

На правах рукописи

ЧЛЕНОВ Марк Михайлович

**Изучение взаимодействия РНК-полимеразы с нуклеиновыми кислотами на
разных стадиях транскрипционного цикла**

(03.01.03 – молекулярная биология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук.

Москва – 2010

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Отдела молекулярной генетики клетки Учреждения Российской академии наук Института молекулярной генетики РАН, а также в лабораториях Института Ваксмана (Пискатавей, США), Научно-исследовательского Института здравоохранения (Нью Йорк, США) и Рокфеллеровском университете (Нью-Йорк, США)

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Северинов Константин Викторович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Мионов Александр Сергеевич

доктор химических наук
Сергиев Петр Владимирович

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук
Институт Молекулярной Биологии
им. В.А.Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится 16 декабря 2010 года в 11 часов 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждении Российской академии наук Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан « 12 » ноября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
канд. фарм. наук

Л.С. Грабовская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. В прокариотической клетке транскрипция генов осуществляется большим мультисубъединичным ферментом ДНК-зависимой РНК полимеразой (РНКП), имеющим массу около полумиллиона дальтон. Выделяют две основные формы этого фермента: каталитически активный кор-фермент, образованный четырьмя субъединицами ($\alpha\beta\beta'$) и осуществляющий синтез РНК-продукта, и полноразмерный холофермент, состоящий из кор-фермента и ассоциированного с ним σ -фактора, необходимого для узнавания промоторной последовательности транскрибируемого гена. Процесс клеточной транскрипции условно можно разделить на несколько основных этапов: (i) узнавание промоторной последовательности ДНК холоферментом РНКП и образование инициаторного комплекса с ним, (ii) диссоциация сигма фактора и продуктивный синтез м-РНК кор-ферментом РНКП и (iii) терминация, сопровождающаяся высвобождением синтезированного РНК-продукта и диссоциацией транскрипционного комплекса.

На каждом из этих этапов РНКП образует многочисленные контакты как с одно-, так и с двуцепочечными последовательностями нуклеиновых кислот. Хотя в последние годы, благодаря успешной кристаллизации как самого кор-фермента РНКП, так и его комплексов с ДНК фрагментами, удалось достичь определенных успехов в понимании устройства элонгационного комплекса, структура и механизм образования инициаторных комплексов по-прежнему остаются малоизученными. Альтернативным подходом к получению информации о строении ДНК-белковых комплексов является метод ковалентных химических сшивок и картирование районов взаимодействий, а так же точечный мутагенез. Большинство современных моделей, описывающих вероятное устройство элонгационного комплекса, используют в качестве своей основы структуры термофильных ферментов, в то время как наиболее изученным с биохимической точки зрения, является фермент из *E.coli*. Роль определенных доменов РНКП *E.coli* во взаимодействии с одно- и двунитевыми фрагментами нуклеиновых кислот, и отсутствующих в термофильных РНКП, была неоднократно описана в литературе. Получение структурной информации об этих участках позволило бы получить более полную картину устройства элонгационного комплекса.

Цель работы и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение взаимодействий РНКП с нуклеиновыми кислотами на стадиях промоторного и элонгационных комплексов. Для этого ставились следующие задачи:

- 1) Откартировать участки холофермента РНКП, вовлеченные во взаимодействие с промоторным фрагментом на стадии открытого комплекса.

- 2) Охарактеризовать свойства РНКП *E.coli* с летальной мутацией в β -субъединице, оказывающей значительное воздействие на формирование промоторного комплекса.
- 3) Получить структуру большого неконсервативного домена β' -субъединицы РНКП *E.coli*, вовлеченного во взаимодействие с передним дуплексом ДНК в элонгационном комплексе.

Научная новизна и практическая ценность работы: С помощью серии олигонуклеотидов, имитирующих последовательность матричной и нематричной цепей *lac*-промотора с введенными в них сшивающими группами, впервые удалось достаточно точно откартировать участки холофермента РНКП, вовлеченные в формирование промоторного комплекса. Нами было показано, что холофермент способен специфично узнавать и связываться только с последовательностью нематричной цепи промотора, в то время как взаимодействие с матричной цепью имеет неспецифичный характер и неустойчиво к высокой концентрации соли. Взаимодействие кор-фермента как с матричной, так и нематричной цепями промотора так же неустойчиво к высокой концентрации соли и не сиквенс-специфично. Результаты картирования ДНК-белковых комплексов указывают на то, что основной процент химических сшивок в промоторном комплексе происходит между вторым и третьим консервативными районами σ -фактора и нематричной цепью промотора на всем ее протяжении от -14 до -3 позиции относительно точки начала транскрипции. Минорные сшивки двумя крупнейшими субъединицами кора и нематричной цепью промотора были также откартированы в данной работе.

Детальное изучение *in-vitro* свойств РНКП с летальной мутацией ΔRV в β -субъединице позволило выявить новый промоторный комплекс, сочетающий в себе нестабильность «закрытого комплекса» с расплетенностью цепей промотора, характерной для «открытого комплекса». Являясь чувствительным к конкуренту ДНК – гепарину и даже низкой концентрации соли, промоторный комплекс, образуемый мутантной РНКП обладает способностью расплавлять цепи промотора даже при нулевой температуре, когда комплекс дикого типа полностью закрыт. Таким образом, мутация в этом районе РНКП разобщает два взаимосвязанных свойства промоторных комплексов дикого типа - устойчивость к гепарину и чувствительность к низкой температуре. Мы полагаем, что эта мутация позволяет «запереть» процесс узнавания промотора в одном из промежуточных промоторных комплексов, формируемым РНКП в процессе перехода от закрытого комплекса к открытому. На основании этих результатов нами была предложена модель взаимодействия этого участка β -субъединицы с ДНК в промоторном комплексе.

Впервые удалось закристаллизовать и определить трехмерную структуру фрагмента β' -субъединицы РНК-полимеразы *E.coli* с большим разрешением (2.2

Å). Было установлено, что 188-членный неконсервативный домен (НКД) β' -субъединицы состоит из бета-складок и включает в себя два отдельных субдомена (А и В), соединенных линкером. Каждый из этих субдоменов представляет описанный ранее мотив, обозначаемый как гибридный сэндвич-барел (ГСБ) и состоящий из серии антипаралельных бета-слоев. Анализ распределения поверхностного заряда НКД β' -субъединицы выявил существенную асимметрию зарядов на поверхности этого фрагмента. Наложение полученной структуры на модель элонгационного комплекса *Taq* позволило объяснить ранее описанные в литературе экспериментальные данные, касающиеся роли данного участка РНК-полимеразы в процессе клеточной транскрипции. Построенная нами обновленная модель элонгационного комплекса РНК-полимеразы *E.coli*, содержащая в себе структуру НКД β' -субъединицы, дает возможность объяснить роль данного участка в стабилизации транскрипционного комплекса, его паузировании и в процессе терминации, а также каталитической активности фермента.

Структура и объем работы. Данная диссертация изложена на 106 страницах текста, включающего в себя литературный обзор, методологическую секцию, результаты и обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 101 англоязычных и 3 русскоязычных публикаций. Работа содержит 17 рисунков и 2 таблицы.

Список сокращений:

РНКП – ДНК-зависимая РНК- полимераза

УФ – Ультрафиолет

ПААГ – Полиакриламидный гель

НТСВА - 2-нитро 5-тио-цианобензойная кислота

НКД – Неконсервативный домен

ГСБ – Гибридный сэндвич бэррел

Содержание работы

Глава 1. Изучение ДНК-белковых взаимодействий в промоторном комплексе с помощью олигонуклеотидов с фотохимическими сшивающими группами.

Для узнавания промоторного фрагмента ДНК и формирования с ним промоторного комплекса, РНКП должна находиться в форме холофермента, состоящего из каталитически активного кора и σ -субъединицы. Последняя играет в этом процессе ключевую роль, на что указывают следующие наблюдения: (1) наличие мутаций в σ -субъединице, приводящих к потере способности РНКП связываться с промотором и плавить двуцепочечную ДНК, (2) химические сшивки из промоторных фрагментов, приходящиеся преимущественно на σ -субъединицу и (3) неспособность кор-фермента специфически связываться с промоторным участком. При этом, не ассоциированная с кором σ -субъединица, сама по себе не способна взаимодействовать с промотором, ввиду автоингибиторного свойства ее консервативного домена 1 (Dombroski et al., 1993). Связывание с кор-ферментом приводит к разблокировке σ -субъединицы, высвобождая ее ДНК-связывающие участки для узнавания промоторных последовательностей. Несмотря на основную роль, которую σ -субъединица играет в узнавании и связывании промоторного фрагмента, большие субъединицы кора также участвуют в этом процессе. На это указывает серия мутаций в β и β' - субъединицах (в том числе и исследованных в данной работе) приводящих к дестабилизации промоторного комплекса (Martin et al., 1992, Bartlett et al., 1998).

Для изучения взаимодействия РНКП с расплетенными цепями промотора в открытом комплексе, мы использовали одноцепочечные олигонуклеотиды, имитирующие матричную и нематричную цепи *LacUV5* промотора, в последовательности которых были введены фото-активируемые сшивающие реагенты. Для картирования полученных ДНК-белковых сшивок, мы использовали метод ограниченного химического расщепления белковой молекулы, разработанный в лаборатории Грачева и позволяющий устанавливать места контактов с высокой точностью (Grachev al., 1989). Шесть азидо-фенацильных групп были синтезированы и введены в положения - 14, -13, -12, -9, -5, -3 олигонуклеотида, содержащего последовательность нематричной цепи, и три - 12, -9, -3 - в матричной. Кроме этого, мы синтезировали гибридный олигонуклеотид нематричной цепи с фотохимической группой в позиции -12, в котором адениновые остатки его консервативного участка были заменены на остатки гуанина.

Общее распределение фотохимических сшивок из матричного и нематричного олигонуклеотидов в субъединицы РНКП

Картирование ДНК-белковых контактов между радиомеченными олигонуклеотидами, содержащими фотохимические группы, и РНКП проводили согласно процедуре, описанной ранее (Nudler et al., 1997, Mustev et al., 1998). После облучения УФ, сшитые ДНК-белковые комплексы разделяли на денатурирующем ПААГ и визуализировали на приборе PhosphorImager.

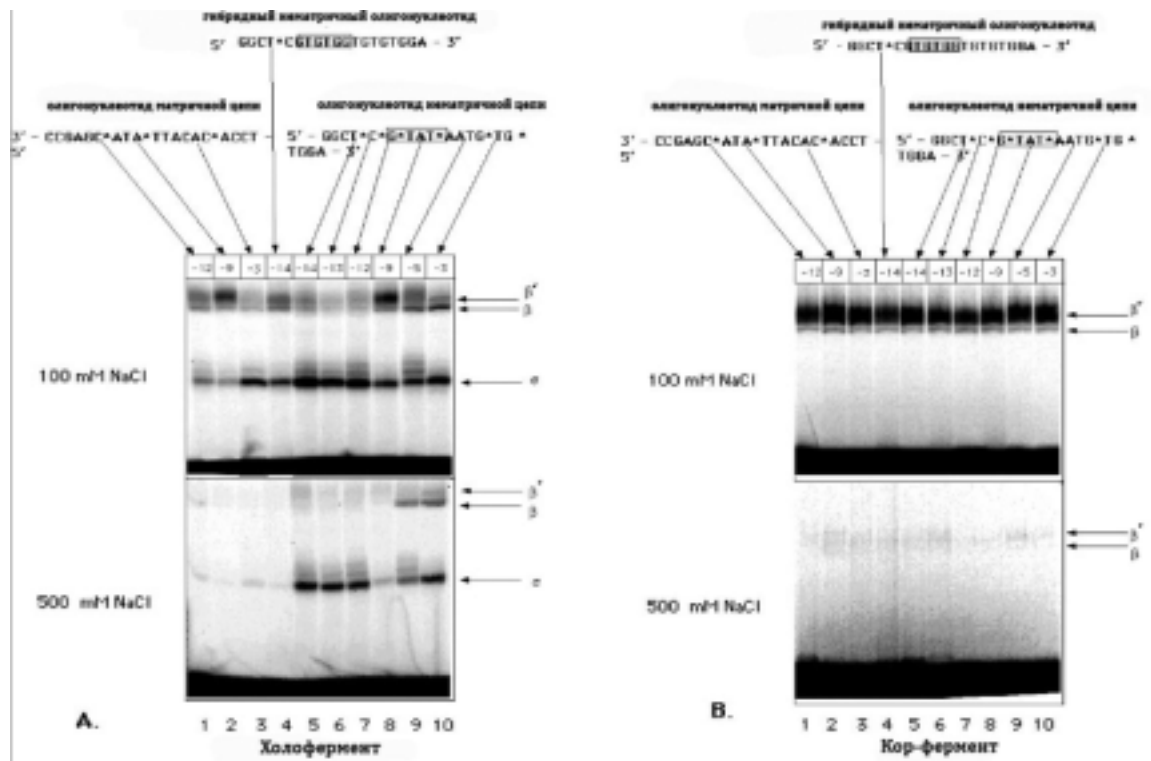


Рис 1. ДНК-белковые взаимодействия РНКП с матричными и нематричными олигонуклеотидами. Рентгенограммы денатурирующих ПААГ гелей, содержащие ДНК-белковые сшивки между субъединицами (А) холофермента и (В) кор-фермента и матричными, нематричными и гибридными олигонуклеотидами *LacUV5* промотора в присутствии 100 и 500 мМ NaCl. Консервативный промоторный ТАТА-мотив в районе -10 положения относительно начала транскрипции выделен прямоугольником на фоне последовательности нематричного нуклеотида. Звездочками обозначены положения фотохимических групп.

Как видно из Рис 1, холофермент и кор-фермент РНКП взаимодействуют и образуют фотохимические сшивки с одноцепочечными олигонуклеотидами *LacUV5* промотора на всем протяжении от -14 до -3 положения относительно начала транскрипции, образуя как мажорные, так и минорные ДНК-сшивки со своими субъединицами, и особенно с σ -субъединицей. Контакты, образуемые кор-ферментом с обеими цепями промотора в присутствии 100 мМ NaCl, не

отличаются друг от друга в зависимости от положения фотохимической метки в пришиваемом олигонуклеотиде (Панель В, верхняя рентгенограмма). При повышении концентрации соли в реакционном буфере до 500 мМ, кор-фермент теряет способность взаимодействовать с односторонними промоторными олигонуклеотидами (Панель В, нижняя рентгенограмма). Взаимодействие холофермента РНКП с теми же олигонуклеотидами, в отличие от кор-фермента, напротив, имеет ярко выраженный сиквенс-специфичный характер (Рис 1, панель А). В реакциях, проведенных в буфере с 100 мМ NaCl, четко прослеживается разница в интенсивности и распределении фотохимических сшивок в субъединицы холофермента РНКП, в зависимости от позиции сшивающего реагента на изучаемом олигонуклеотиде (Панель А, нижняя рентгенограмма, дорожки 5-10). При проведении тех же реакций между холоферментом и олигонуклеотидами в условиях 500 мМ NaCl, картина пришивок претерпевала существенные изменения (Панель А, нижняя рентгенограмма). Контакты холофермента РНКП с матричным олигонуклеотидом *LacUV5* промотора полностью пропадают в условиях данного эксперимента, независимо от позиции фотохимической группы (Рис 1, нижняя рентгенограмма, дорожки 1, 2 и 3). Взаимодействия холофермента с нематричными олигонуклеотидами не только оставались устойчивыми к высокой концентрации соли, но и сохраняли в целом картину распределения сшивок в субъединице РНКП, наблюдаемую в буфере, содержащем 100 мМ NaCl (нижняя рентгенограмма, дорожки 5-10). При этом, сшивки из позиций -14, -13 и -12, приходятся преимущественно в σ -субъединицу, а из позиций -5 и -3 также и в две большие субъединицы кор-фермента. Сшивка из нематричного олигонуклеотида с фотохимической группой размещенной в -12 положении (внутри ТАТА-мотива, являющегося основной детерминантой узнавания промоторной последовательности), не обладает устойчивостью к высокой концентрации соли, что, вероятно, вызвано нарушением узнавания связывающей детерминанты промотора, из-за введения в ее состав азидофенацильной группы. Гибридный нематричный олигонуклеотид с измененной последовательностью своего ТАТА-мотива также теряет способность взаимодействовать с холоферментом в 500 мМ NaCl (нижняя рентгенограмма, дорожка 4).

Инкубирование олигонуклеотидов обеих цепей промотора со свободной σ -субъединицей не приводило к появлению фотохимических сшивок, как в низкой, так и в высокой концентрации соли (данные не приводятся), что хорошо согласуется с ранее описанными в литературе экспериментами (Dombroski et al., 1993)

В качестве дополнительного эксперимента, мы также изучили взаимодействия кор-фермента *Taq* РНКП, ассоциированного с σ^{70} *E.coli*, с олигонуклеотидами *LacUV5* промотора, содержащими фотоактивные группы в тех же положениях, что и в экспериментах с ферментом из *E.coli*. Полученные нами данные совпадают с распределением фотохимических сшивок в субъединицы

холофермента из *E.coli* (результаты не приводятся), что позволяет преположить универсальность природы данного взаимодействия.

Следующим шагом в изучении взаимодействий субъединиц полимеразы с нематричной цепью промотора было картирование ДНК-белковых контактов с помощью ограниченного химического расщепления белковых молекул.

Картирование контактов субъединиц РНКП с олигонуклеотидами нематричной цепи *LacUV5* промотора.

Для картирования фотохимических сшивок, субъединицы РНКП провзаимодействовавшие с радиоактивно-мечеными олигонуклеотидами вырезали из первичного денатурирующего полиакриламидного геля (ПААГ), лиофилизировали и обрабатывали CNBr, расщепляющего полипептидную цепь по метиониновым, и NTCBA – по цистеиновым остаткам. Продукты расщепления разделяли на градиентном денатурирующем ПААГ высокого разрешения. При подборе условий, когда на одну молекулу белка приходится один или менее актов расщепления, в полученном наборе пептидов, размер наименьшего фрагмента соответствует ближайшему от N или C-конца аминокислотному остатку, около которого произошла фотохимическая сшивка.

Пришивки в σ -субъединицу

Результаты картирования 5 мажорных полос, соответствующих пришивкам σ -субъединицы и нематричного олигонуклеотида из позиций -14, -13, -12, -5 и -3 относительно транскрипционного старта, позволили определить 2 участка этой субъединицы, участвующих во взаимодействии с однопонтевой промоторной ДНК. Сшивки из положений -14, -13 и -12 были откартированы нами с помощью CNBr, в район между метионинами 413 и 456. Как видно из рентгенограммы продуктов расщепления этой ДНК-белковой сшивки на Панеле В, последняя радиомеченная полоска на дорожке 2 и 3 соответствует остатку метионина 413. Следующий по счету метиониновый остаток первичной последовательности σ -субъединицы - это метионин 456, которого не видно на данном геле. Из результатов этого расщепления мы заключили, что сшивка из -13, а также -14 и -12 (результаты не приводятся) приходится в 43-аминокислотный район между вышеупомянутыми метиониновыми остатками.

Картирование мажорных полос сшивок в σ -субъединицу из положений фотоактивных групп, помещенных в -5 и -3 положение относительно начала транскрипции, позволило нам определить расположение ДНК-белковых контактов в район, располагающийся между метиониновыми остатками 379 и 413 (Рис.2 Панель В).

Кроме мажорной сшивки в σ -субъединицу из положения -13, на рентгенограмме ПААГ можно видеть дополнительные минорные полосы, соответствующие сшивкам в ту же субъединицу, но обладающие меньшей силой сигнала (Рис. 2, Панель Г). Из-за присутствия в первичной структуре σ -субъединицы двух находящихся вплотную друг к другу остатков триптофана, придающих абнормальную мобильность продуктам расщепления, нам не удалось провести точную идентификацию фрагментов расщепления минорной сшивки. Однако, наличие коротких продуктов, содержащих радиоактивную метку, указывает на то, что минорная сшивка приходится на N или C-концевой район σ -субъединицы. Так как четвертый консервативный район, прилегающий к C-концу этой субъединицы участвует в узнавании и связывании с -35 консервативным элементом промотора (Gross et al., 1992), мы полагаем, что минорная сшивка из -13 положения относительно точки начала транскрипции приходится на N-концевой район σ -субъединицы.

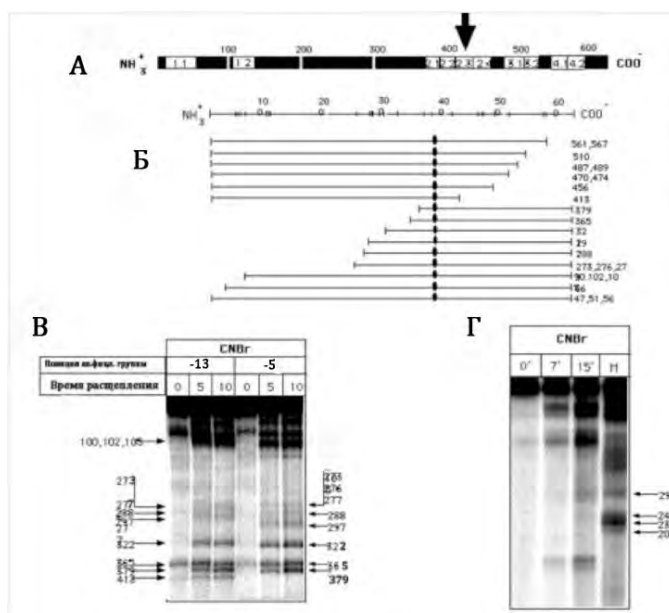


Рис.2 Картирование контактов σ -субъединицы с нематричной цепью *LacUV5* промотора. Первичная структура σ -субъединицы изображена в виде черного прямоугольника с консервативными районами, выделенными белым цветом. Откартированный участок фотохимической сшивки отмечен вертикальной стрелкой (панель А). Теоретический набор продуктов расщепления σ -субъединицы со сшивкой из -13 положения по остаткам метионина показан на панели Б. Рентгенограмма денатурирующего ПААГ с продуктами расщепления мажорных ДНК-белковых

сшивок из позиций -13 и -14 с помощью CNBr приведена на панели В. Картирование минорной сшивки σ -субъединицы из позиции -13 нематричного нуклеотида *LacUV5* изображена на панели Г. В качестве маркера молекулярной массы использовался набор определенных фрагментов расщепления мажорной сшивки σ -субъединицы из -13 положения относительно начала точки начала транскрипции.

Пришивки в β -субъединицу

Солеустойчивые сшивки между β -субъединицей РНКП и фотохимическими группами, введенными в -5 и -3 положение нематричной цепи *LacUV5* промотора, были картированы внутри только одного района β -субъединицы.

Как видно из результатов на Рис.3, Панель Г, ДНК–белковая фотохимическая сшивка из -3 (а также из -5 положения; результаты не приводятся) приходится на самый N–конец β -субъединицы. Первый метиониновый остаток этой субъединицы имеет порядковый номер 124. Размер самой легкой полосы на ПААГ (Панель Г, правая рентгенограмма, дорожка 3) соответствует пептиду N–Мет124. Из этого следует, что контакт с ДНК из -3 положения происходит в пределах этого района.

Расщепление ДНК-белковых сшивок из -3 и -5 положения по остаткам цистеина при помощи NTCBA также выявило картину полос, характерную для N–конца β -субъединицы (Рис.3, Панель Г, левая рентгенограмма). Первый цистеиновый остаток этой субъединицы находится в ее первичной структуре на расстоянии 87 аминокислотных остатка от N–конца. Размер самой легкой из полос, полученных в результате расщепления ДНК-белковой сшивки по остаткам цистеина, соответствует пептиду N–Цис87. Таким образом, при помощи NTCBA, удалось более точно очертить границы района β -субъединицы, контактирующего с -3 и -5 положением нематричной цепи *LacUV5* промотора.

Для подтверждения наблюдаемых результатов, мы провели исчерпывающую реакцию расщепления полученной сшивки с помощью CNBr в течение 12 часов. Как видно из результатов на Рис. 3, Панель Д, практически весь радиоактивный сигнал накапливается в полосе, соответствующей пептиду N–Мет124 (Панель Д, дорожка 2), что подтверждает вышеописанные результаты о расположении фотохимической сшивки из -3 и -5 положений нематричной цепи в этот участок β -субъединицы РНКП *E.coli*.

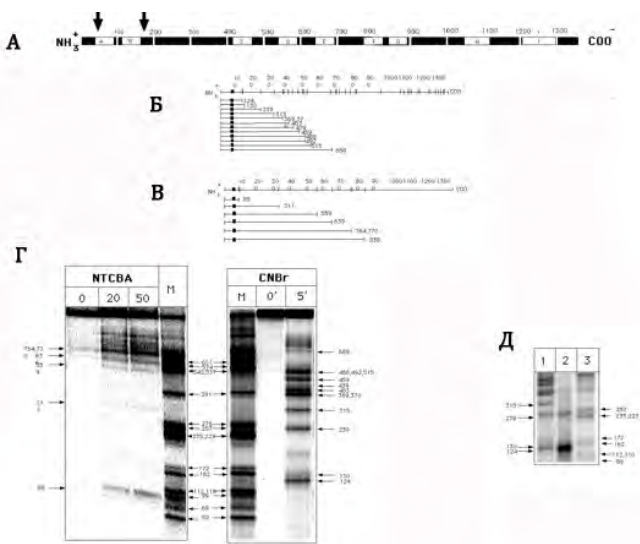


Рис.3 Картирование контактов β -субъединицы с нематричной цепью *LacUV5* промотора. Первичная структура 1342-аминокислотной β -субъединицы изображена в виде черного прямоугольника. Консервативные районы выделены белым цветом и обозначены латинскими буквами. Определенные в этой работе места ДНК-белковых сшивок в β -субъединице показаны черными вертикальными стрелками. Теоретический набор продуктов расщепления β -субъединицы с сшивкой из -3 положения по остаткам метионина показан на панели Б, а по остаткам цистеина - на панели В. Рентгенограмма денатурирующего ПААГ

с продуктами расщепления ДНК-белковых сшивок из позиции -3 с помощью CNBr и NTCBA

приведена на панели Г. В качестве маркера молекулярной массы использовали описанный ранее набор продуктов расщепления ДНК-белковой сшивки β -субъединицы, приходящейся в район 1273. Продукты полного расщепления ДНК-белковой сшивки из -3 положения с помощью CNBr показаны на Панеле Д (дорожка 2). В качестве маркеров использовали набор ограниченного расщепления по метионинам ДНК-белковой сшивки, находящейся на N-конце (Панель Д, дорожка 1) и С-конце (Панель Д, дорожка 3) β -субъединицы.

Анализ распределения фотохимических пришивок в субъединицы холофермента РНКП.

Полученные нами результаты аналитических сшивок между матричной и нематричными цепями промотора и РНКП *E.coli* указывают на то, что контакты кор-фермента с обеими цепями промотора, а также холофермента с матричной цепью, имеют неспецифический характер. Природа взаимодействий холофермента РНКП с нематричной цепью не только обладает устойчивостью к высокой соли, что указывает на специфичность данных контактов, но и обладает ярковыраженным регистром. Свободная σ -субъединица, не связанная с кор-ферментом, не способна связываться с промоторными цепями.

В проделанной работе мы откартировали несколько участков контактов субъединиц РНКП с нематричной цепью *LacUV5* промотора. σ -субъединица образует специфические контакты с нематричной цепью промотора на всем протяжении от -14 до -3 положения относительно начала транскрипции. Участки σ -субъединицы, вовлеченные в эти взаимодействия, были определены нами как Met379-Met413 и Met413-456. Оба этих фрагмента первичной структуры σ -субъединицы являются частью двух α -спиралей, вероятно взаимодействующих с -10 ТАТА-мотивом (Malhotra et al., 1996). Мутации в этих районах имеют негативный эффект на процесс узнавания промотора холоферментом РНКП (Siegele et al., 1989). Таким образом, полученные результаты хорошо согласуются с ранее описанными в литературе биохимическими и структурными данными.

Кроме сшивок из нематричной цепи промотора в σ -субъединицу, представляющих их себя основные продукты фотохимической реакции облучения промоторных комплексов, мы также определили участки взаимодействия β -субъединицы кор-фермента с промоторной ДНК. Хотя интенсивность этого сигнала составляла менее 10% от уровня наблюдаемого для σ -субъединицы, его солеустойчивость и воспроизводимость у РНКП из различных видов позволила нам судить об его специфичности. Район β -субъединицы, контактирующий с -5 и -3 положением нематричной цепи был определен нами, как N-конец – цистеин 87. Моделирование расположения нематричной цепи промоторного фрагмента относительно кор-фермента РНКП проведенное позже в лаборатории Ибрайт (Naryshkin et al., 2000) находится в полном соответствии с полученными нами данными по контактам с β и σ -субъединицами.

Глава 2. Мутации С-консервативного района β -субъединицы *E.coli* и их эффект на взаимодействие РНКП с промоторной ДНК

Консервативный район С является одним из девяти участков первичной структуры β -субъединицы, чьи аминокислотные последовательности проявляют высокую степень гомологии с аналогичными последовательностями РНКП других представителей живого мира, включая высших эукариот. На своем N-конце этот участок граничит с большим неконсервативным районом, присутствующим также и у других представителей протеобактерий, но обладающим низкой гомологией или отсутствующим у эубактерий, археобактерий и эукариот, а на своем С-конце – с районом, содержащим мутации устойчивости к рифампицину. В том же С-концевом районе, находящемся на пространственной модели РНКП в непосредственной близости к активному центру фермента, были картированы места фотохимических сшивок из 5'-конца инициаторного нуклеотида.

Одной из задач проделанной работы являлось детальное исследование мутаций С-консервативного района β -субъединицы и их эффекта на образование промоторного комплекса. Основным предметом изучения являлась рецессивная мутация ΔRV , представляющая из себя делецию десяти консервативных аминокислотных остатков С-района (Martin et al., 1992). Данная мутация обладает летальным фенотипом и образует *in vitro* крайне нестабильный комплекс с промотором, обладающим чувствительностью к полианиону гепарину. Однако, элонгационный комплекс РНКП с мутацией ΔRV практически не отличается по своей процессивности и стабильности от комплекса образованного РНКП дикого типа, подчеркивая таким образом непосредственную роль данного участка в процессе стабилизации промоторного комплекса. Для дальнейшего прояснения свойств этого участка С-консервативного района β -субъединицы, нами была сконструирована мутация $\Omega H6$, в которой удаленные консервативные аминокислотные остатки ΔRV были заменены вставкой из восьми произвольных аминокислот. Фенотип полученного мутанта не отличается от РНКП дикого типа, что указывает на то, что длина удаленного участка С-консервативного района β -субъединицы играет более важную роль в стабилизации промоторного комплекса, чем его аминокислотный состав.

Для более подробного изучения роли С-консервативного района в формировании и стабилизации промоторного комплекса, в проделанной работе

мы исследовали две другие мутации β -субъединицы РНКП *E.coli*: $\Delta(186-433)$ и 4348 (R454H), влияющие на образование промоторного комплекса, а также свойства РНКП из *Bacillus Subtilis*.

Определение границ промоторного комплекса РНКП с мутацией ΔRV

В проделанном нами эксперименте промоторный комплекс, образованный РНКП с мутацией ΔRV , сравнивался с комплексами, образованными ферментами дикого типа и мутантными РНКП $\Delta(186-433)$ и $\Omega H6$.

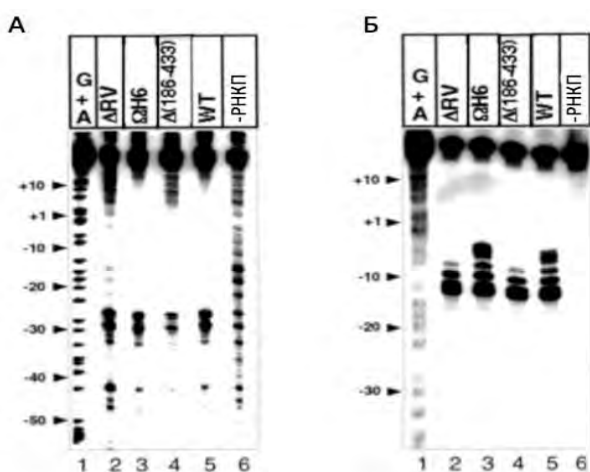


Рис 4. Эндонуклеазный (А) и перманганатный (Б) футпринт промоторных комплексов, РНКП с мутациями С-консервативного района и его окрестностей. Рентгенограмма продуктов реакций перманганатного и эндонуклеазного футпринтов между 106-нуклеотидным T7A2 промоторным фрагментом и мутантными РНКП, разделенных на 6% денатурирующем ПААГ. Первая дорожка на обеих панелях, содержит продукты реакции расщепления T7A2 промотора по гуанодиновым и аненозиновым остаткам. 2,3,4 и 5 дорожки на обеих панелях

- РНКП с мутациями: ΔRV , $\Omega H6$, $\Delta(186-433)$ и дикого типа, соответственно. Шестая дорожка содержит продукты футпринтинга T7A2 промоторного фрагмента в отсутствии РНКП.

В промоторном комплексе дикого типа, РНКП почти полностью экранирует область от положения -40 относительно точки начала транскрипции до приблизительно +20 положения от расщепления эндонуклеазой *DNAseI*. Этот практически сплошной 60-нуклеотидный «след» прерывается только в так называемом гиперчувствительном положении промотора, в районе -25-30, где, как полагают, происходит его резкий изгиб. Расплавленный участок ДНК, образуемый ферментом дикого типа на T7 A2 промоторе при 37 °С, включает в себя область от тимина -15 до тимина -3, относительно начала транскрипции.

Мутация $\Delta(186-433)$, удаляющая из РНКП почти весь неконсервативный район 1 β -субъединицы, приводит к появлению укороченного футпринта, в котором защита ферментом двуцепочечной ДНК не распространяется на ее передний дуплекс (Severinov et al., 1997). Расплавленная область промотора, образуемая этим мутантом, также имеет укороченные размеры своего переднего

участка и не включает в себя остатки тимина в положении -7, -5, -4 и -3. Как видно из Рис. 4 (Панель А, дорожка 2).

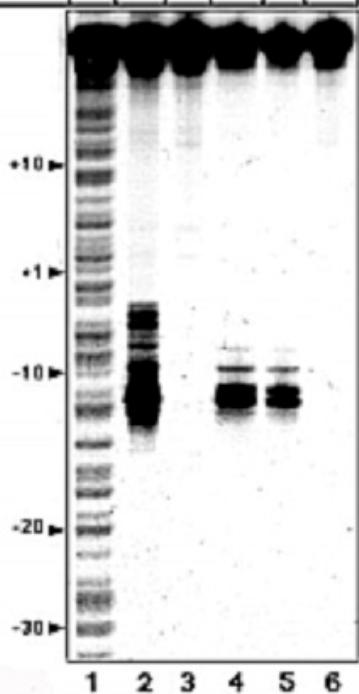
Промоторный комплекс, образованный РНКП с мутацией ΔRV , обладает схожим с РНКП $\Delta(186-433)$, укороченным футпринтом. Однако результаты данного эксперимента указывают и на то, что, несмотря на схожесть, РНКП ΔRV не способна обеспечить полное экранирование промоторного фрагмента, что, вероятно, вызвано высоким уровнем ее диссоциации из комплекса с ДНК. Использование 10-кратного избытка РНКП с мутацией ΔRV , по сравнению с другими РНКП, не помогло компенсировать ее очевидный дефект связывания промоторного фрагмента. В реакции перманганатного футпринтинга на Рис. 4, панель В, дорожка 2, мы показали, что РНКП с мутацией ΔRV образует укороченный расплавленный участок T7A2 промотора, идентичный с РНКП $\Delta(186-433)$.

Производная мутации ΔRV - $\Omega H6$, содержащая вставку из восьми произвольных аминокислот вместо удаленных ΔRV - 10, формирует неотличимый от РНКП дикого типа эндонуклеазный футпринт и «транскрипционный пузырь» на T7A2 промоторе. Эти данные хорошо коррелируют с полученными ранее результатами по исследованию фенотипа данной мутации, указывающими на его схожесть с РНКП дикого типа.

Изучение чувствительности промоторного комплекса РНКП ΔRV к низкой температуре

Изучение границ промоторного комплекса, образуемого РНКП с мутацией ΔRV показало, что он обладает укороченным футпринтом и «транскрипционным

РНКП	G	WT		ΔRV		-
T °C	A	37	0	37	0	37



пузырем» своей передней части, непосредственно прилегающим к точке начала транскрипции. Схожим укороченным футпринтом обладает и РНКП $\Delta(186-433)$, известная тем, что она способна расплавлять промоторную ДНК при 0 °C и даже отрицательной температуре (Severinov et al., 1997), при которой комплекс образованный РНКП дикого типа находится в закрытом состоянии. Учитывая схожесть футпринтов РНКП $\Delta(186-433)$ и ΔRV , большой интерес для нас представляло определение состояния промоторного комплекса последнего при низкой температуре.

Как видно из Рис. 5, «транскрипционный пузырь», образуемый РНКП, имеет укороченные размеры при 37 °C (Рис. 5 дорожка 2) и, при этом,

способен плавить промоторную ДНК при нулевой температуре (Рис. 5, дорожка 5), при которой комплекс образованный РНКП дикого типа остается закрытым (Рис. 5, дорожка 3).

Рис. 5 Перманганатный футпринт РНКП с мутацией ΔRV при низкой температуре. Рентгенограмма 6% денатурирующего ПААГ с продуктами реакции перманганатного футпринтинга между РНКП и T7A2 промотором. Первая дорожка содержит продукты расщепления T7A2 промотора по остаткам гуанина и аденозина, последняя - футпринт T7A2 промотора, не взаимодействующего с РНКП. Дорожки 2 и 3 содержат комплекс фермента дикого типа при 37⁰С и 0⁰С, 4 и 5 – мутанта ΔRV , при тех же температурах, соответственно.

Полученные результаты указывают на дополнительную схожесть РНКП с мутацией ΔRV , на РНКП $\Delta(186-433)$, проявляющуюся не только в границах образуемых ими промоторных комплексов, но и их способности оставаться открытыми при низких температурах.

Изучение свойств промоторных комплексов РНКП с точечной мутацией 4348 и РНКП *Bacillus Subtilis*

Точечная мутация 4348, отобранная в результате поиска протеотрофов на штаммах дефектных в синтезе *ppGpp*, приводит к формированию нестабильного открытого комплекса на рибосомальном промоторе *rrnB P1* (Bartlett et al., 1998). Данная мутация представляет собой замену высококонсервативного остатка лизина 454 на гистидин и находится на расстоянии всего 10 аминокислотных остатков от мутации ΔRV . Исследование свойств РНКП 4348 в экспериментах *in vitro* показало, что мутантный фермент требует значительно более высокой концентрации нуклеотидов для перехода в стадию элонгации, по сравнению с РНКП дикого типа. РНКП с мутацией 4348, подобно РНКП ΔRV , обладает пониженной константой связывания с промоторным фрагментом, и образованный ей мутантный комплекс быстро диссоциирует в присутствии гепарина.

РНКП *Bacillus Subtilis*, несущая в своем гомологичном районе, прилегающем к С-консервативному участку, 90-аминокислотную вставку, также образует нестабильный промоторный комплекс. В дополнение к этому наблюдению, в экспериментах *in vitro* было показано, что РНКП *Bacillus Subtilis* образует укороченный «транскрипционный пузырь», по своим размерам очень похожий на РНКП $\Delta(186-433)$ *E.coli* (Whipple et al., 1992)

Ввиду похожих свойств обоих мутантов ΔRV и 4348 и РНКП *Bacillus Subtilis*, а также близости их расположения в первичной структуре β -субъединицы, их промоторные комплексы были исследованы нами на устойчивость к низким температурам. Как видно из рисунка 6 (Панель А), размер «транскрипционного пузыря» мутанта 4348 при температуре 37⁰С (дорожка 5) не

отличим от того, который образует фермент дикого типа (дорожка 2 и 3). Как и было показано раньше, промоторный комплекс мутантного фермента диссоциирует в присутствии гепарина (дорожка 6). Однако, в отличие от мутанта ΔRV , РНКП 4348 не способна плавить промоторную ДНК при нулевой температуре (дорожка 7). РНКП *Bacillus Subtilis* также образует гепарин-чувствительный, укороченный промоторный комплекс (Рис. 6, Панель Б, дорожки 4 и 5), не остающийся открытым при 0 °С (дорожка 6). Таким образом, полученный результат свидетельствует о том, что холодоустойчивость промоторных комплексов не связана напрямую с С-консервативным районом β -субъединицы и его окрестностей.

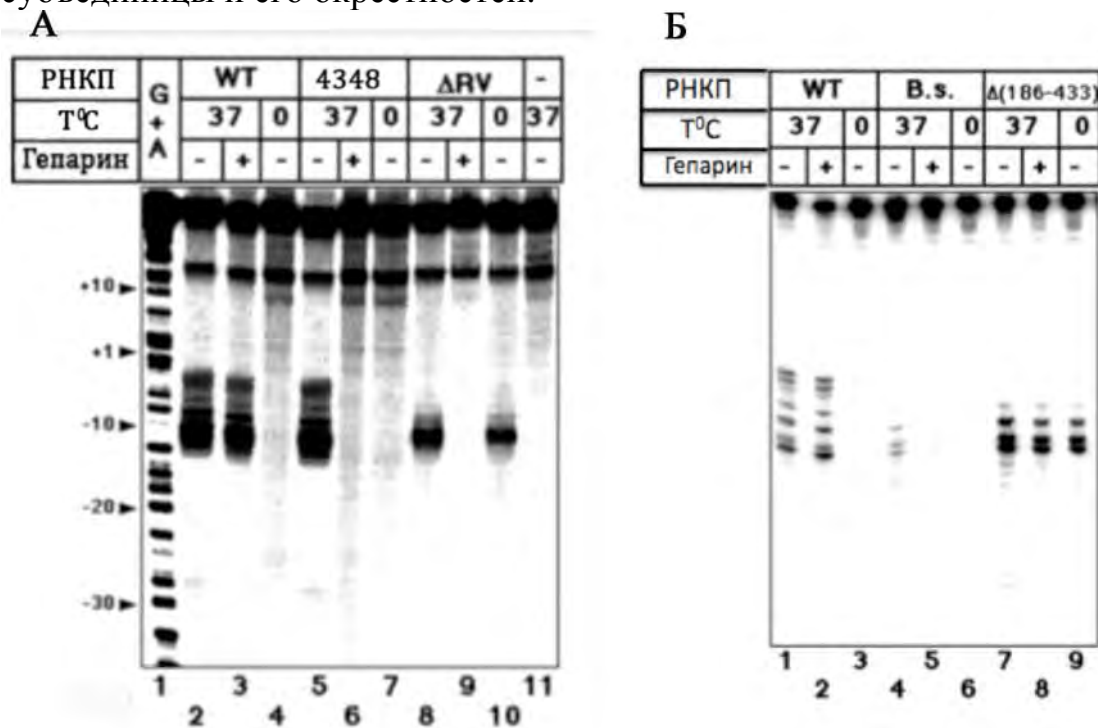


Рис. 6 Влияние гепарина и низкой температуры на образование промоторного комплекса РНКП с мутацией 4348 (Панель А) и РНКП *Bacillus Subtilis* (Панель Б). Рентренограмма продуктов реакций перманганатного футпринтирга промоторных комплексов мутантов РНКП *E.coli*: ΔRV , 4348, $\Delta(186-433)$ и РНКП *Bacillus Subtilis* (B.s.), образованных при 37 °С и 0 °С, в присутствии и отсутствии гепарина. Дорожка №1 на панели А содержит продукты расщепления T7A2 промотора по остаткам гуанидина и аденозина, дорожка №11 - продукты перманганатного футпринта T7A2 промотора не находящегося в комплексе с РНКП.

Структурный контекст мутаций промоторного комплекса и предполагаемый механизм их воздействия на ДНК-белковые взаимодействия.

Изученная в данной работе РНКП с мутацией ΔRV позволяет разобщить два основных свойства промоторного комплекса: устойчивость к гепарину и высокой концентрации соли и чувствительность к понижению температуры.

Наложение мутаций, воздействующих на формирование ДНК-белковых взаимодействий промоторного комплекса, на 3х-мерную структуру РНКП *Taq*,

позволяет пролить свет на возможный механизм их действия (Рис. 7). В структуре РНКП *Taq*, имеющей форму клешни краба, верхняя часть фермента построена практически полностью из β -субъединицы, в которой находятся мутации, исследованные в данной работе. В свою очередь, сама β -субъединица содержит две четкие доли – переднюю и заднюю, образующие контакты с передним и задним дуплексом промоторной ДНК. Передняя доля β -субъединицы состоит из неконсервативного района 1 и частично захватывает N-концевую часть консервативного района С, включающего в себя район мутации ΔRV . Задняя доля содержит в себе оставшуюся часть консервативного района С, а также консервативный район D.

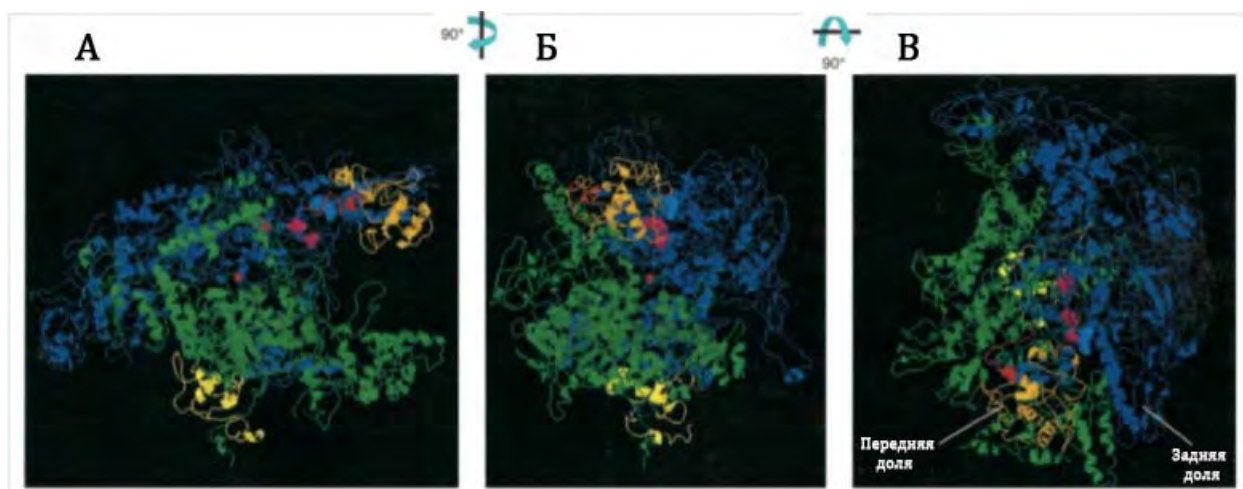


Рис. 7 Структурный контекст мутаций РНКП, влияющих на процесс образования промоторного комплекса. Панели А, Б и В содержат 3х-мерную структуру кор-фермента РНКП *Taq*, изображенную в виде ленточной модели (Zhang *et al.*, 1999). Димер α и β -субъединицы выделены синим цветом, β' – зеленым, ω - желтым., Последовательности РНКП *Taq*, гомологичные изученным в данной работе мутациям β -субъединицы РНКП *E.coli*, обозначены следующим образом: $\Delta(186-433)$ выделена желтым цветом, ΔRV выделена красным цветом, а R454N изображена в виде голубой объемной модели. Аминокислотные остатки РНКП *Taq*, соответствующие S531, A532 и T563 РНКП *E.coli*, представлены в виде розовых объемных моделей.

Согласно предложенному нами механизму образования ДНК-белковых контактов внутри промоторного комплекса, обе доли β -субъединицы взаимодействуют с промоторным фрагментом ДНК, находясь в тесной координации друг с другом. Роль задней доли сводится к облегчению формирования σ -субъединицей изначального «транскрипционного пузыря» и стабилизации его задней границы в районе ТАТА-последовательности. В нашей модели, взаимодействия задней доли β -субъединицы с промоторным фрагментом обладают устойчивостью к низким температурам. Захлопывание задней доли β -субъединицы в данной конформации приводит через аллостерический механизм к

взаимодействию передней доли с промоторным фрагментом, что, в свою очередь, вызывает дальнейшее увеличение «транскрипционного пузыря» в сторону точки начала транскрипции.

Захлопывание передней доли β -субъединицы чувствительно к низким температурам. Наша модель постулирует наличие двух возможных стабильных конформаций взаимодействий обеих долей: обе доли раскрыты, что соответствует закрытому промоторному комплексу, и обе доли захлопнуты - конформация соответствующая открытому промоторному комплексу.

Мутация $\Delta(186-433)$ удаляет практически всю переднюю долю β -субъединицы (Рис. 7), а мутация ΔRV разрушает аллостерический механизм взаимодействия обеих долей. В результате, промоторный комплекс, образованный мутантными РНКП, поддерживается вместе только за счет взаимодействия задней доли β -субъединицы с промотором. Для такого комплекса характерна устойчивость к низкой температуре и лишь частичное расплетание промоторного фрагмента.

Промоторный комплекс, образованный РНКП дикого типа, а также мутантом $\Delta(186-433)$, обладает устойчивостью к гепарину, так как взаимодействия задней доли β -субъединицы с промотором не оказываются затронутыми. Однако, единичная точечная замена R454N (Рис. 7), приходящаяся на участок, соединяющий обе доли β -субъединицы, приводит к появлению чувствительности промоторного комплекса к гепарину. Схожий эффект наблюдается и в случае точечных мутаций аминокислотных остатков S531, A532 и T563, находящихся на трехмерной модели РНКП *Taq* в непосредственной близости с мутацией R454N (Рис. 7). Таким образом, мутации в этом районе, вероятнее всего, приводят к ослаблению взаимодействий задней доли β -субъединицы с промоторным фрагментом, делая весь комплекс чувствительным к конкуренту ДНК. Делеция ΔRV расположена на 3х-мерной модели вплотную к линкеру, соединяющему обе доли. Очевидно, что подобное расположение данной мутации оказывает эффект на ДНК-белковые контакты обеих долей, придавая мутантному промоторному комплексу одновременно чувствительность к гепарину, вызванную ослаблением контактов с ДНК задней доли, и укороченный размер «транскрипционного пузыря», вызванный нарушением взаимодействий передней доли с промоторным участком, прилегающим к точке начала транскрипции.

Таким образом, предложенная нами модель ДНК-белковых взаимодействий в промоторном комплексе позволяет объяснить разобщение его двух основных свойств – устойчивости к гепарину и низким температурам - с помощью мутации в консервативном районе С β -субъединицы РНКП.

Глава 3. Структура и функции НКД β' -субъединицы РНКП *E.coli*

Кор-фермент РНКП *E.coli* содержит в последовательности своей β' -субъединицы большую вставку, встречаемую лишь у небольшого количества других представителей грамм-негативных бактерий. Первичная последовательность этого 188-аминокислотного фрагмента, называемого неконсервативным доменом (НКД), расположена между двумя высококонсервативными районами G и G', играющими одну из ключевых ролей в процессе синтеза м-РНК (Epshtein et al., 2002). Многочисленные биохимические данные указывают на то, что аминокислотные замены и делеции в этом домене воздействуют на процесс паузирования, терминации и общей стабильности элонгационного комплекса, но не приводят к нарушению основных каталитических функций РНКП *in vitro* (Zakhrova et al., 1998).

Структура РНКП *E.coli*, на которой было описано большинство биохимических свойств этого фермента, не определена к настоящему времени с достаточно высоким разрешением, позволяющим обнаружить расположение НКД. Наиболее изученные в структурном плане РНК-полимеразы термофильных бактерий *Thermus aquaticus* (*Taq*) и *Thermus thermophilus* (*Tth*) не содержат в своем составе последовательность, гомологичную НКД *E.coli*. а вместо несут короткий, неструктурированный линкер длиной в 15 аминокислотных остатков, называющийся G или триггер–петлей и соединяющий высококонсервативные районы G и G'. Путем наложения структуры фермента из *E.coli* на высокодетальную структуру ферментов термофильных бактерий, становится возможным идентифицировать основные структурные мотивы РНКП *E.coli*, вовлеченные в катализ. К сожалению, такой подход не позволяет выявить положение НКД β' -субъединицы, ввиду отсутствия соответствующей ему электронной плотности на общей карте РНКП *E.coli*. Задачей данной работы являлось: клонирование, экспрессия, кристаллизация, определение трехмерной структуры НКД и ее моделирование в общем контексте элонгационного комплекса.

Кристаллизация и разрешение структуры НКД β' -субъединицы *E.coli*

Фрагмент гена *proC*, содержащий последовательность НКД (аминокислотные остатки 944-1129) был клонирован в экспрессионный вектор pET-15b, экспрессирован в штамм BL-21(DE3) и очищен методами высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученный высокоочищенный препарат НКД был успешно закристаллизован с помощью коммерческих наборов, методом диффузии паров летучих веществ. Оптимизация формы кристаллов достигалась с помощью органических микродобавок. Картины дифракции рентгеновских лучей замороженными кристаллами НКД были получены на

синхротронном ускорителе Брукхэйвенской Национальной Лаборатории. Проблему фаз разрешили благодаря аномальным сигналам рассеяния рентгеновских лучей остатками селено-метионина, введенными в кристаллы НКД. Для построения трехмерной структуры белка использовали программы SOLVE/RESOLVE и O.

Общая архитектура молекулы НКД β' -субъединицы РНКП *E.coli*.

Разрешенная структура 188-аминокислотного НКД β' -субъединицы состоит из двух гибридных сэндвич-барел доменов (ГСБа и ГСБб), соединенных линкером. ГСБа содержит аминокислотные остатки 944-1022, а ГСБб - 1023-1130. Структура НКД состоит практически полностью из анти-параллельных β -слоев и выступающих из них неструктурированных петель. ГСБа содержит одну такую 17-членную петлю - А1, а ГСБб – две: 33-членную петлю Б1 и 15-членную петлю Б2. Гомологичные домены у других прокариот иногда содержат дополнительные вставки или делеции, которые всегда располагаются в составе петель, таким образом, не нарушая основной тип укладки и структуру ГСБ.

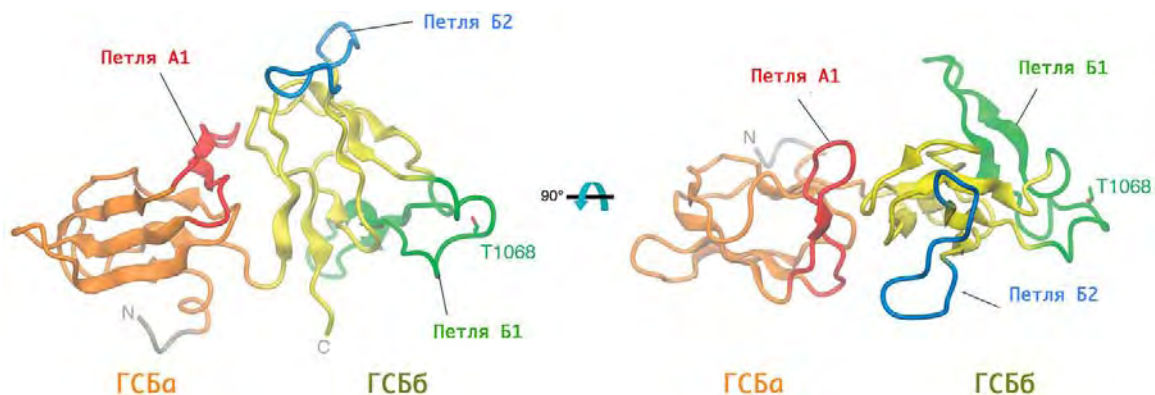


Рис. 8. Структурная модель НКД β' -субъединицы РНК-полимеразы *E.coli*. Полипептидная цепь представлена в виде цветной ленты. Полученная структура состоит из двух предсказанных ранее гибридных сэндвич-барел доменов (ГСБа и ГСБб), соединенных линкером, и построена практически полностью из β -слоев и выступающих наружу петель. Треонин 1068 петли Б1 является мишенью протеин-киназы Gr0.7 бактериофага T7.

Исследование поверхностного распределения заряда НКД β' -субъединицы выявило значительную асимметрию. Одна из сторон этого фрагмента несет сильно отрицательный заряд, в целом характерный для поверхности РНК-полимеразы, а другая - положительный, обычно присущий ДНК-связывающим областям фермента.

Построение модели элонгационного комплекса с учетом структуры НКД β' -субъединицы.

В качестве исходной модели элонгационного комплекса *E.coli* была использована гомологичная структура *Taq* РНКП, находящейся в комплексе с синтетическим ДНК-РНКовым гибридом, построенным из олигонуклеотидов (Korzheva et al., 2000). Данная модель не содержит в структуре своей β' -субъединицы участка, гомологичного НКД *E.coli*. Вместо этого, два высоко консервативных района G и G' *Taq* полимеразы соединены гибкой 15-членной петлей, не видимой в структуре фермента из-за своей подвижности. В РНКП *E.coli*, НКД β' -субъединицы соединяется с G и G' районами посредством двух подвижных линкеров. Наличие этих двух линкеров, способных растягиваться на 25 - 30 Å, подразумевает определенную подвижность НКД, в результате чего его структура не отслеживается на модели структуры РНКП *E.coli* низкого разрешения (Darst et al., 2002)

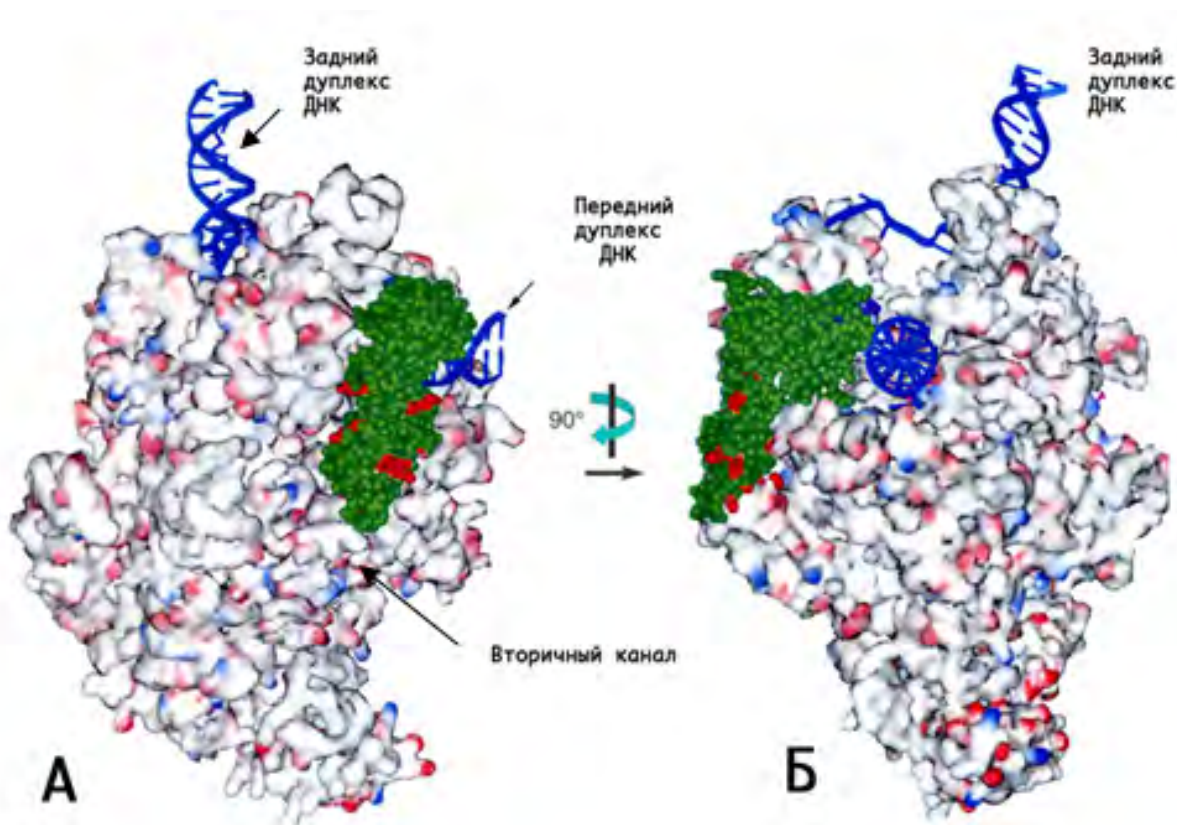


Рис. 9 Структурная модель элонгационного комплекса *E.coli*, содержащая НКД β' -субъединицы. Кор-фермент РНКП изображен в виде объемной модели. Аминокислотные остатки, несущие положительный заряд, выделены синим цветом, отрицательный заряд – красным, а нейтральные – белым. Молекула двуцепочечной ДНК представлена ленточно-палочной моделью синего цвета. НКД β' -субъединицы выделен зеленым цветом. Его аминокислотные остатки, участвующие в реакциях химического «сшивания», показаны красным цветом. Два изображения модели элонгационного комплекса повернуты по отношению друг к другу на 90° .

В построенной нами модели НКД β' -субъединицы отводится важная роль в стабилизации контактов РНКП с молекулой ДНК, а также с элонгационным фактором GreB. ГСБб мотив НКД, вместе с другими участками фермента, участвует в образовании плотного зажима, практически полностью обхватывающего передний дуплекс ДНК. Одним из подтверждений подобного расположения НКД является тот факт, что делеция в этом домене вызывает значительную дестабилизацию элонгационного комплекса, делая его чувствительным к конкуренту связывания ДНК – гепарину (Artsimovitch et al., 2003). Подобное построение также позволяет объяснить роль НКД на процесс паузирования, зависящий от прочитываемой РНКП последовательности (Artsimovitch et al., 2000).

Кроме паузирования, в литературе подробно описана роль НКД β' -субъединицы в процессе терминации. В этом районе фермента были картированы 13 аминокислотных замен, вызывающих нарушение узнавания терминаторных последовательностей (Weilbaecher et al., 1994). Так как терминация транскрипции тоже зависит от последовательности переднего дуплекса ДНК, можно предположить, что модификации аминокислотных остатков ГСБб, вызывающие ослабление его контактов с ДНК, способны оказывать существенное влияние на этот процесс. Возможным доказательством этому служит фосфорилирование треонина 1068, расположенного в том районе ГСБб, который согласно нашей модели, контактирует с передним дуплексом ДНК. Внесение негативного заряда в этот участок НКД посредством фосфорилирования треонинового остатка протеинкиназой бактериофага T7, вызывает дестабилизацию взаимодействия ГСБб с ДНК и вызывает преждевременную терминацию клеточной транскрипции.

Расположение ГСБа в непосредственной близости от вторичного канала РНКП хорошо согласуется с данными химического «сшивания», позволяющими картировать этот район НКД в непосредственной близости от 3'-конца РНК, «арестованного комплекса». Данный комплекс образуется из элонгационного комплекса, когда РНК-полимераза, в процессе процессивной транскрипции, откатывается назад, выпуская растущий 3'-конец РНК из своего активного центра. Синтезированная м-РНК в подобном комплексе выходит из вторичного канала РНК-полимеразы, где и происходит ее взаимодействие с ГСБа. Предложенное расположение ГСБа в модели элонгационного комплекса позволяет также объяснить его экранирование, элонгационным фактором GreB при обработке элонгационного комплекса гидроксильными радикалами (Laptenko et al., 2003).

Предложенная нами модель элонгационного комплекса также проливает свет на влияние НКД на основные каталитические функции РНКП. В силу близости расположения N и C-концов НКД к двум α -спиралям консервативных районов G и G', можно предположить, что элонгационные факторы, взаимодействующие с НКД, способны через него аллостерически воздействовать на активный центр фермента. Подобные сигналы потенциально могут передаваться от

последовательности переднего дуплекса ДНК, с которым взаимодействует ГСБб. Свидетельством в пользу возможности такого аллостерического регулирования является связывание моноклональных антител с НКД, которое приводит к значительному уменьшению константы связывания нуклеозидтрифосфата, входящего в активный центр фермента (Laptenko et al., 2003).

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что ГСБа мотив НКД β' -субъединицы является частью вторичного канала РНКП, с которым взаимодействует 3'-конец м-РНК «арестованного транскрипционного комплекса», а ГСБв, вместе с другими структурными элементами РНКП, формирует участок плотного связывания с передним дуплексом ДНК.

Выводы

- 1) С помощью серии олигонуклеотидов, имитирующих последовательность матричной и нематричной цепей *LacUV5* промотора с введенными в них фотохимическими сшивающими группами, впервые с достаточной точностью откартированы участки холофермента РНКП, вовлеченные в формирование промоторного комплекса.
- 2) Описан новый тип промоторного комплекса, сочетающий в себе нестабильность «закрытого комплекса» с расплетенностью цепей промотора, характерной для «открытого комплекса».
- 3) Впервые определена трехмерная структура фрагмента β' -субъединицы РНК-полимеразы *E.coli* с большим разрешением.
- 4) На основании полученной структуры НКД β' -субъединицы, построена обновленная модель элонгационного комплекса РНК-полимеразы *E.coli*, позволяющая объяснить роль данного участка в стабилизации транскрипционного комплекса, его паузировании и в процессе терминации, а также каталитической активности фермента.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации.

Nechaev, S., Chlenov, M., Severinov, K. (2000) Dissection of two hallmarks of the open complex by mutation in an RNA polymerase core subunit. *J.Biol Chem.* **275(33)**: 25516-25522

Chlenov, M., Masuda, S., Murakami, K., Nikiforov, V., Darst, S., Mustaev, A. (2005) Structure and function of lineage-specific sequence insertions in bacterial RNA polymerase β' -subunit. *J.Mol. Bio.* **353**, 138-154