавать данный сигнал паузы с высокой эффективностью. Замены неконсервативных аминокислотных остатков в участке района 2  $\sigma$ -субъединицы, взаимодействующем с кор-ферментом РНКП (подрайоны 2.1 и 2.2), оказывают значительное влияние на эффективность формирования  $\sigma$ -зависимой паузы, вероятно, ослабляя связывание  $\sigma$ -субъединицы с элонгационным комплексом.

При исследовании механизма формирования  $\sigma$ -зависимой паузы было показано, что элонгационный комплекс в состоянии  $\sigma$ -зависимой паузы находится в смещенном назад состоянии, в котором 3'-конец транскрипта вытесняется из активного центра РНКП, вследствие чего продолжение синтеза РНК становится невозможным. При определении границ элонгационного комплекса методами футпринтинга было показано, что образованию смещенного комплекса предшествует формирование напряженного комплекса, в котором внутри РНКП помещается избыточная ДНК. Показано, что мутации в участках кор-фермента РНКП *E. coli*, контактирующих с ДНК в активном центре и спереди по ходу транскрипции, стимулирует образование  $\sigma$ -зависимой паузы, вероятно, дестабилизируя напряженный комплекс и облегчая обратное движение РНКП.

Полученные в нашей работе данные расширяют имеющиеся знания о молекулярных механизмах транскрипции и важны для понимания основных принципов регуляции генной экспрессии, а также механизмов адаптации высококонсервативных ферментов к разным условиям жизни бактерий. Результаты данной работы могут быть использованы при разработке новых подходов к направленной регуляции транскрипции на этапах инициации и элонгации, а также для получения новых ингибиторов РНКП, имеющих терапевтическое значение.

## **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на следующих конференциях: 14-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2010), IV Международная Школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология клетки» (Москва – Звенигород, 2010), XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011) и 16-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2012).

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях и 4 публикации в материалах всероссийских конференций.

## **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на \_\_\_\_\_ страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков и 1 таблицу.

Список цитируемой литературы включает \_\_\_\_\_ названий.

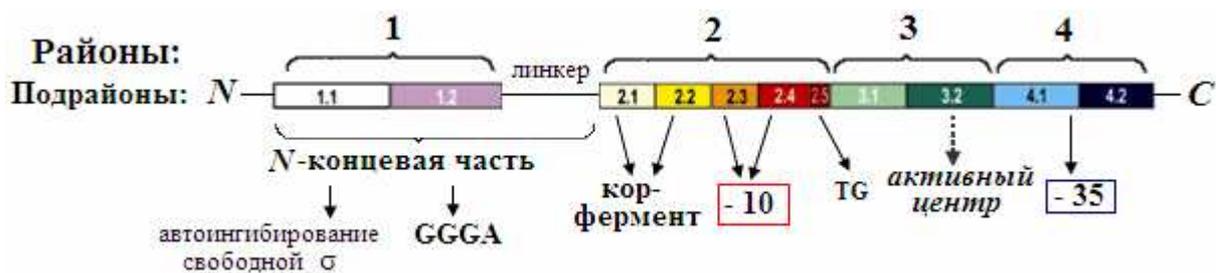
## КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Роль различных участков $\sigma$ -субъединиц РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* в плавлении промоторной ДНК

Формирование открытого промоторного комплекса является одним из ключевых событий инициации транскрипции и включает плавление ДНК вокруг точки начала синтеза РНК, которое происходит при специфическом взаимодействии -10 области промотора и высококонсервативного района 2  $\sigma$ -субъединицы в составе холофермента РНКП (Juang and Helmann, 1994; Roberts and Roberts, 1996; Marr and Roberts, 1997; Gross et al., 1998; Panaghie et al., 2000). Для РНКП бактерий, адаптированных к условиям жизни при разных температурах, характерны различия в оптимальной температуре формирования открытых промоторных комплексов. РНКП термофильных бактерий, осуществляющие инициацию транскрипции при высоких температурах (60 °С и выше), при умеренных и низких температурах плавят ДНК значительно менее эффективно по сравнению с РНКП мезофильных бактерий, например, *E. coli*, для которой оптимальной является температура 37 °С (Remond-O'Donnel and Zillig, 1969; Nikiforov, 1970; Xue et al., 2000; Minakhin et al., 2001). По всей видимости, различия в температуре плавления промоторной ДНК связаны с тем, что повышенная жесткость структуры термофильных РНКП, которая при высокой температуре обеспечивает стабильность фермента, при пониженной температуре ограничивает необходимую для его функционирования конформационную подвижность (Fields, 2001; Xue et al., 2000; Vieille and Zeikus, 2001). Таким образом, несмотря на сходство структур РНКП разных бактерий, где установлены функции высококонсервативных аминокислотных остатков  $\sigma$ -субъединицы в узнавании и плавлении промоторной ДНК, между РНКП термофильных и мезофильных бактерий существуют значительные адаптивные различия, в которых могут играть роль неконсервативные участки РНКП. Сравнение особенностей функционирования РНКП термофильной бактерии *T. aquaticus*, для которой имеются данные о трехмерной структуре фермента (Zhang et al., 1999; Murakami et al., 2002), и хорошо исследованной с биохимической точки зрения РНКП мезофильной *E. coli* при разных температурах позволяет исследовать роль отдельных районов и участков фермента на разных стадиях транскрипции.

Недавно было показано, что РНКП термофильной бактерии *T. aquaticus* осуществляет плавление промоторной ДНК при температуре 45 °С, но при этом, в отличие от РНКП *E. coli*, не может открывать промоторы при 20 °С. Также было показано, что чувствительность РНКП *T. aquaticus* к пониженной температуре в процессе плавления ДНК обусловлена  $\sigma$ -субъединицей, поскольку гибридный холофермент, состоящий из кор-фермента *E. coli* и  $\sigma$ -субъединицы *T. aquaticus*, не обладал способностью открывать промотор при 20 °С (Kulbachinsky et al., 2004).

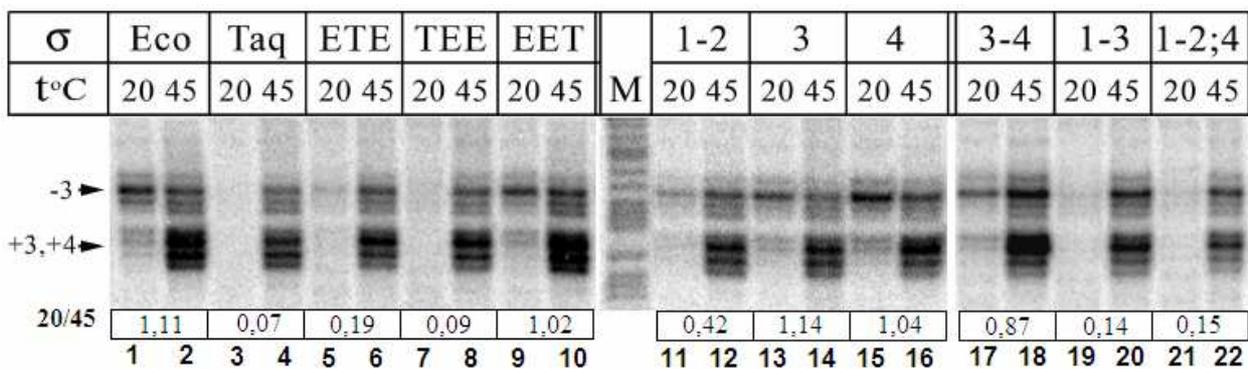
Для того чтобы установить, какой из районов  $\sigma$ -субъединицы (**Рис. 1.1**) определяет чувствительность процесса плавления промотора РНКП *T. aquaticus* при пониженной температуре по сравнению с РНКП *E. coli*, мы использовали мозаичные  $\sigma$ -субъединицы с заменами основных районов  $\sigma^{70}$ -субъединицы *E. coli* на районы  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus*. В мозаичной  $\sigma$ -субъединице ТЕЕ заменили N-концевую часть (район 1 и неконсервативный линкер между районами 1 и 2), в субъединице ЕТЕ заменили район 2, и в субъединице ЕЕТ заменили C-концевые районы 3 и 4.



**Рис. 1.1.** Деление  $\sigma$ -субъединицы на районы (1, 2, 3 и 4) и подрайоны (1.1 - 1.2, 2.1 - 2.5, 3.1 - 3.2 и 4.1 - 4.2) с указанием важнейших взаимодействий с различными промоторными элементами (-10, -35, TG и G/GGA элементы).

Плавление ДНК вокруг стартовой точки транскрипции изучали с использованием метода перманганатного футпринтинга. При анализе результатов экспериментов, проведенных с использованием РНКП, содержащих кор-фермент *E. coli* и мозаичные  $\sigma$ -субъединицы, было показано, что различия в температуре открывания промотора РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* определяются аминокислотными заменами в *N*-концевой части  $\sigma$ -субъединицы (которая включает район 1 и линкер между районами 1 и 2) (**Рис. 1.2**, дорожка 7 - ТЕЕ) и в районе 2 (**Рис. 1.2**, дорожка 5 - ЕТЕ), в то время как замена районов 3 и 4  $\sigma$ -субъединицы *E. coli* на соответствующие районы *T. aquaticus* не приводила к потере способности данной РНКП осуществлять плавление ДНК при 20 °С (**Рис. 1.2**, дорожка 9 - ЕЕТ).

Таким образом, было показано, что различия в температуре открывания промотора РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* определяются аминокислотными заменами в *N*-концевой части и в районе 2  $\sigma$ -субъединицы. Проведение исследования влияния роли отдельных аминокислотных остатков у *E. coli* и *T. aquaticus* в неконсервативной *N*-концевой части  $\sigma$ -субъединицы затруднено из-за большого числа аминокислотных замен в данном районе.



**Рис. 1.2.** Плавление ДНК промотора *lacUV5* при 20 °С и 45 °С РНКП, содержащими кор-фермент *E. coli* и различные  $\sigma$ -субъединицы. Эффективность плавления промотора изучали с использованием метода  $\text{KMnO}_4$ -футпринтинга. Мозаичные  $\sigma$ -субъединицы ЕТЕ, ТЕЕ и ЕЕТ содержали замены районов 2, 1 и 3 - 4  $\sigma^{70}$  *E. coli* на гомологичные районы  $\sigma^A$  *T. aquaticus*, соответственно. Мозаичные  $\sigma$ -субъединицы М1-2, М3, М4 и М1-3, М3-4 и М1-2;4 содержали замены подрайонов в районе 2  $\sigma^{70}$  *E. coli* на соответствующие участки района 2  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus* (см. в тексте). Слева указаны положения модифицированных остатков тимина в нематричной цепи относительно точки старта транскрипции в расплавленной промоторной области. Дорожка «М» - «А + G» маркер последовательности ДНК. «20/45» - отношение интенсивностей сигналов при 20 °С и 45 °С.

Далее мы подробно исследовали влияние аминокислотных замен в районе 2  $\sigma$ -субъединицы на температуру плавления промоторной ДНК. Последовательности аминокислотных остатков в данном участке РНКП у *E. coli* и *T. aquaticus* различаются только в 12 положениях (Рис. 1.3, Б).

Роль высококонсервативных аминокислотных остатков района 2  $\sigma$ -субъединицы, одинаковых для РНКП различных бактерий, к настоящему времени достаточно хорошо изучена. Было показано, что подрайоны 2.1 и 2.2  $\sigma$ -субъединицы взаимодействуют с кор-ферментом РНКП (Gross et al., 1998; Sharp et al., 1999), а подрайоны 2.3 и 2.4 осуществляют узнавание -10 элемента и плавление промоторной ДНК вокруг точки старта транскрипции (Juang and Helmann, 1994; Fenton et al., 2000; Panaghie et al., 2000; Tomsic et al., 2001; Shroeder et al., 2007) (Рис. 1.3, А). Замены консервативных аминокислотных остатков в районе 2 приводят к значительным нарушениям процесса инициации транскрипции.

Для того, чтобы изучить влияние неконсервативных аминокислотных замен в районе 2  $\sigma$ -субъединицы на температуру плавления промоторов РНКП *T. aquaticus* и *E. coli*, мы использовали мозаичные  $\sigma$ -субъединицы с заменами подрайонов района 2  $\sigma^{70}$ -субъединицы *E. coli* на гомологичные участки  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus* (Рис. 1.3, Б). В мозаичных субъединицах первой группы мы осуществили замены следующих участков: подрайонов 2.1 и 2.2 и одного аминокислотного остатка в подрайоне 2.3 (замена 7 аминокислотных остатков, субъединица М1-2), подрайона 2.3 (3 остатка, субъединица М3) и подрайона 2.4 (2 остатка, субъединица М4).

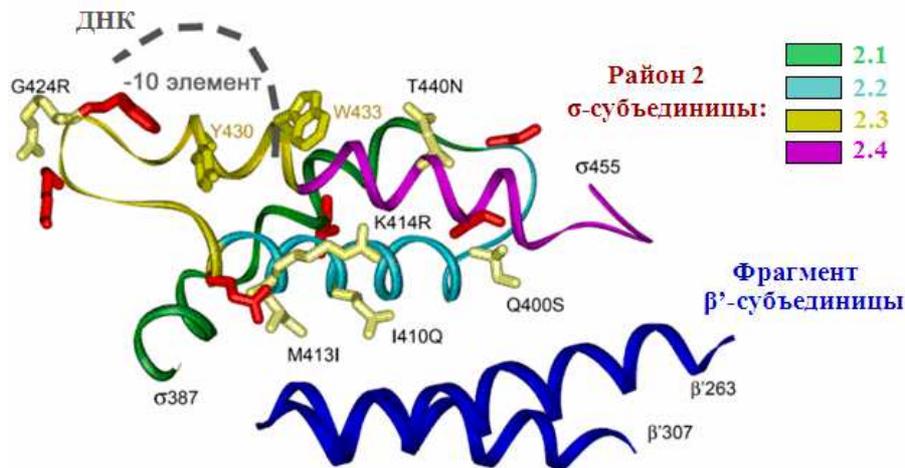
Мозаичные субъединицы второй группы содержали комбинации замен в подрайонах 2.1, 2.2 и 2.3 (субъединица М1-3), в подрайонах 2.3 и 2.4 (субъединица М3-4), в подрайонах 2.1, 2.2 и 2.4 (субъединица М1-2;4) (Рис. 1.3, Б). При анализе результатов экспериментов по плавлению ДНК вокруг стартовой точки транскрипции с использованием РНКП, содержащих кор-фермент *E. coli* и мозаичные  $\sigma$ -субъединицы, было показано, что различия в температуре открывания промотора РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* определяются аминокислотными заменами в подрайонах



**Рис. 1.3.** А - Деление района 2  $\sigma$ -субъединицы на подрайоны 2.1, 2.2, 2.3 и 2.4 (показано цветом). Б - Сравнение последовательностей района 2  $\sigma^{70}$  *E. coli* и  $\sigma^A$  *T. aquaticus* и мозаичных  $\sigma$ -субъединиц ЕТЕ, М1-2, М3, М4, М3-4, М1-3, М1-2;4. Сверху указаны положения аминокислот в нумерации *E. coli*. Красным цветом отмечены замены неконсервативных аминокислотных остатков в районе 2  $\sigma^{70}$ -субъединицы *E. coli*, соответствующие району 2  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus*. Внизу стрелками показаны аминокислоты, замены которых, согласно данным, полученным в нашей работе, оказывают наибольшее влияние на температуру плавления промоторной ДНК.

2.1-2.2, и, в меньшей степени, в подрайонах 2.3 и 2.4 (Рис. 1.2, дор. 11, 13, 15;  $\sigma$ -субъединицы M1-2, M3 и M4, соответственно). Наибольшее влияние на чувствительность процесса плавления промоторной ДНК к пониженной температуре оказывали комбинации аминокислотных замен, одновременно затрагивающие подрайоны 2.1, 2.2 и 2.3 ( $\sigma$ -субъединица M1-3) или 2.1, 2.2 и 2.4 ( $\sigma$ -субъединица M1-2;4) (Рис. 1.2, дор. 19 и 21). Таким образом, различия в температуре плавления промоторов РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* определяются одновременными заменами аминокислотных остатков в различных подрайонах района 2  $\sigma$ -субъединицы.

Итак, в первой части работы было показано, что неконсервативные аминокислотные остатки в разных подрайонах района 2  $\sigma$ -субъединицы совместно определяют температуру открывания промотора, видимо, путем влияния на взаимодействия между  $\sigma$ -субъединицей, кор-ферментом и ДНК в промоторном комплексе. Так, аминокислотные остатки K414 и T440 в подрайонах 2.2 и 2.4 находятся на поверхности  $\sigma$ -субъединицы, обращенной к -10 элементу в ДНК, остатки Q400, I410, M413 в подрайонах 2.1 и 2.2 находятся на поверхности  $\sigma$ -субъединицы, взаимодействующей с мотивом “двойная спираль”  $\beta'$ -субъединицы кор-фермента РНКП, а остаток G424 в подрайоне 2.3 может оказывать влияние на конформационную подвижность района 2 (см. Рис. 1.3 - стрелки; Рис. 1.4). В отличие от ранее исследованных замен консервативных аминокислотных остатков в районе 2, большинство из которых значительным образом нарушают инициацию транскрипции, замены неконсервативных остатков оказывают более специфичное влияние на формирование открытого промоторного комплекса, а именно: приводят к повышению температуры плавления промоторной ДНК.



**Рис. 1.4.** Расположение замен неконсервативных аминокислотных остатков, различающихся в районе 2  $\sigma^{70}$ -субъединицы *E. coli* и районе 2  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus*, на трехмерной структуре холофермента РНКП *T. thermophilus* (Vassilyev et al., 2002). Подрайоны района 2 показаны разными цветами, мотив “двойная спираль”  $\beta'$ -субъединицы изображен темно-синим цветом (нумерация аминокислотных остатков по *E. coli*). Остатки аминокислот  $\sigma$ -субъединицы, которые различаются у *E. coli* и *T. aquaticus*, показаны “палочковой” моделью; шесть аминокислот, вероятно, связанных с чувствительностью к пониженной температуре открывания промотора, показаны светло-желтым цветом. Остатки ароматических аминокислот Y430 и W433, которые взаимодействуют с консервативным аденином во втором положении - 10 элемента нематричной цепи ДНК (TATAAT), отмечены темно-желтым цветом. Расположение - 10 элемента промотора в нематричной цепи ДНК обозначено пунктирной линией.

Таким образом, было показано, что адаптация эволюционно консервативного механизма узнавания промоторов у бактерий к разным температурным условиям может происходить путем замен неконсервативных аминокислотных остатков в функционально важных участках  $\sigma$ -субъединицы РНКП.

## **2. Исследование $\sigma$ -зависимой паузы транскрипции**

### **2.1. Участие $\sigma$ -субъединицы в элонгации транскрипции**

Элонгация транскрипции *in vivo* и *in vitro* сопровождается паузами, которые представляют собой временные остановки синтеза РНК разной природы и выполняют регуляторные функции (Landick, 2006; Komissarova and Kashlev, 1997). Причинами возникновения пауз может быть включение неправильных нуклеотидов в синтезируемую РНК, наличие специальных регуляторных последовательностей в транскрибируемой ДНК и в новосинтезированной РНК (в частности, формирование шпилек особой структуры) и другие факторы (Artsimovich and Landick, 2000; Landick, 2006; Roberts et al., 2008; Kireeva and Kashlev, 2009). При временной остановке синтеза РНК возникает возможность для коррекции неправильно включенных нуклеотидов, связывания регуляторных факторов, синхронизации процессов транскрипции и трансляции или прекращения синтеза данной РНК, если в изменившихся условиях данный продукт более не требуется. Одним из факторов, вызывающих образование пауз транскрипции, является  $\sigma$ -субъединица РНКП. Ранее было установлено, что  $\sigma^{70}$ -субъединица *E. coli* может присутствовать в элонгационных комплексах и вызывать формирование транскрипционных пауз (Ring et al., 1996; Brodolin et al., 2004). Регуляторные промотор-проксимальные  $\sigma^{70}$ -зависимые паузы были первоначально исследованы у лямбдоидных бактериофагов (Ring et al., 1996; Roberts et al., 1998), а позднее были обнаружены в ранней транскрибируемой области *lac*-оперона *E. coli in vitro* (Brodolin et al., 2004; Nickels et al., 2004), а также в целом ряде других клеточных генов *E. coli in vivo* (Hatoum and Roberts, 2008). Для формирования  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы необходимо наличие в нематричной цепи ДНК последовательности, напоминающей -10 элемент промотора (Ring et al., 1996; Brodolin et al., 2004; Nickels et al., 2004). По всей видимости, узнавание -10-подобного элемента в транскрибируемой ДНК в процессе формирования паузы, как и в случае узнавания промоторов, осуществляется районом 2  $\sigma$ -субъединицы; этот же район отвечает за взаимодействие  $\sigma$ -субъединицы и кор-фермента в элонгационном комплексе. Механизмы формирования и функциональная роль  $\sigma$ -зависимых пауз транскрипции к настоящему времени недостаточно изучены.

### **2.2. Сборка искусственного элонгационного комплекса *in vitro***

Для изучения процесса формирования  $\sigma$ -зависимой паузы транскрипции мы применили метод сборки искусственного элонгационного комплекса *in vitro* (Sidorenkov et al., 1998; Komissarova et al., 2003) с использованием конструкций из синтетических олигонуклеотидов, разработанных на основе ранней транскрибируемой области промотора *lacUV5*. Формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы в данной области *lacUV5*-промотора было ранее показано в опытах *in vitro* (Brodolin et al., 2004; Nickels et al., 2004). Используемые олигонуклеотиды соответствовали матричной и нематричной цепям ДНК длиной 60 нт и РНК-транскрипту длиной 20 нт (**Рис. 2.1**).



В случае замены нуклеотидов в последовательности -10-подобного элемента (TCGAAT, конструкция «-10M»), продукты паузы почти полностью отсутствовали (Рис. 2.2, дор. 8 - 10). Полученные данные подтверждают необходимость наличия в нематричной ДНК последовательности, напоминающей -10 элемент промотора, для формирования  $\sigma$ -зависимой паузы в элонгационном комплексе.

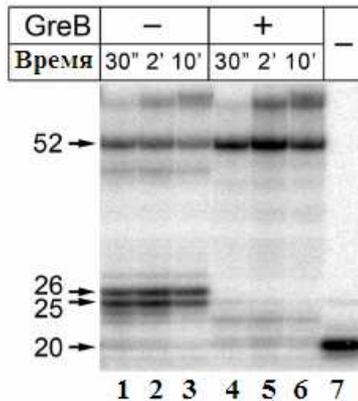
### 2.3. Исследование механизма формирования $\sigma$ -зависимой паузы

Одним из известных механизмов формирования пауз транскрипции является обратное смещение РНКП по матрице ДНК (backtracking, *англ.* - обратное смещение) (Komissarova and Kashlev, 1997). При обратном смещении РНКП 3'-конец РНК выходит из активного центра фермента во вторичный канал, вследствие чего синтез РНК останавливается. В этом случае элонгация может быть продолжена после отщепления 3'-конца РНК-транскрипта в активном центре РНКП. Расщепление РНК стимулируется специализированными Gre-факторами, которые распознают смещенные назад транскрипционные комплексы (Vorukhov et al., 1993; Orlova et al., 1995). Ранее было показано, что факторы GreA и GreB *E. coli* подавляют формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы РНКП *E. coli in vitro* и *in vivo* (Marr and Roberts, 2000; Perdue and Roberts, 2010; Brodolin et al., 2004; Nickels et al., 2004). Эти данные позволяют предположить, что при формировании  $\sigma$ -зависимой паузы элонгационный комплекс переходит в смещенное назад состояние.

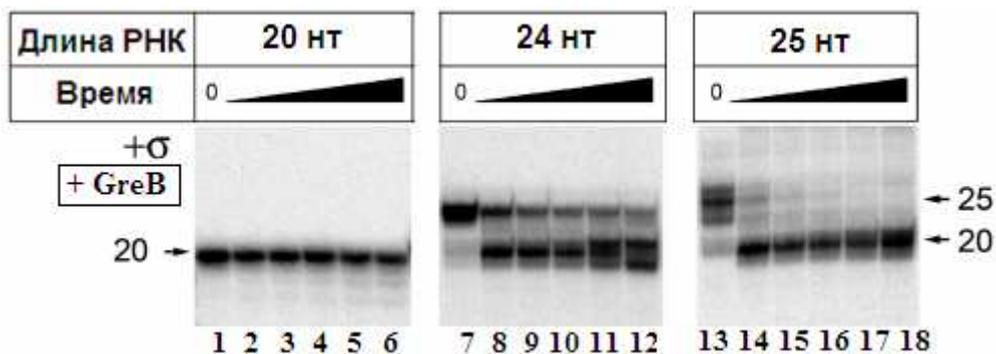
В наших экспериментах добавление в реакцию фактора GreB также приводило к подавлению паузы и стимулировало транскрипцию до конца матрицы (Рис. 2.3, дор. 4 - 6). Данный факт свидетельствует о том, что в используемой нами модели элонгационного комплекса формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы происходит по механизму обратного смещения РНКП. Далее мы провели анализ расщепления РНК в присутствии GreB в составе исходных элонгационных комплексов, содержащих РНК длиной 20 нт; промежуточных комплексов, остановленных на участке паузы и содержащих РНК длиной 24 нт; и комплексов в состоянии паузы, содержащих РНК длиной 25 нт (Рис. 2.4).

Исходные комплексы, содержащие РНК длиной 20 нт, в присутствии фактора GreB были устойчивы к расщеплению (Рис. 2.4, дор. 1 - 6). В комплексах, содержащих РНК длиной 25 нт и находившихся в состоянии паузы, эффективность расщепления РНК достигала практически 100 % и данная реакция завершалась менее, чем за 20 секунд (Рис. 2.4, дор. 13 - 18). В случае промежуточных комплексов, содержащих РНК длиной 24 нт, некоторая доля комплексов характеризовалась устойчивостью к действию фактора GreB: значительная часть РНК (до 40 %) в промежуточных комплексах оставалась нерасщепленной даже после 10 минут инкубации с GreB (Рис. 2.4, дор. 7 - 12).

Таким образом, комплексы, остановленные на участке паузы и содержащие РНК длиной 24 нт, видимо, находились в промежуточном состоянии, которое в процессе формирования  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы предшествует обратному смещению РНКП. Поскольку данные комплексы не обладали чувствительностью к действию Gre-факторов, можно заключить, что в этом случае 3'-конец РНК находился в активном центре фермента. Далее мы исследовали свойства промежуточных комплексов и их переход в состояние обратного смещения.



**Рис. 2.3.** Формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы в элонгационных комплексах, полученных с использованием олигонуклеотидной конструкции "Cons" в присутствии или в отсутствие транскрипционного фактора GreB при концентрации нуклеотидов 1 мМ. Продолжительность реакции расщепления РНК составляла 30", 2' и 10'.



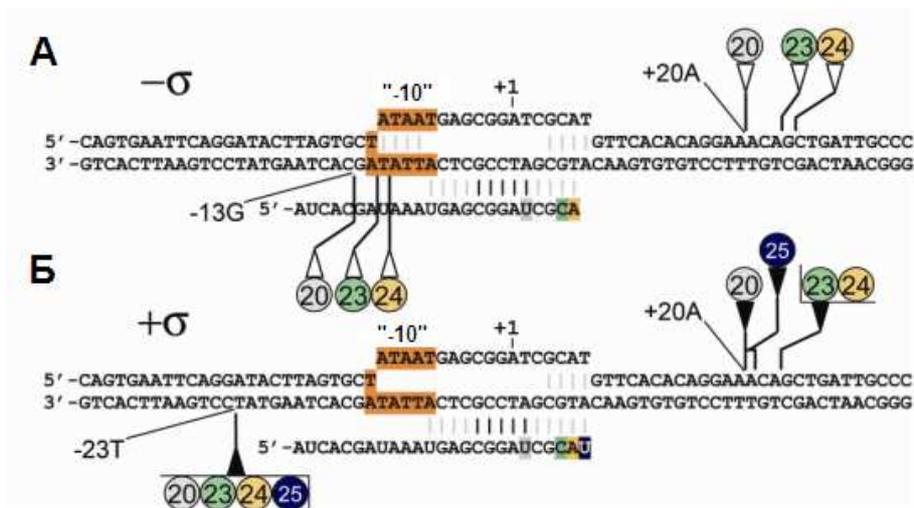
**Рис. 2.4.** Расщепление РНК в присутствии GreB в элонгационных комплексах, находящихся в разных состояниях и содержащих РНК разной длины: в исходном комплексе (20 нт), в комплексе в состоянии паузы (25 нт) и промежуточном комплексе (24 нт). Элонгационные комплексы были получены с использованием олигонуклеотидной конструкции "Cons" в присутствии  $\sigma^{70}$ -субъединицы. Комплексы, содержащие РНК длиной 24 и 25 нт были получены путем проведения реакций пошагового присоединения нуклеотидов. Продолжительность реакции расщепления: 0, 20", 40", 1', 3' и 10'.

Связывание  $\sigma^{70}$ -субъединицы с последовательностью -10-подобного элемента в процессе формирования паузы приводит к «заякориванию» элонгационного комплекса в задней части транскрипционного пузыря и препятствует движению РНКП вперед. Продолжение удлинения РНК должно приводить к формированию нестабильного напряженного комплекса, содержащего избыточную транскрибированную ДНК. Имеющиеся данные указывают на то, что формирование промежуточного напряженного комплекса сопровождается накоплением ДНК внутри РНКП («scrunching», *англ.* - сминание), которое происходит в результате прочтения ДНК спереди по ходу транскрипции без разрыва связи между  $\sigma^{70}$ -субъединицей в составе элонгационного комплекса и -10-подобным элементом ДНК сзади по ходу транскрипции (Perdue and Roberts, 2011; Marr and Roberts, 2000; Perdue and Roberts, 2010). Образование подобных напряженных комплексов было показано в процессе инициации транскрипции РНКП *E. coli*, в ходе которой также происходит удлинение РНК без разрыва контактов РНКП с -10 промоторным элементом (Kapranidis et al., 2006; Revyakin et al., 2006). Однако, до настоящего времени не было получено точных биохимических данных, доказывающих образование напряженных комплексов подобной структуры на этапе элонгации в ходе формирования паузы транскрипции.

Для того чтобы определить, как изменяются взаимодействия РНКП с ДНК в процессе формирования напряженных элонгационных комплексов, мы провели эксперименты с использованием метода футпринтинга экзонуклеазой III (ExoIII).

Фермент EhoIII постепенно расщепляет одну из двух цепей в составе дуплекса ДНК в направлении 3'→5', что позволяет с использованием меченых по 5'-концу нематричных и матричных ДНК-олигонуклеотидов определять границы комплексов спереди и сзади по ходу транскрипции, соответственно. При проведении данных экспериментов для более точного определения задней границы комплексов мы использовали конструкцию «up\_Cons», где ДНК-олигонуклеотиды сзади по ходу транскрипции были длиннее на 10 нт по сравнению с конструкцией «Cons» (Рис. 2.5). Мы определяли границы элонгационных комплексов, содержащих РНК разной длины и, следовательно, находящихся на разных этапах формирования  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы. В ходе элонгации транскрипции в комплексах в отсутствие  $\sigma^{70}$ -субъединицы удлинение РНК сопровождалось перемещением передней и задней границ в соответствии с количеством присоединенных нуклеотидов (Рис. 2.5, А). В комплексах, содержащих РНК длиной 23 и 24 нт, полученных в отсутствие  $\sigma^{70}$ -субъединицы, передняя граница была смещена на 3 - 4 нт в направлении по ходу транскрипции, что соответствовало постепенному перемещению РНКП в ходе удлинения РНК. При этом задние границы в данных комплексах также постепенно смещались к положению, соответствующему движению данных элонгационных комплексов вперед по ходу транскрипции.

В комплексах, содержащих РНК длиной 23 - 24 нт и полученных в присутствии  $\sigma^{70}$ -субъединицы, передняя граница также смещалась вперед по ходу транскрипции в соответствии с количеством присоединенных нуклеотидов к исходной РНК (Рис. 2.5, Б). Однако, в отличие от комплексов, полученных в отсутствие  $\sigma^{70}$ -субъединицы, расщепление матричного ДНК-олигонуклеотида EhoIII сзади по ходу транскрипции во всех элонгационных комплексах, содержащих  $\sigma^{70}$ -субъединицу и РНК разной длины (20, 23, 24 и 25 нт) было идентичным. Главная остановка EhoIII на матричной цепи ДНК в элонгационных комплексах, содержащих  $\sigma^{70}$ -субъединицу, по сравнению с комплексами, полученными в отсутствие  $\sigma^{70}$ -субъединицы, была сдвинута на 10 нт назад по ходу транскрипции, так как наличие



**Рис. 2.5.** Схема, обобщающая результаты EhoIII-футпринтинга элонгационных комплексов, содержащих РНК различной длины (20, 23, 24 и 25 нт) и полученных в отсутствие (А) и в присутствии (Б)  $\sigma^{70}$ -субъединицы. Комплементарные взаимодействия, которые претерпевают изменения в процессе транскрипции на участке паузы, показаны линиями серого цвета. Положения преимущественной остановки EhoIII в различных комплексах на матричной и нематричной ДНК показаны в нижней и верхней частях олигонуклеотидной конструкции «up\_Cons», соответственно.

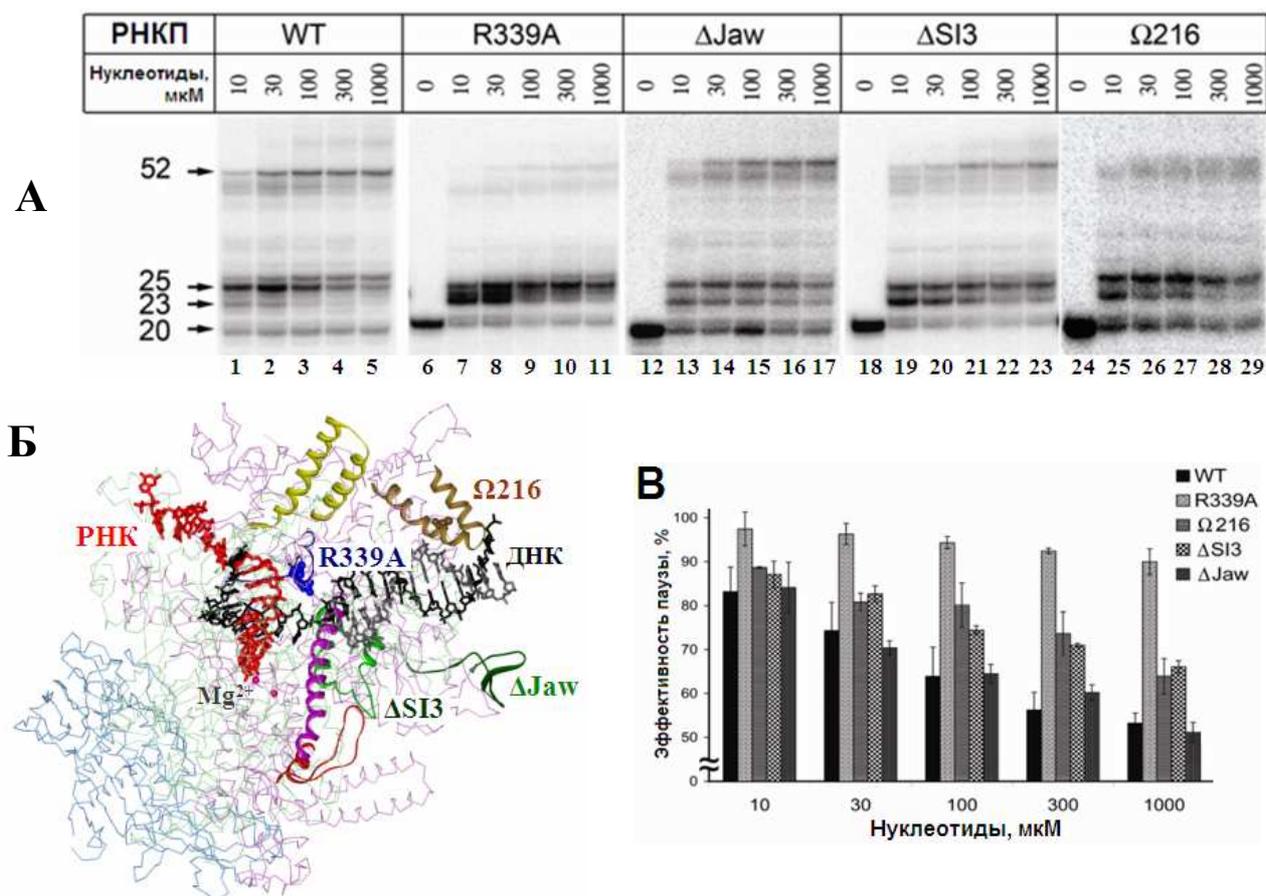
$\sigma^{70}$ -субъединицы в элонгационном комплексе усиливали взаимодействие РНКП с ДНК сзади по ходу транскрипции от -10-подобного элемента, что согласуется с литературными данными (Dove and Hochschild, 2004). Комплексы в состоянии паузы, содержащие РНК длиной 25 нт (в присутствии  $\sigma^{70}$ -субъединицы), находились в смещенной назад конформации, поскольку при определении передней границы комплексов главные остановки EhoIII на нематричной цепи ДНК были выявлены в положениях +20А и +21А спереди по ходу транскрипции.

Таким образом, было показано, что задняя граница элонгационных комплексов, сформированных в присутствии  $\sigma^{70}$ -субъединицы и содержащих РНК разной длины, не изменялась в ходе транскрипции на участке паузы (**Рис. 2.5**). Поскольку при этом передние границы части комплексов, содержащих РНК длиной 23 и 24 нт, содержащих  $\sigma^{70}$ -субъединицу, продвигаются вперед по ходу транскрипции при удлинении РНК, полученные данные напрямую свидетельствуют о формировании напряженных комплексов, в которых несколько избыточных ДНК-нуклеотидов находятся внутри РНКП. Напряжение в комплексах, содержащих РНК длиной 25 - 26 нт, видимо, становится критическим, после чего с высокой вероятностью происходит обратное смещение РНКП по ДНК и передняя граница данных комплексов принимает положение, соответствующее передней границе комплексов, содержащих РНК длиной 20 нт.

## 2.4 Влияние мутаций в кор-ферменте РНКП *E. coli* на формирование $\sigma$ -зависимой паузы

Мы предположили, что мутации в кор-ферменте, ослабляющие взаимодействие РНКП с ДНК в активном центре и спереди по ходу транскрипции, могут стимулировать формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы, снижая стабильность промежуточных элонгационных комплексов и повышая тем самым вероятность обратного смещения РНКП. Для того, чтобы проверить данное предположение, мы провели анализ мутаций в  $\beta'$ -субъединице кор-фермента РНКП *E. coli*, оказывающих влияние на взаимодействие кор-фермента с ДНК в активном центре и спереди по ходу транскрипции (Purov et al., 2010; Кульбачинский с соавт., 2002; Ederth et al., 2002; Artsimovitch et al., 2003).

Мы исследовали четыре мутации в кор-ферменте РНКП *E. coli* (**Рис. 2.6, Б**): 1) замена R339A в районе «switch2» («шарнирная петля 2», или «SW2»), который взаимодействует с матричной цепью ДНК в активном центре и соединяет домен «clamp» («зажим») с основной частью РНКП (РНКП R339A); 2) инсерция восьми аминокислот (His<sub>6</sub>GlnLeu) в положении 216 в участке «clamphead» («головка зажима»), который взаимодействует с дуплексом ДНК спереди по ходу транскрипции (РНКП  $\Omega$ 216); 3) делеция домена «jaw» («челюсть»), расположенного близко к дуплексу ДНК спереди по ходу транскрипции в структуре элонгационного комплекса *T. thermophilus* (Vassylyev et al., 2007a; Vassylyev et al., 2007b) (РНКП  $\Delta$ Jaw); 4) делеция домена «SI3», который находится в G-петле и по данным структурного моделирования располагается вблизи дуплекса ДНК спереди по ходу транскрипции (Chlenov et al., 2005; Opalka et al., 2010). Образование пауз данными РНКП исследовали при различных концентрациях нуклеотидов. Было показано, что эффективность образования пауз РНКП дикого типа заметно снижается при повышении концентрации нуклеотидов (**Рис. 2.6, А**, дорожки 1-5).



**Рис. 2.6.** Влияние мутаций R339A, ΔJaw, ΔSI3 и Ω216 в кор-ферменте *E. coli* на формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы транскрипции в элонгационных комплексах (конструкция “Cons”). **А** - Эффективность формирования паузы РНКП с различными мутациями при различных концентрациях нуклеотидов. **Б** - Расположение исследованных мутаций на структуре элонгационного комплекса *T. thermophilus*. Матричная и нематричная цепи ДНК показаны черным и серым цветом, соответственно, РНК показана красным цветом. Желтым цветом показан мотив “двойная спираль” β'-субъединицы, домен “SW2” (“шарнирная петля 2”) показан синим цветом, участок делеции домена “SI3” в G-петле указан стрелкой, домен “Jaw” (“челюсть”) показан темно-зеленым цветом. Показаны два иона  $Mg^{2+}$  в активном центре. **В** - Графическое представление полученных данных: показаны средние значения и значения стандартных отклонений по результатам 2 - 3 независимых экспериментов.

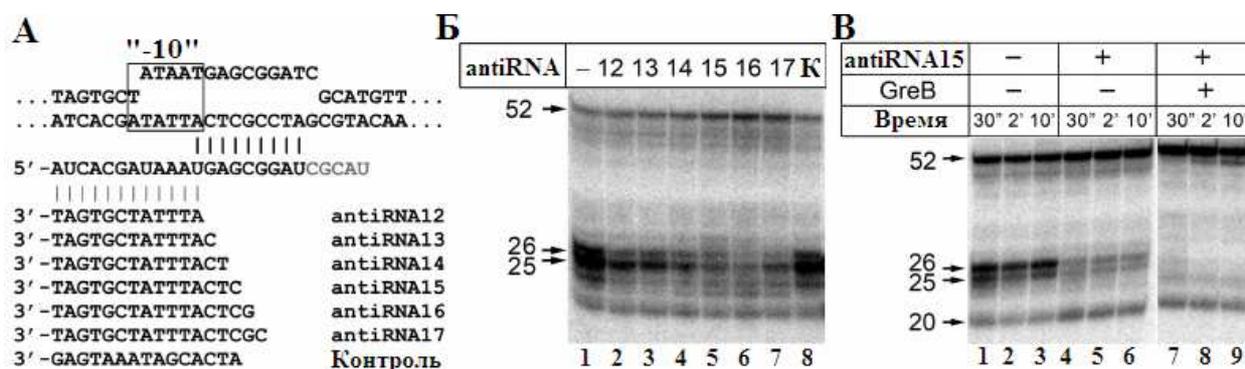
В отличие от РНКП дикого типа, РНКП R339A и, в меньшей степени, Ω216 и ΔSI3 при повышении концентрации нуклеотидов (до 1 мМ) сохраняли высокую эффективность формирования паузы (Рис. 2.6, А, дор. 11, 23 и 29). Эффективность формирования паузы РНКП с мутацией ΔJaw была сравнима с РНКП дикого типа (Рис. 2.6, А, дор. 12 - 17 и дор. 1 - 5, соответственно). Все исследуемые мутации также оказывали влияние на соотношение длины РНК-продуктов паузы. Даже при высоких концентрациях нуклеотидов ( $\geq 100$  мкМ) формирование пауз с участием мутантных РНКП наблюдали при достижении длины РНК 23 - 25 нт (Рис. 2.6, А, дор. 6 - 29), в то время как формирование паузы с участием кор-фермента РНКП *E. coli* дикого типа происходило при достижении длины РНК 25 - 26 нт (Рис. 2.6, А, дор. 1 - 5). Следовательно, промежуточное напряженное состояние в элонгационном комплексе у мутантных РНКП является менее устойчивым, и это, по всей видимости, облегчает переход данных РНКП в состояние паузы по механизму обратного смещения.

Полученные данные об эффективности формирования паузы и длине продуктов паузы свидетельствуют о том, что исследованные мутации кор-ферменте РНКП, стимулируют формирование паузы, вероятно, оказывая влияние на взаимодействие РНКП с ДНК.

## 2.5. Влияние антисмысловых олигонуклеотидов на формирование $\sigma$ -зависимой паузы

Известно, что ДНК-олигонуклеотиды, комплементарные свободному 5'-концу РНК-транскрипта, подавляют обратное смещение РНКП в ходе элонгации, видимо, путем создания механического препятствия для движения фермента (Komissarova and Kashlev, 1997). Мы показали, что ДНК-олигонуклеотиды длиной 12 - 17 нт, комплементарные 5'-концу РНК-транскрипта (Рис. 2.7, А), в разной степени снижают эффективность формирования  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы (Рис. 2.7, Б). Наиболее выраженное действие наблюдали при использовании олигонуклеотидов длиной 15 и 16 нт (antiRNA15 и antiRNA16) (Рис. 2.7, Б, дор. 5 и 6): видимо, длина 15 - 16 нт наилучшим образом соответствует длине одонитевой части РНК в напряженном комплексе (24 - 9 = 15, где 9 нт - длина РНК-ДНК гибрида и 24 нт - длина РНК в напряженном комплексе). При этом олигонуклеотид длиной 15 нт, не комплементарный 5'-концу РНК-транскрипта и использованный в качестве контроля, не оказывал никакого влияния на формирование паузы.

В присутствии олигонуклеотида antiRNA15 значительное снижение эффективности паузы наблюдали во всех исследуемых временных точках (30", 2' и 10') (Рис. 2.7, В, дорожки 4 - 6), причем оставшиеся комплексы были чувствительны к расщеплению РНК под действием фактора GreB, и, следовательно, находились в смещенном назад состоянии (Рис. 2.7, В, дорожки 7 - 9). Видимо, это свидетельствует о том, что изомеризация нестабильных напряженных комплексов в смещенное состояние происходит достаточно быстро и часть комплексов переходит в неактивное состояние до образования комплементарных взаимодействий РНК с антисмысловыми олигонуклеотидами, поэтому подавление  $\sigma$ -зависимой паузы оказывается неполным.



**Рис. 2.7.** Влияние коротких ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных 5'-концу транскрипта, на формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы. **А** - Олигонуклеотидная конструкция "Cons", антисмысловые ДНК-олигонуклеотиды различной длины и контрольный олигонуклеотид, использованные при проведении данного исследования. **Б** - Формирование  $\sigma$ -зависимой паузы транскрипции с участием РНКП *E. coli* дикого типа в присутствии антисмысловых олигонуклеотидов. **В** - Формирование паузы транскрипции в элонгационном комплексе "Cons" в присутствии или в отсутствие олигонуклеотида antiRNA15, а также в присутствии или в отсутствие GreB.

## 2.6. Сравнение $\sigma$ -зависимых пауз, формируемых РНКП *E. coli* и *T. aquaticus*

Поскольку РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* характеризуются множеством функциональных различий в процессе транскрипции, связанных с их различной температурной адаптацией (см. раздел 1), следующей задачей работы было проверить, может ли РНКП *T. aquaticus* участвовать в формировании  $\sigma$ -зависимых пауз, и если да, то изучить отличия данного процесса от РНКП *E. coli*. Было показано, что РНКП *T. aquaticus* в составе искусственного элонгационного комплекса «Cons» обладает высокой транскрипционной активностью (Рис 2.8, А, дор. 7 - 9), а при проведении реакции в присутствии  $\sigma^A$ -субъединицы может формировать  $\sigma$ -зависимую паузу с достаточно высокой эффективностью (Рис 2.8, А, дор. 10 - 12).

В отличие от РНКП *E. coli* (Рис. 2.8, Б, дор. 4 - 6), основное положение паузы в элонгационном комплексе, содержащем РНКП *T. aquaticus*, соответствовало длине РНК 23 нт. В то же время, в отличие от  $\sigma^{70}$ -субъединицы *E. coli*,  $\sigma^A$ -субъединица *T. aquaticus* не оказывала значительного влияния на элонгацию транскрипции РНКП *E. coli*. Эффективность формирования паузы РНКП *E. coli* в присутствии  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus* не превышала 10 % (в случае  $\sigma^{70}$ -субъединицы эффективность составляла приблизительно 70 %).

Интересно, что при этом основным продуктом паузы, как и в случае РНКП *E. coli* в комплексе с  $\sigma^{70}$ -субъединицей, являлась РНК длиной 25 нт (Рис. 2.8, А, дор. 13 - 15). Таким образом, различия в длине основного продукта паузы в случае РНКП *E. coli* и *T. aquaticus*, видимо, определяются особенностями структуры кор-ферментов РНКП данных РНКП, а эффективность формирования паузы – соответствием кор-фермента и  $\sigma$ -субъединицы. В дальнейшей работе мы использовали выявленные особенности для определения роли отдельных участков  $\sigma$ -субъединицы в процессе формирования  $\sigma$ -зависимой паузы.

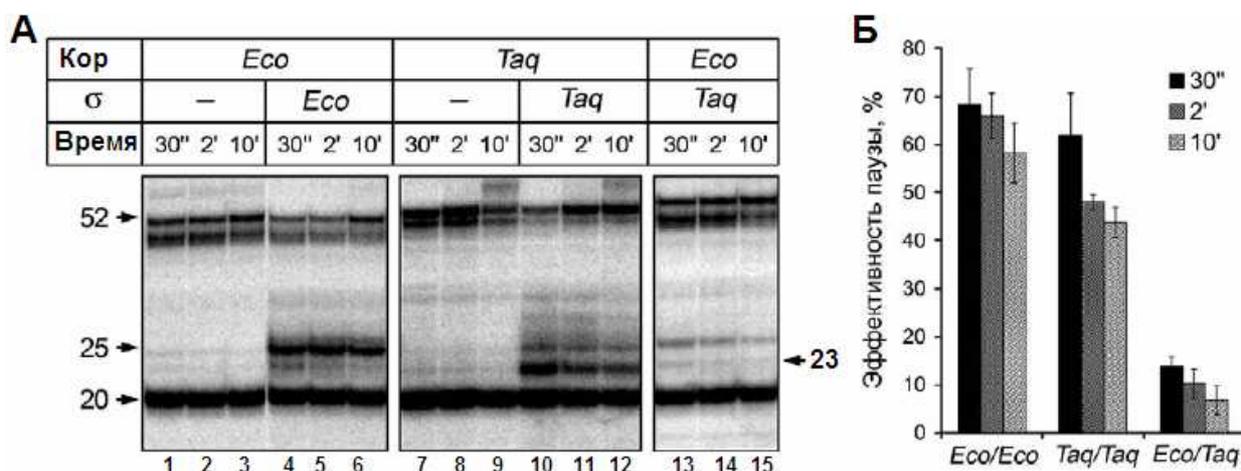
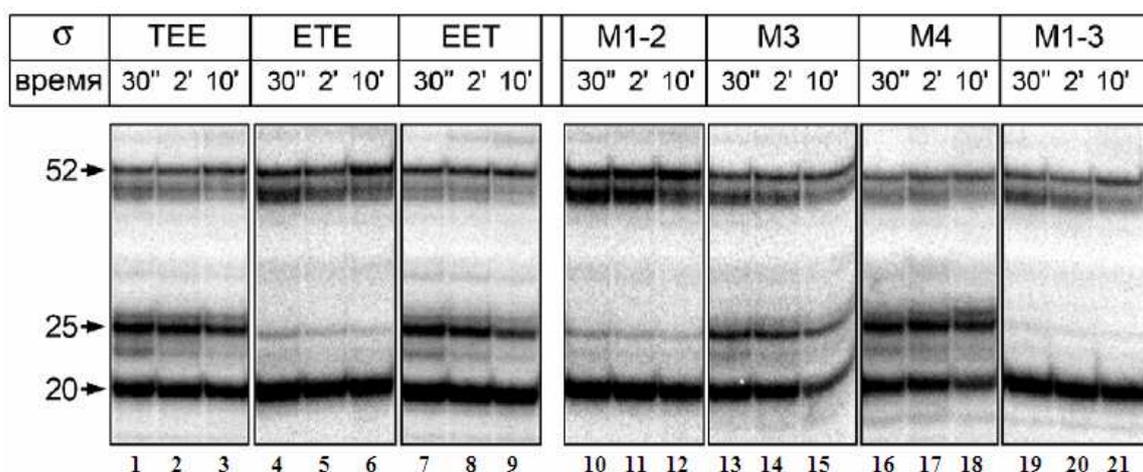


Рис. 2.8. А - Транскрипционная активность и формирование  $\sigma$ -зависимой паузы в элонгационном комплексе «Cons» с использованием РНКП *E. coli* (Eco), *T. aquaticus* (Taq) и гибридной РНКП, содержащей кор-фермент *E. coli* и  $\sigma^A$ -субъединицу *T. aquaticus*. Б - Графическое представление зависимости эффективности формирования паузы различными РНКП от времени. Все эксперименты проводили при 37 °С.

## 2.7. Роль районов $\sigma$ -субъединиц *E. coli* и *T. aquaticus* в формировании $\sigma$ -зависимой паузы

Для того, чтобы уточнить имеющиеся предположения о роли района 2  $\sigma$  в процессе формирования паузы, мы вновь использовали мозаичные  $\sigma$ -субъединицы, содержащие различные районы главных  $\sigma$ -субъединиц *E. coli* и *T. aquaticus* (см. раздел 1). Было показано, что замена района 1, а также замены районов 3 и 4 в  $\sigma^{70}$  *E. coli* на соответствующие районы  $\sigma^A$  *T. aquaticus* практически не влияют на формирование паузы РНКП *E. coli* ( $\sigma$ -субъединицы ТЕЕ и ЕЕТ, **Рис. 2.9**, дор. 1 - 3 и 7 - 9, соответственно), в то время как при замене района 2 эффективность формирования паузы снижается (ЕТЕ, **Рис. 2.9**, дор. 4 - 6) и достигает уровня, который наблюдали в случае гибридной РНКП, содержащей кор-фермент *E. coli* и  $\sigma^A$ -субъединицу *T. aquaticus* (**Рис. 2.8**, дор. 13 - 15). Таким образом, низкая эффективность формирования паузы транскрипции гибридной РНКП, состоящей из кор-фермента *E. coli* и  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus*, по-видимому, объясняется различиями в структуре района 2  $\sigma$ -субъединиц *E. coli* и *T. aquaticus*, который, как известно, содержит участки для взаимодействия с кор-ферментом и ДНК.

Для выявления наиболее важных аминокислотных замен, влияющих на формирование паузы, мы исследовали влияние замен различных подрайонов района 2  $\sigma^{70}$ -субъединицы РНКП *E. coli* на гомологичные участки *T. aquaticus* (см. раздел 1 и **Рис. 1.3**) на процесс формирования  $\sigma$ -зависимой паузы. Было показано, что значительное снижение эффективности формирования паузы, сравнимое с заменой всего района 2  $\sigma$ -субъединицы (ЕТЕ, **Рис. 2.9**, дор. 4 - 6), оказывали замены в подрайонах 2.1 и 2.2, что, вероятно, связано с влиянием данных аминокислотных остатков на взаимодействие  $\sigma$ -субъединицы с кор-ферментом в элонгационном комплексе (М1-2, **Рис. 2.9**, дор. 10 - 12).



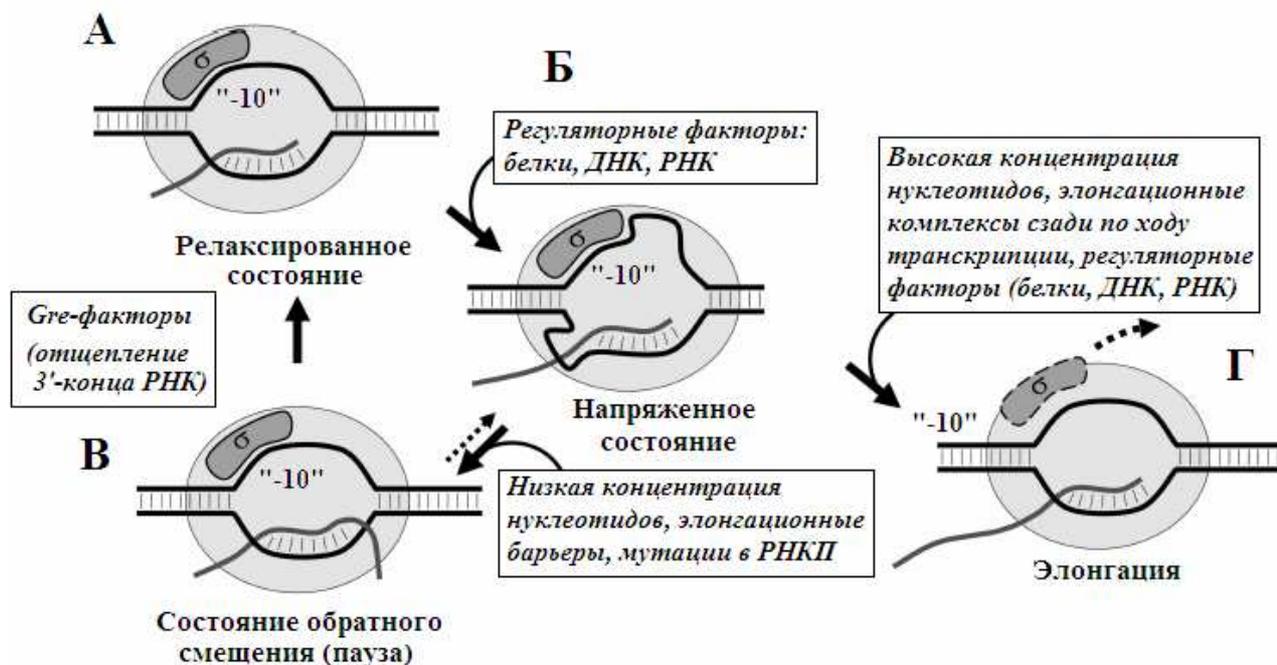
**Рис. 2.9.** Формирование  $\sigma$ -зависимой паузы транскрипции в элонгационных комплексах "Cons" РНК-полимеразами, содержащими кор-фермент *E. coli* и различные  $\sigma$ -субъединицы. Мозаичные  $\sigma$ -субъединицы ТЕЕ, ЕТЕ и ЕЕТ содержали замены районов 2, 1 и 3 - 4  $\sigma^{70}$  *E. coli* на гомологичные районы  $\sigma^A$  *T. aquaticus*, соответственно. Мозаичные  $\sigma$ -субъединицы М1-2, М3, М4 и М1-3 содержали различные замены подрайонов в районе 2  $\sigma^{70}$  *E. coli* на соответствующие участки района 2  $\sigma^A$  *T. aquaticus* (см. раздел 1 и Рис. 1.3).

Замены в подрайоне 2.3 снижали эффективность образования паузы приблизительно в 1,5 раза (М3, **Рис. 2.9**, дор. 13 - 15), а замена М4 практически не оказывала влияния на формирование паузы (**Рис. 2.9**, дор. 16 - 18). Наибольшее влияние на эффективность формирования паузы наблюдали в случае сочетания замен в подрайонах 2.1 - 2.2 и замены G424R в подрайоне 2.3 ( $\sigma$ -субъединица М1-3, **Рис. 2.9**, дор. 19 - 21). Дополнительное влияние замены G424R может быть связано с тем, что эта замена может ухудшать конформационную подвижность района 2  $\sigma$ -субъединицы, необходимую для формирования связи с кор-ферментом и ДНК. Стоит отметить, что ни одна из исследованных мутаций не изменяла положение паузы: во всех случаях остановка транскрипции в элонгационном комплексе происходила при достижении РНК длины 25 нт.

Таким образом, неспособность РНКП, состоящей из  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus* и кор-фермента *E. coli*, вызывать эффективное формирование  $\sigma$ -зависимой паузы в основном объясняется различием неконсервативных аминокислотных остатков в подрайонах 2.1 и 2.2 в районе 2  $\sigma^{70}$  и  $\sigma^A$ -субъединиц, влияющих на взаимодействие  $\sigma$ -субъединицы с кор-ферментом в элонгационном комплексе.

## 2.8. Общий механизм формирования $\sigma$ -зависимой паузы транскрипции

На **Рис. 2.10** представлена схема формирования  $\sigma$ -зависимой паузы, включающая результаты данной работы, а также ранее опубликованные данные (Perdue and Roberts, 2011).



**Рис. 2.10.** Механизм формирования  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы транскрипции, включающий переход из А - релаксированного состояния к Б - промежуточному напряженному комплексу, к В - комплексу в состоянии обратного смещения и Г - переход к элонгации. На рисунке отмечены различные факторы, оказывающие влияние на переход элонгационных комплексов из одного состояния в другое.

В процессе формирования паузы сначала  $\sigma$ -субъединица в составе элонгационного комплекса осуществляет узнавание -10-подобного элемента - сигнала паузы, далее следует удлинение РНК, приводящее к формированию напряженного комплекса, где избыточная ДНК находится внутри РНКП. РНКП в составе напряженного комплекса может преодолеть взаимодействие  $\sigma$ -субъединицы с -10-подобным элементом и продолжить элонгацию или сместиться назад по ДНК и перейти в состояние паузы, в котором 3'-конец РНК-транскрипта смещается из активного центра во вторичный канал.

Смещенные элонгационные комплексы могут быть возвращены к дальнейшей элонгации путем отщепления 3'-конца РНК в активном центре РНКП, которое значительно ускоряется в присутствии транскрипционных Gre-факторов. Если связь РНКП с  $\sigma$ -субъединицей сохраняется, то возможен повторный переход элонгационного комплекса в напряженное состояние.

В нашей работе мы получили прямые экспериментальные доказательства того, что в ходе образования  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы транскрипции происходит формирование напряженных элонгационных комплексов, в которых избыточная ДНК находится внутри РНКП. Было показано, что удлинение РНК на участке паузы сопровождается продвижением передней границы комплексов в направлении хода транскрипции при неподвижной задней границе данных комплексов. При этом значительная часть комплексов обладает устойчивостью к расщеплению РНК в присутствии GreB, следовательно, данные комплексы находятся в активном состоянии. При этом было показано, что удлинение РНК продолжается до достижения критической длины транскрипта 25 - 26 нт (при этом последний добавленный нуклеотид находится на расстоянии 13 - 14 нт от последовательности -10-подобного элемента), после чего все комплексы с высокой вероятностью переходят в смещенную назад конформацию. Как было показано в нашей работе, на взаимные превращения элонгационных комплексов во время паузы могут оказывать влияние различные факторы, в том числе, последовательность ДНК в участке паузы, концентрация нуклеотидных субстратов, регуляторные белки (Gre-факторы), мутации в РНКП, антисмысловые олигонуклеотиды и другие факторы (см. подробнее в тексте диссертации).

## ВЫВОДЫ

1. Замены неконсервативных аминокислотных остатков в районах 2.1, 2.2, 2.3 и 2.4  $\sigma$ -субъединицы определяют различия в температуре плавления промоторной ДНК РНКП *E. coli* и *T. aquaticus*, за счет изменения взаимодействий  $\sigma$ -субъединицы с кор-ферментом РНКП и ДНК.
2. В процессе формирования  $\sigma^{70}$ -зависимых пауз транскрипции с участием РНКП *E. coli* происходит образование напряженных элонгационных комплексов, в которых внутри РНКП находится избыточная ДНК, с последующей изомеризацией данных комплексов в неактивное смещенное назад состояние.
3. Мутации в участках кор-фермента РНКП *E. coli*, контактирующих с ДНК, находящейся спереди по ходу транскрипции и вблизи активного центра, стимулируют формирование  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы.
4. Факторы, подавляющие формирование смещенных назад элонгационных комплексов (высокие концентрации нуклеотидов, антисмысловые олигонуклеотиды), снижают эффективность формирования  $\sigma^{70}$ -зависимой паузы.
5.  $\sigma^A$ -субъединица *T. aquaticus* вызывает формирование  $\sigma$ -зависимой паузы РНКП *T. aquaticus*, но, в отличие от  $\sigma^{70}$ -субъединицы *E. coli*, не оказывает влияния на элонгацию транскрипции РНКП *E. coli*. Данные различия определяются различиями неконсервативных аминокислотных остатков в районах 2.1 и 2.2  $\sigma^{70}$ -субъединицы *E. coli* и  $\sigma^A$ -субъединицы *T. aquaticus*.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

### Статьи:

1. Barinova N., Zhilina E., Bass I., Nikiforov V., Kulbachinskiy A. Lineage-specific amino acid substitutions in region 2 of the RNA polymerase sigma subunit affect the temperature of promoter opening // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 3088 - 3092.
2. Жилина Е., Миропольская Н., Басс И., Бродолин К., Кульбачинский А. Особенности формирования  $\sigma$ -зависимых пауз транскрипции РНК-полимеразами *Escherichia coli* и *Thermus aquaticus* // Биохимия. 2011. Т. 76. № 10. с. 1348 - 1358.
3. Zhilina E., Esyunina D., Brodolin K., Kulbachinskiy A. Structural transitions in the transcription elongation complexes of bacterial RNA polymerase during  $\sigma$ -dependent pausing // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. 3078 - 3091.

### Материалы всероссийских конференций:

1. Жилина Е.В., Бродолин К.Л., Кульбачинский А.В. Роль сигма-субъединицы в формировании пауз транскрипции РНК-полимеразами *E coli* и *T. aquaticus* // Биология - наука XXI века: 14-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино. 2010. С. 137.
2. Жилина Е.В., Кульбачинский А.В. Исследование функций сигма-субъединицы бактериальной РНК-полимеразы при формировании пауз транскрипции // IV Международная Школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология клетки». Москва – Звенигород. 2010. С. 82.
3. Жилина Е.В., Бродолин К.Л., Кульбачинский А.В. Механизм образования паузы транскрипции с участием сигма-субъединицы бактериальной РНК-полимеразы // XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва. 2011. С. 15.
4. Жилина Е.В., Есюнина Д.М., Кульбачинский А.В. Образование напряженных элонгационных комплексов при формировании сигма-зависимых пауз в ходе транскрипции РНК-полимеразой *Escherichia coli* // Биология - наука XXI века: 16-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых Пущино. 2012. С. 106.