

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ**

На правах рукописи

СЕВЕРИНОВ Константин Викторович

**Структурно-функциональные исследования взаимодействий ДНК-
зависимой РНК-полимеразы бактерий с промоторами**

03.00.26 - Молекулярная генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

в форме научного доклада

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва 2006

Работа выполнена в отделе Молекулярных основ генетики клеток Института молекулярной генетики РАН и в лаборатории Молекулярных механизмов транскрипции прокариот Института Ваксмана, Университет Ратгерс, США

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
академик П.Г. Георгиев

доктор биологических наук,
профессор, чл.-корр. РАН
А.Б. Четверин

доктор биологических наук
М.С. Гельфанд

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита состоится «21» декабря 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, г. Москва, ул. Вавилова д. 34/5.

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

Автореферат разослан «15» ноября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат фармацевтических наук

Л.С. Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Инициация транскрипции является наиболее сложно регулируемой частью транскрипционного цикла и оказывает непосредственное влияние на уровень генной экспрессии. Инициация остается наименее изученным этапом транскрипции. Более полное понимание процесса инициации транскрипции имеет как чисто научный, так и практический интерес. Понимание механизма инициации транскрипции и его регуляции позволит управлять экспрессией отдельных генов, а также откроет путь к разработке антибиотиков, специфичных к данному виду бактерий или влияют на экспрессию лишь узкой группы или даже одного конкретного гена. Известно, что для узнавания консервативных элементов промотора и плавления ДНК в области старта транскрипции у бактерий необходима σ -субъединица РНК-полимеразы. Однако, так как в структуре промоторного комплекса различные домены и структурные элементы кор-фермента РНК-полимеразы находятся поблизости или вступают в непосредственный контакт с промоторной ДНК, σ -субъединица является единственной детерминантой узнавания промоторной ДНК и стабильности промоторного комплекса, образуемого голоферментом РНК-полимеразы. Выяснение роли таких контактов позволило бы гораздо полнее представить картину взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами, что, в свою очередь, позволило бы гораздо лучше понять причины дифференциальной утилизации различных промоторов *in vivo* и *in vitro*, а также предсказывать силу промоторов методами биоинформатики.

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы являлась всеобъемлющая характеристика взаимодействий и контактов между ДНК-зависимой РНК-полимеразой бактерий и ДНК промоторов, выяснение функциональной значимости этих взаимодействий и контактов, а также возможности регуляции силы промоторов за счет изменения этих взаимодействий и контактов.

Научная новизна и практическая ценность работы. В ходе выполнения работы впервые охарактеризовано несколько доменов кор-фермента РНК-полимеразы, которые могут оказывать сильное влияние на утилизацию бактериальных промоторов. Так как описанные домены РНК-полимеразы высоко консервативны в эволюции, с большой вероятностью можно утверждать, что похожие взаимодействия играют важную роль и при узнавании промоторов РНК-полимеразами эукариот. В ряде случаев показано, как регуляция активности промоторов осуществляется за счет белок-белковых взаимодействий между регуляторами транскрипции и доменами кор-фермента РНК-полимеразы.

Конкретные результаты работы могут быть суммированы следующим образом. Показано, что взаимодействие α STD с UP-элементами промоторов является мишенью АДФ-рибозилирования бактериофагом T4, само АДФ-рибозилирование α STD является «антиактивационным» регулированием транскрипции. Охарактеризована роль подвижной заслонки β -субъединицы РНК-полимеразы в узнавании промоторов и предложен молекулярный механизм, объясняющий изменение промоторной специфичности голофермента РНК-полимеразы бактерий за счет изменения конформации подвижной заслонки. Показано, что

транскрипционный фактор AsiA регулирует утилизацию промоторов нарушая взаимодействие подвижной заслонки с четвертым районом σ^{70} -субъединицы. Охарактеризован дополнительный базальный элемент бактериальных промоторов, который находится между транскрипционным стартом и -10 элементом и узнается консервативным районом 1.2 σ -субъединицы. Показана роль β' -молнии в узнавании промоторного спейсера между -10 и -35 элементами промоторов. Показана роль нижней челюсти β' -субъединицы во взаимодействии с двуцепочечной ДНК ниже точки транскрипционного старта. Определен молекулярный механизм изменения промоторной специфичности голофермента РНК-полимеразы *E. coli* при связывании белка gp2 бактериофага T7. Определена первичная структура генов *pro* *Thermus aquaticus*. Определена третичная структура кор-фермента РНК-полимеразы *T. aquaticus*. Создана генетическая система, позволяющая проводить функциональные и структурные исследования рекомбинантной РНК-полимеразы *T. aquaticus* и ее мутантных производных. Определен молекулярный механизм узнавания участка начала репликации минус цепи бактериофага M13. Показано, что это узнавание является независимым от σ^{70} -субъединицы и осуществляется кор-ферментом РНК-полимеразы за счет взаимодействия с каналом кор-фермента, ответственным за связывание переднего дуплекса ДНК. Кор-фермент способен специфически инициировать abortивный синтез на участке начала репликации M13, а для образования более длинных транскриптов необходим район 3.2 σ^{70} -субъединицы.

Полученные результаты существенно расширили современные представления о механизмах инициации клеточной транскрипции. В частности

показано, что в определенных случаях σ -субъединица РНК-полимеразы необходима для синтеза полноразмерной РНК и не играет роли в специфическом узнавании точки начала инициации, которое осуществляется кор-ферментом РНК-полимеразы. Новые представления, возникшие в результате проделанной работы, могут быть использованы в биотехнологии для создания новых поколений промоторов для эффективной экспрессии рекомбинантных генов, а также для разработки антибиотиков, которые ингибируют транскрипцию бактерий, связываясь с доменами РНК-полимеразы, изученными в данной работе.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на межведомственном межинститутском семинаре «Хромосома» при Институте биологии гена РАН, (2006), на международные Энгельгартовских конференциях по молекулярной биологии (2004, 2006), 35-ой отчетной конференции Института белка (2002), международных конференциях FASEB по Инициации транскрипции у прокариот (Сакстонс Ривер, Вермонт, США в 1995, 1997, 1999, 2001, 2003 и 2005 годах), международных конференциях лаборатории Колд Спринг Харбор (США) по фагам и молекулярной генетике 1996, 1997, 1999, 2000, 2002, 2002, 2003 и 2004 годах, международных конференциях Американского общества микробиологов (ASM в 1999, 2001 и 2003 годах) и международного союза микробиологических обществ (IUMS) в 2005 году, на 16-ом съезде французского биофизического общества в 2001 году, на международной конференции Пост-инициационные активности РНК-полимеразы (Моунтайн Лэйк, Вирджиния, США) в 1994, 1996, 1998, 2000, 2005, 2003 и 2005 годах и на

многочисленных приглашенных научных семинарах в различных научно-исследовательских учреждениях в России, США и европейских стран.

Публикации по теме работы. По материалам диссертации опубликовано более 110 печатных работ за 1993-2006 гг.

Личный вклад автора. Во всех работах, проведенных в подразделении автора, автору принадлежит ведущая роль в выборе экспериментальной стратегии проведенных исследований и разработке подходов к решению экспериментальных задач, в обсуждении, интерпретации и обобщении полученных данных и написании публикаций. Обсуждаемые в работе результаты из подразделения автора были либо получены лично автором, либо руководимыми ими студентами, аспирантами и научными сотрудниками. В работах, выполненных в сотрудничестве с другими лабораториями, личный вклад автора заключался в непосредственном участии в проведении экспериментов, в обсуждении их результатов и написании публикаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

РНК во всех клеточных организмах синтезируется многосубъединичным ферментом – ДНК-зависимой РНК-полимеразой (РНКП). Функциональный цикл РНКП, т. н., транскрипционный цикл, можно разделить на три основных стадии: инициации, элонгации и терминации транскрипции. В ходе инициации РНК-полимераза должна распознать последовательность промоторной ДНК среди очень большого избытка непромоторных последовательностей, экспонировать матричную цепь ДНК в районе транскрипционного старта за счет ограниченного плавления (открывания) цепей ДНК промотора и инициировать синтез РНК. Инициация транскрипции у прокариот осуществляется холоферментом РНК-полимеразы, состоящим из кор-фермента и инициаторной субъединицы σ . Кор-фермент представляет собой комплекс из пяти полипептидов ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) с общей массой около 360 кДа. Последовательность каждой субъединицы кор-фермента имеет существенные гомологии с субъединицами эукариотических и археобактериальной полимераз. σ -субъединицы РНКП специфичны для бактерий: археи и эукариоты используют в инициации белки и белковые комплексы, не гомологичные бактериальным.

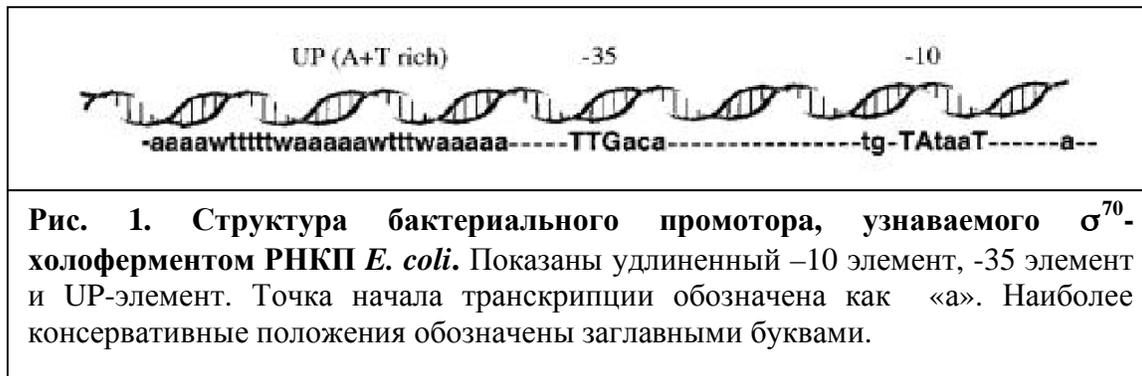
Кор-фермент способен осуществлять синтез РНК на стадии элонгации транскрипции, а также терминировать транскрипцию на терминаторах, однако, он не способен инициировать транскрипцию с промоторов. σ -субъединицы также неспособны самостоятельно узнавать промоторы, однако, в составе холофермента они специфически связываются с консервативными последовательностями промотора, находящимися в положениях -35 и -10 относительно точки начала

транскрипции (+1), с образованием закрытого промоторного комплекса. σ -субъединицы также участвуют в плавлении промоторной ДНК, которое необходимо для образования открытого промоторного комплекса. В открытом комплексе холофермент не может сразу перейти к процессивному синтезу РНК и, оставаясь связанным с промотором, синтезирует большое количество коротких, так называемых, абортивных РНК. При удлинении абортивной РНК до определенной длины происходит потеря σ -субъединицы, контакты РНКП с промотором нарушаются, и образуется элонгационный комплекс, который может двигаться по ДНК и осуществлять процессивный синтез РНК длиной в тысячи нуклеотидов без диссоциации с матрицы.

σ -субъединица играет центральную роль в инициации, будучи прямо вовлеченной в узнавание промотора и плавление ДНК. *E. coli* содержит семь различных σ -факторов, каждый из которых обеспечивает узнавание промоторов с определенными последовательностями. В экспоненциальной фазе роста более 90% молекул холофермента в клетке содержит субъединицу σ^{70} . При смене окружающих условий процент σ^{70} -холофермента уменьшается за счет образования холоферментов, содержащих другие σ -субъединицы. Так, σ^S ответственна за транскрипцию генов, специфичных для стационарной фазы роста, σ^{32} и σ^E узнают промоторы генов ответа на тепловой шок и т. д.

Множественные выравнивания последовательностей белков σ^{70} -семейства выявляют четыре эволюционно консервативных района, которые могут быть поделены на субрайоны. Структурные данные выявляют в белках σ^{70} -семейства по крайней мере три отдельных домена, соединенных гибкими линкерами.

Эволюционно консервативные районы σ приблизительно совпадают со структурными доменами. Такая структурная организация определяет существование множества конформаций молекул σ -субъединиц. Различные биохимические свойства свободной σ -субъединицы и σ -субъединицы в составе холофермента обусловлены скорее различием в относительном положении структурных доменов, нежели изменениями в самих доменах.



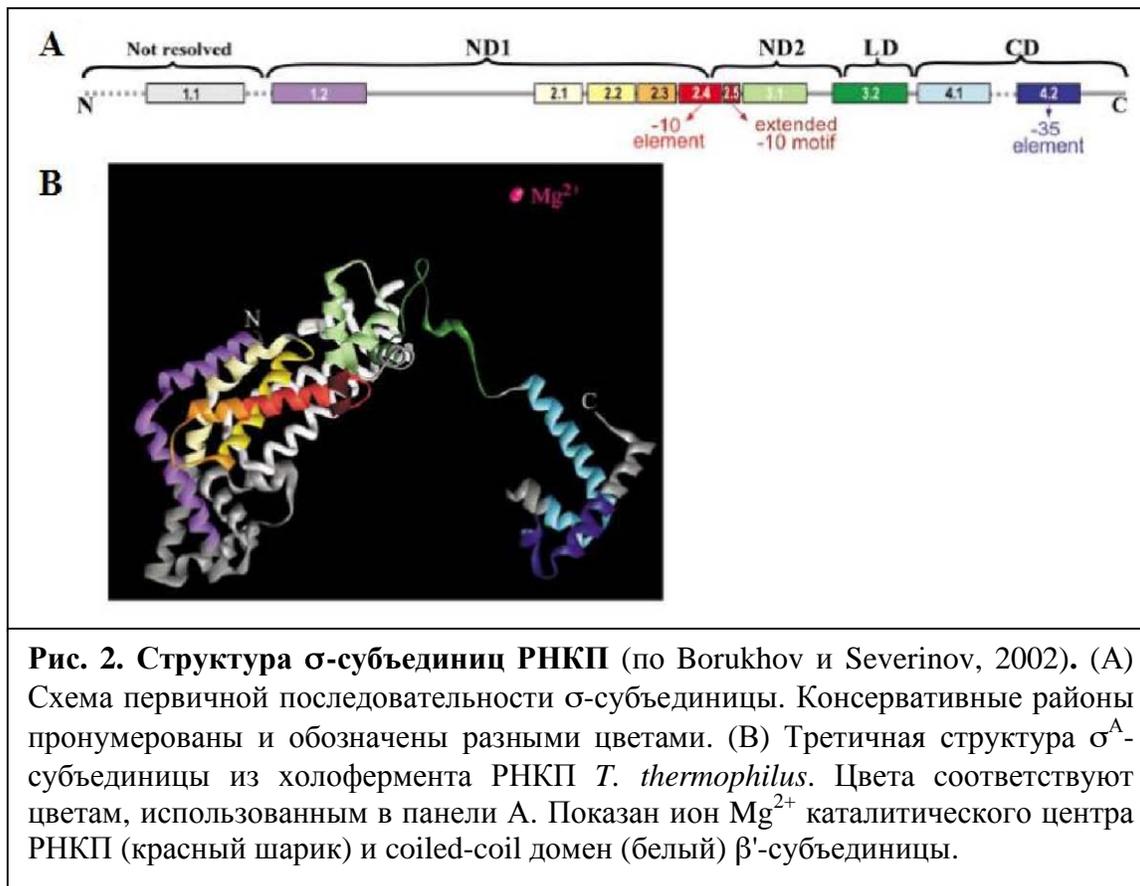
Промотором называют участок ДНК, находящийся перед началом транскрипционной единицы и ответственный за связывание и правильное позиционирование голофермента РНКП относительно точки начала транскрипции. Сравнение большого количества промоторов, узнаваемых σ^{70} холоферментом, дало возможность выявить консервативные последовательности, необходимые для их функционирования (Рис. 1). Базальными элементами промотора называются последовательности длиной 6 нп, расположенные в районе положений -10 и -35 относительно точки начала транскрипции. В случае σ^{70} -субъединицы оптимальная (консенсусная) последовательность -10 элемента (по нематричной цепи) -- это ТАТААТ, а -35 элемента - ТТГАСА. Хотя оптимальные последовательности -10 и -35 элементов различны для разных σ -факторов, их расположение по отношению к старту транскрипции консервативно. Сила промотора в большинстве случаев

коррелирует со степенью сходства -10 и -35 элементов промотора с консенсусными последовательностями. Последовательности базальных элементов у подавляющего большинства промоторов отличаются от консенсусных последовательностей, что позволяет клетке регулировать их активность.

Узнавание -10 и -35 элементов промотора происходит за счет ДНК-белковых взаимодействий с эволюционно консервативными районами σ -субъединицы. Структурные и биохимические исследования свидетельствуют о том, что консервативный район 2.4 узнает промоторный элемент -10 (Рис. 2). Свободные σ -субъединицы или фрагменты σ , содержащие район 2, способны лишь к очень слабому и малоспецифичному взаимодействию с двуцепочечной ДНК, последовательность которой имеет в себе -10 элемент. Однако в составе холофермента узнавание одноцепочечной нематричной цепи -10 элемента происходит с высокой специфичностью, что указывает на возможную роль района 2 в плавлении промотора.

Генетические, биохимические и структурные данные показывают, что консервативный район 4.2 σ -субъединицы узнает -35 элемент промотора (Рис. 2). Район 4.2 необходим для формирования промоторных комплексов на большинстве промоторов, и некоторые бактериальные факторы регулируют эффективность инициации, взаимодействуя с районом 4.2 и усиливая (активаторы), или ослабляя (репрессоры) его взаимодействие с -35 элементом.

Взаимное расположение -10 и -35 элементов также влияет на силу промотора. Оптимальная длина спейсера, который разделяет -10 и -35 элементы -



17-18 пар оснований; изменение длины спейсера как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения ведет к резкому ослаблению промотора.

В отличие от -10 элемента, -35 элемент не является абсолютно необходимым для активности промотора. Так, промотор *galP1* является сильным промотором, но тем не менее не содержит функционального -35 элемента. В данном случае роль второго базального элемента промотора берет на себя дополнительный мотив TGn (где n - любое основание), непосредственно прилегающий к -10 элементу. Такие промоторы были названы промоторами «удлиненного -10 класса». То, что мотив TGn в составе удлиненного -10 элемента является независимым промоторным элементом подтверждается тем, что в его узнавании принимает участие отдельный район σ^{70} - эволюционно консервативный район 2.5 (Рис. 2).

Несмотря на то, что σ -субъединица безусловно ответственна за узнавание промотора холоферментом РНКП, она не способна связывать промоторную ДНК в свободном состоянии. Причина этого заключается в том, что, во-первых, каждый из трех потенциальных ДНК-связывающих модулей σ -субъединицы способен лишь к очень слабым взаимодействиям со своими ДНК-мишенями, и ни одно из этих взаимодействий в отдельности не достаточно для формирования промоторного комплекса. Более того, внутри самой σ -субъединицы имеются взаимодействия, которые приводят к автоингибированию узнавания промотора свободной σ . Это автоингибирование снимается при образовании холофермента. Основное взаимодействие кор-фермента и σ -субъединицы происходит между районами 2.1 и 2.2 и эволюционно консервативным coiled-coil элементом β' -субъединицы (Рис. 2) (Sharp et al., 1999). Отдельно взятый coiled-coil домен β' индуцирует узнавание одноцепочечного -10 элемента σ^{70} -субъединицей или ее фрагментами, содержащими район 2. Таким образом, взаимодействие с coiled-coil доменом β' снимает автоингибирование связывания с промотором в свободной σ -субъединице, однако, механизм этого процесса пока не ясен. Другой причиной неспособности свободной σ узнавать промоторы является то, что расстояние между ее ДНК-связывающими доменами не позволяет осуществить одновременное взаимодействие с двумя или более промоторными элементами. Одновременное взаимодействие между ДНК-связывающими доменами σ и их мишенями в ДНК становится возможным только после формирования холофермента.

Прямые измерения, проведенные с помощью метода резонансного переноса люминесцентной энергии показывают, что в свободной σ^{70} расстояние между доменами 2.4 и 4.2 составляет около 40 Å, т. е. гораздо короче расстояния между –

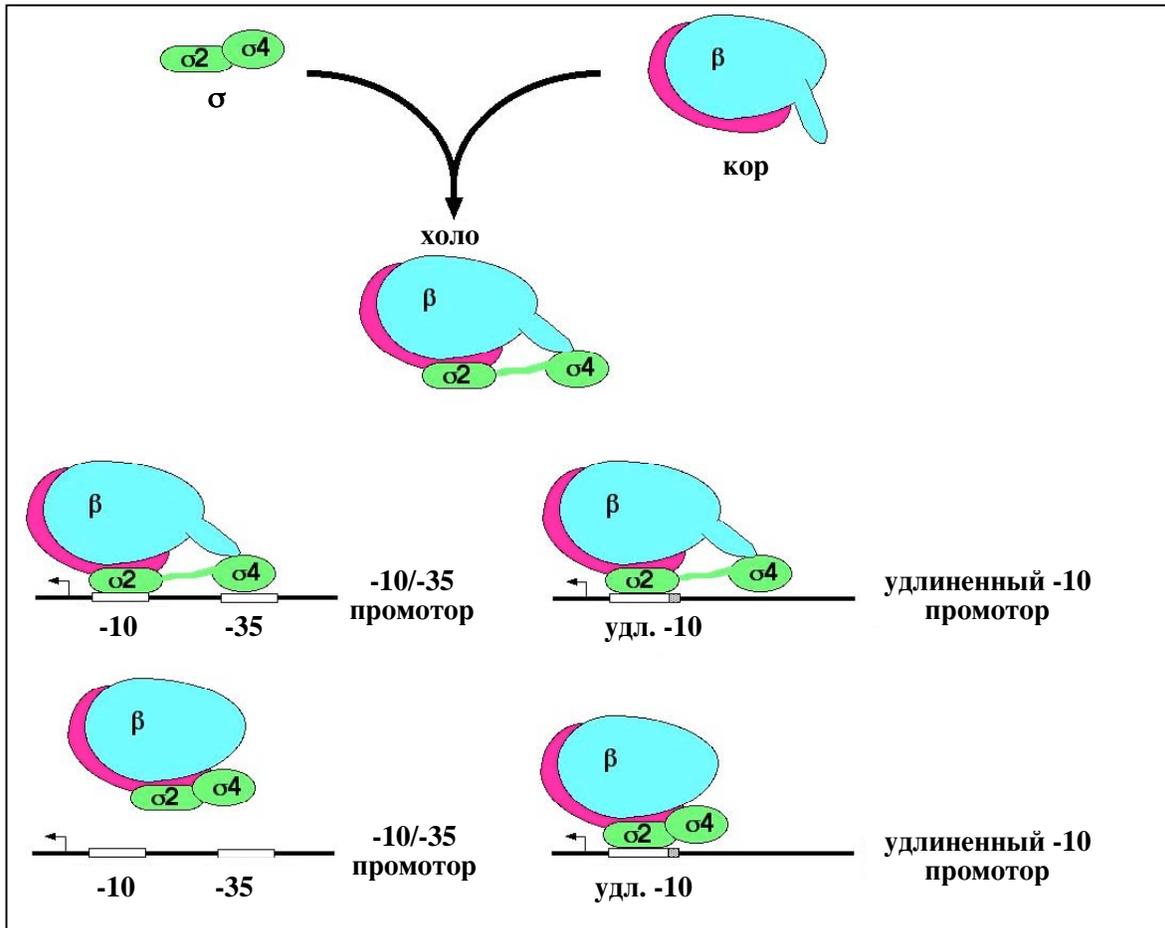


Рис. 3. Механизм изменения промоторной специфичности РНКП за счет делеции β -заслонки. РНКП без заслонки (внизу) не способна узнавать промоторы -10/-35 класса. Объяснения в тексте.

10 и -35 элементам промотора (считая, что они разделены 17 парами оснований В-формы ДНК). При формировании холофермента кор РНКП индуцирует конформационные изменения в σ , которые увеличивают расстояние между районами 2.4 и 4.2 и делают возможным одновременное узнавание -10 и -35 промоторных элементов. Нами был выяснен механизм этих изменений - он включает белок-белковые взаимодействия между подвижным элементом кор-

фермента, т. н., заслонкой β -субъединицы, и районом 4 σ (Kuznedelov и др., 2002, Рис. 3). Удаление β -заслонки не приводит к нарушению формирования холофермента, однако, внутримолекулярное расстояние между районами 2 и 4 σ в мутантном холоферменте остается таким же, как и в свободной σ -субъединице. Как следствие, холофермент, не содержащий β -заслонки, не способен узнавать промоторы $-10/-35$ класса. В то же время β -заслонка оказывается ненужной для узнавания промоторов удлиненного -10 класса (Kuznedelov и др., 2002).

Сила взаимодействия β -заслонки с районом 4 σ может влиять на промоторную специфичность. Например, в случае σ^{70} и σ^S соответствующие холоферменты выполняют различные физиологические функции: σ^{70} -холофермент ответственен за транскрипцию большинства генов, экспрессирующихся в экспоненциальной фазе роста, а холофермент, содержащий σ^S , транскрибирует гены, необходимые для выживания в стационарной фазе. В составе холофермента районы 2.4 и 4.2 как σ^{70} , так и σ^S узнают идентичные промоторные элементы. Несмотря на это, холоферменты, образованные σ^{70} и σ^S , имеют разную промоторную специфичность. σ^S -холофермент менее чувствителен к отклонениям последовательности -35 элемента от консенсуса, и его промоторные комплексы более устойчивы в условиях, ослабляющих взаимодействие РНКП с промотором, таких, например, как повышенная концентрация соли. С использованием двугибридной системы нами было показано, что район 4 σ^S взаимодействует с β -заслонкой на несколько порядков сильнее, чем соответствующий район σ^{70} . Таким образом, возможно, что прочное взаимодействие β -заслонки четко позиционирует район 4 σ^S вблизи -35 промоторного элемента и позволяет установить контакты

между районом 4.2 σ^S и ДНК, даже когда ее последовательность значительно отличается от оптимальной последовательности -35 элемента. С другой стороны, слабое взаимодействие β -заслонки с 4-ым районом σ^{70} делает специфическое взаимодействие района 4.2 с -35 последовательностью обязательным для формирования промоторного комплекса (Borukhov и Severinov, 2002).

Нами было также предположено существование регуляторных факторов, которые изменяют промоторную специфичность холофермента, разрушая или,

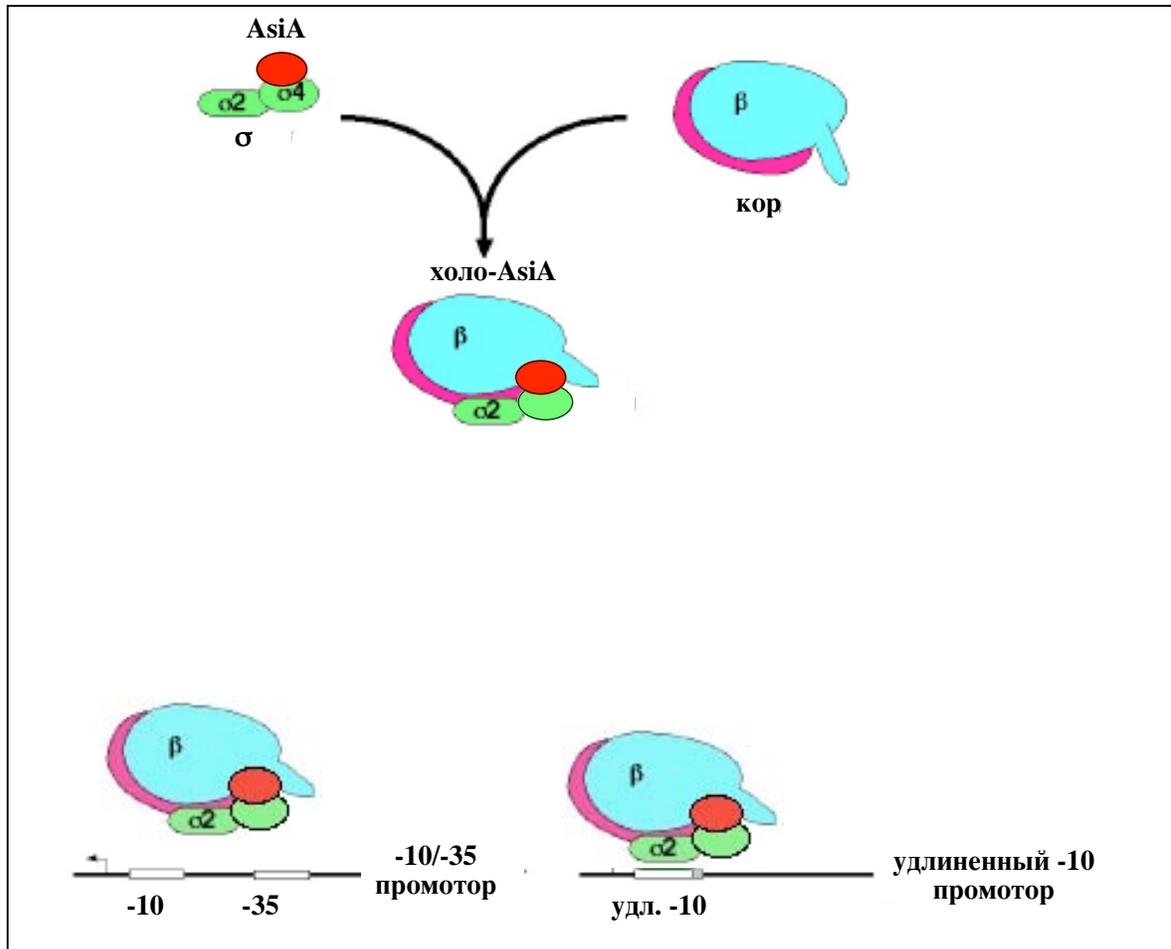


Рис. 4. Механизм изменения промоторной специфичности РНКП белком AsiA за счет нарушения взаимодействия района 4 σ^{70} и β -заслонки. Объяснения в тексте.

наоборот, стабилизируя взаимодействие между β -заслонкой и районом 4 σ . Это предположение было экспериментально подтверждено во время изучения белка AsiA - транскрипционного регулятора, кодируемого бактериофагом T4 (Рис. 4). AsiA связывается с районом 4 σ^{70} -субъединицы в составе холофермента и предотвращает узнавание промоторов -10/-35 класса. С другой стороны, промоторы с удлинённым -10 элементом могут узнаваться и в присутствии AsiA. До недавних пор считалось, что связывание AsiA напрямую предотвращает взаимодействие 4-ого района σ^{70} -субъединицы с -35 элементом. Однако нами показано, что 1) комплекс 4-ого района σ^{70} с AsiA способен специфически взаимодействовать с -35 элементом, 2) в присутствии AsiA расстояние между районами 2 и 4 σ^{70} в составе холофермента оказывается неоптимальным для одновременного взаимодействия с -10 и -35 элементами промотора и 3) мутации в β -заслонке или 4-ом районе σ^{70} , которые усиливают или ослабляют взаимодействие между β -заслонкой и районом 4, изменяют (ослабляя или усиливая, соответственно) степень ингибирования транскрипции AsiA, не оказывая влияния на силу связывания AsiA со свободной σ^{70} -субъединицей (Gregory и др., 2004). Другим подобным примером, возможно, является регуляция σ^{28} -зависимой транскрипции у *H. pylori*, которая осуществляется антисигма-фактором, который взаимодействует с β -заслонкой и, по-видимому, нарушает взаимодействие между σ^{28} и β -заслонкой.

Кроме базальных элементов некоторые промоторы содержат дополнительные элементы, которые не являются необходимыми для узнавания промотора, но в определенных условиях могут стимулировать транскрипцию в отсутствие дополнительных белковых факторов. Самым ярким примером служат промоторы рибосомальных РНК, которые содержат усиливающие транскрипцию АТ-богатые последовательности (UP-элементы) в районе -40/-60. В сотрудничестве

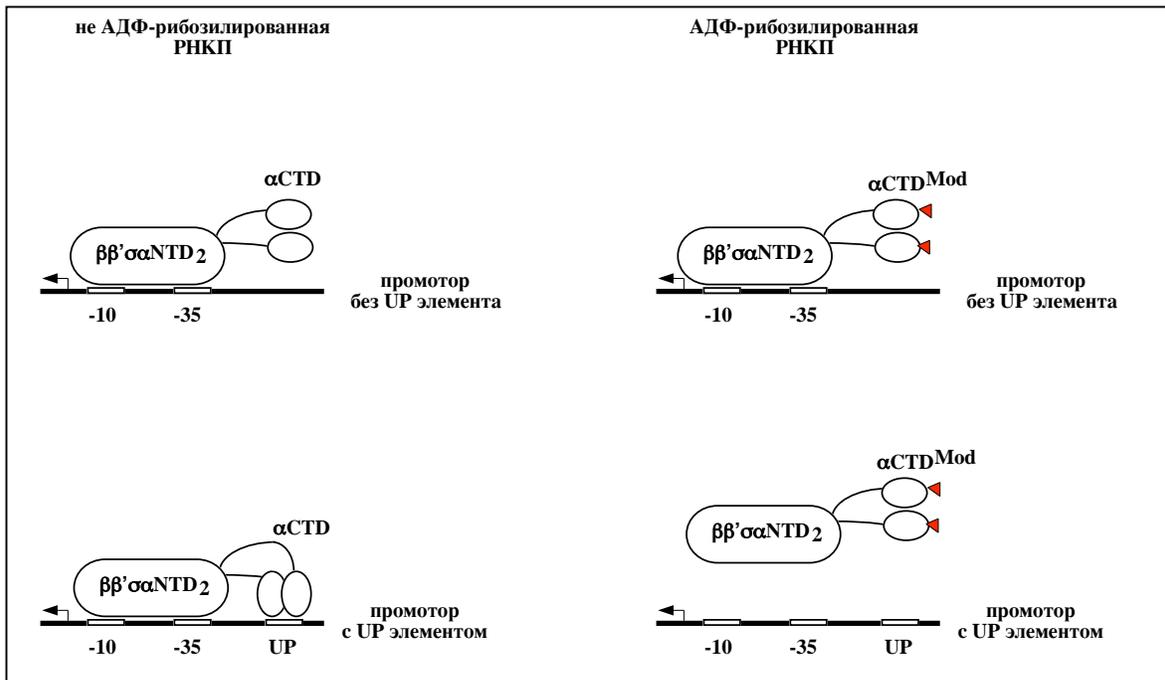


Рис. 5. Механизм изменения промоторной специфичности РНКП при АДФ-рибозилировании αCTD в ходе инфекции бактериофагом T4. Объяснения в тексте.

с лабораторией Ричарда Горса (Richard Gourse) нами было показано, что узнавание UP-элемента и UP-элемент-зависимая активация транскрипции происходит за счет взаимодействия UP-элемента с С-концевым доменом α -субъединицы РНКП (αCTD) (Ross et al., 1993). В условиях экспоненциального роста около 70% общей транскрипции *E. coli* происходит с семи *rrn* промоторов, с которых транскрибируются гены рибосомных РНК. Наличие UP-элементов усиливает

базальную силу каждого из этих промоторов приблизительно в 30 раз. Нами было показано, что АДФ-рибозилирование остатка аргинина в положении 265 α CTD, которое происходит на самых ранних стадиях заражения *E. coli* бактериофагом T4, полностью предотвращает взаимодействие α CTD с UP-элементами (Рис. 5) и, таким образом, резко снижает уровень транскрипции *rrn* промоторов (в то время как транскрипция с промоторов, которые не содержат UP-элементов, остается неизменной). В результате высвобождается большое количество клеточной РНКП, которая может инициировать транскрипцию генов бактериофага, промоторы которого также не содержат UP-элементов. Приведенный пример является единственным описанным на сегодняшний день случаем регуляции специфичности использования промоторов за счет ковалентной модификации РНКП.

Лишь около 3% промоторов *E. coli* содержат выраженные UP-элементы. Однако даже для промоторов, не содержащих UP-элементов (т. е., таких промоторов, для транскрипции с которых не требуется α CTD) неспецифическое взаимодействие α CTD с ДНК в районе -40 - -60 оказывает влияние на образование промоторного комплекса. Показателен в этом смысле пример проделанной нами работы по изучению удлиненного -10 промотора *galP1* (Minakhin и Severinov, 2003). Транскрипция с этого промотора может происходить и в отсутствие 4-ого района σ^{70} , однако, в этом случае необходимо наличие хотя бы одного α CTD. С другой стороны, РНКП, у которой удалены оба α CTD, может инициировать транскрипцию с этого промотора, но только, когда холофермент содержит полноразмерную субъединицу σ^{70} . Таким образом, на этом промоторе взаимодействие района 2.5 σ^{70} -субъединицы с TGn-мотивом оказывается

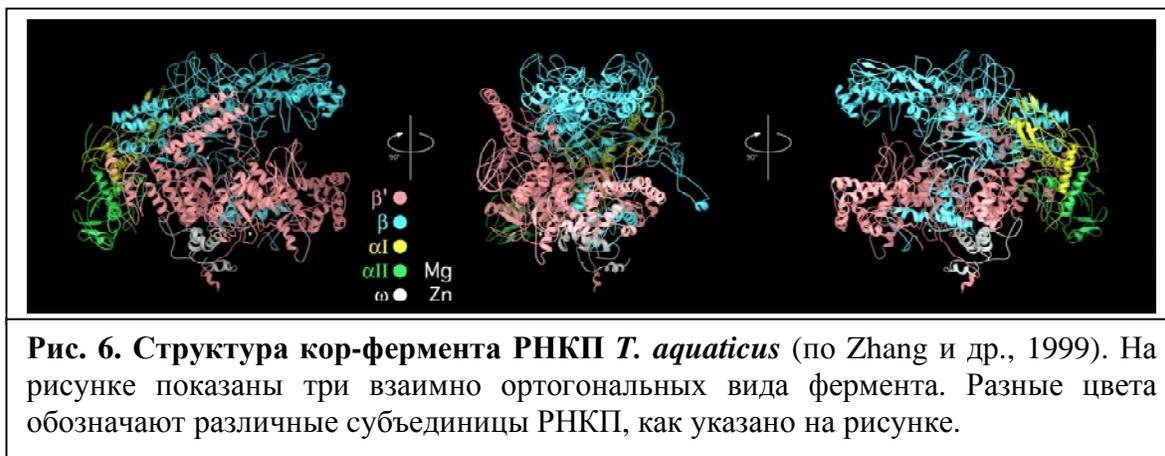
недостаточным для установления прочных контактов между σ^{70} районом 2.4 и -10 элементом, и необходим дополнительный вклад в связывание, природа которого оказывается неважной: и контакты α CTD, и контакты σ^{70} -субъединицы оказываются достаточными для образования промоторного комплекса.

Еще один дополнительный промоторный элемент был недавно охарактеризован в ходе совместной работы с лабораторией Кульбачинского. Было показано, что некодирующая цепь участка ДНК, непосредственно примыкающего к -10 элементу и расположенного со стороны точки начала инициации транскрипции, может взаимодействовать с консервативным районом 1.2 σ -субъединицы и давать РНКП возможность образовывать промоторный комплекс даже в отсутствие -35 элемента. Таким образом, это взаимодействие формально подобно взаимодействию района 2.5 σ с TGn мотивом, который находится на другой стороне -10 элемента. Однако механизмы, с помощью которых эти два дополнительных элемента способствуют образованию промоторных комплексов должны быть различны: мотив TGn, скорее всего, улучшает инициацию плавления ДНК при образовании открытого промоторного комплекса, а элемент, который взаимодействует с районом 1.2 σ , по-видимому, стабилизирует уже полностью «расплавленный» открытый комплекс.

В целом, полученные результаты полностью подтверждают выдвинутую Пташне и сотрудниками теорию «простого привлечения» (simple recruitment) РНКП к промотору, которая постулирует, что самые различные по своим механизмам и модульные по своей природе взаимодействия могут стимулировать

инициацию транскрипции при условии, что эти взаимодействия так или иначе закрепляют РНКП в районе точки транскрипционного старта.

В последние несколько лет появилась масса информации о структурах клеточных РНК-полимераз. Пионерской в этом отношении явилось проведенное в лаборатории Дарста (Darst) определение трехмерной структуры кор-фермента РНКП из *Thermus aquaticus* (Zhang и др., 1999). Нами был внесен существенный



вклад в это исследование. Молекула кор-фермента РНКП *T. aquaticus* по форме напоминает крабовую клешню с внутренним желобом или каналом, проходящим вдоль всей молекулы (между створками клешни, Рис. 6). Одна створка клешни образована преимущественно β -субъединицей, а другая – преимущественно β' -субъединицей. Молекула имеет размеры около 150\AA в длину (от задней стенки до кончиков клешни), 115\AA в высоту и 110\AA в ширину (параллельно каналу). Средний диаметр канала равен приблизительно 27\AA , что достаточно для размещения в нем двуцепочечной нуклеиновой кислоты. В основании канала (на стыке створок клешни) расположен ион Mg^{2+} , прочно связанный в активном центре фермента.

Несколько позднее в лаборатории Корнберга (Kornberg) была получена структура эукариотической РНК-полимеразы II из дрожжей. Общая структура

этого фермента оказалась очень сходна со структурой кор-фермента РНКП *Thermus aquaticus*, а укладка консервативных областей в районе каталитического центра была практически идентичной. Также были получены структуры элонгационного комплекса дрожжевой РНКП II и бактериальных (*T. aquaticus* и *T. thermophilus*) холоферментов. Анализ этих структур позволил подтвердить многие данные, полученные ранее с помощью биохимических и генетических подходов. Например, было прямо подтверждено взаимодействие β -заслонки с 4 районом σ . В трехмерной структуре район 4 σ -субъединицы имеет С-образную форму с карманом, выложенным гидрофобными остатками района 4.1. В холоферменте спираль кончика заслонки находится в этом кармане. Таким образом, заслонка и заякоренный на нее район 4 σ -субъединицы формируют единый мобильный модуль.

Так называемая ДНК-вилка (fork-junction) - содержащий последовательность промотора фрагмент ДНК, находящийся в двуцепочечной форме от -12 положения до -35 элемента и содержащий одноцепочечную нематричную цепь от -11 до -7 положения (-10 элемент) специфически связывается холоферментом, и полученный комплекс по многим своим свойствам подобен нормальному промоторному комплексу. Кристаллическая структура холофермента *T. aquaticus* в комплексе с ДНК-вилкой прояснила механизм связывания холофермента с промоторной ДНК. В полученной структуре все специфические контакты с консенсусными элементами промотора обусловлены σ -фактором, а сама ДНК лежит на внешней стороне полимеразы, совершенно не заходя в ДНК-связывающий канал между клешнями. Изгиб ДНК в районе -35

элемента, индуцированный связыванием района 4 σ изменяет траекторию заднего дуплекса ДНК, приближая его к полимеразе и тем самым делая возможным взаимодействие С-концевых доменов α -субъединиц с UP-элементами ДНК, а также взаимодействие с активаторами, связывающимися дальше –35 элемента.

Анализ рентгенографических структур РНК-полимераз и их комплексов с нуклеиновыми кислотами позволил идентифицировать целый ряд доменов РНКП, которые могли бы участвовать в тех или иных функциях фермента, однако, о функциональной роли которых сведений не имелось. Биохимический анализ РНК-полимераз, у которых такие домены удалены методами направленного мутагенеза, позволяет исследовать функциональную роль того или иного домена. Непрямые, аллостерические эффекты не вполне «точных» делеций отдельных доменов РНКП могут сильно затруднить интерпретацию свойств мутантных ферментов. Поэтому крайне желательно использовать в качестве объекта для мутагенеза РНКП бактерий рода *Thermus*, т. к. структура РНКП из этих бактерий известна. Однако до недавнего времени генетические системы, которые позволяли бы исследовать РНКП из этих организмов, отсутствовали. Нами были созданы экспрессионные плазмиды *E. coli*, которые одновременно сверхпродуцировали все субъединицы кор-фермента РНКП *T. aquaticus* (Minakhin и др., 2001, Kuznedelov и др., 2003). Полученная из *E. coli* рекомбинантная РНКП *T. aquaticus* была высоко активна и образовывала дифрагирующие кристаллы (Kuznedelov и др., 2005). Таким образом, была получена возможность не только направленно изменять практически любые, интересующие нас участки РНКП, и исследовать мутантные ферменты в функциональных тестах, но и проводить структурный анализ мутантов.

В структуре комплекса холофермента с ДНК-вилкой два структурных элемента β' -субъединицы - т. н., цинк-связывающий домен и молния (zipper) – контактируют с ДНК промоторного спейсера (Рис. 8). Для выяснения

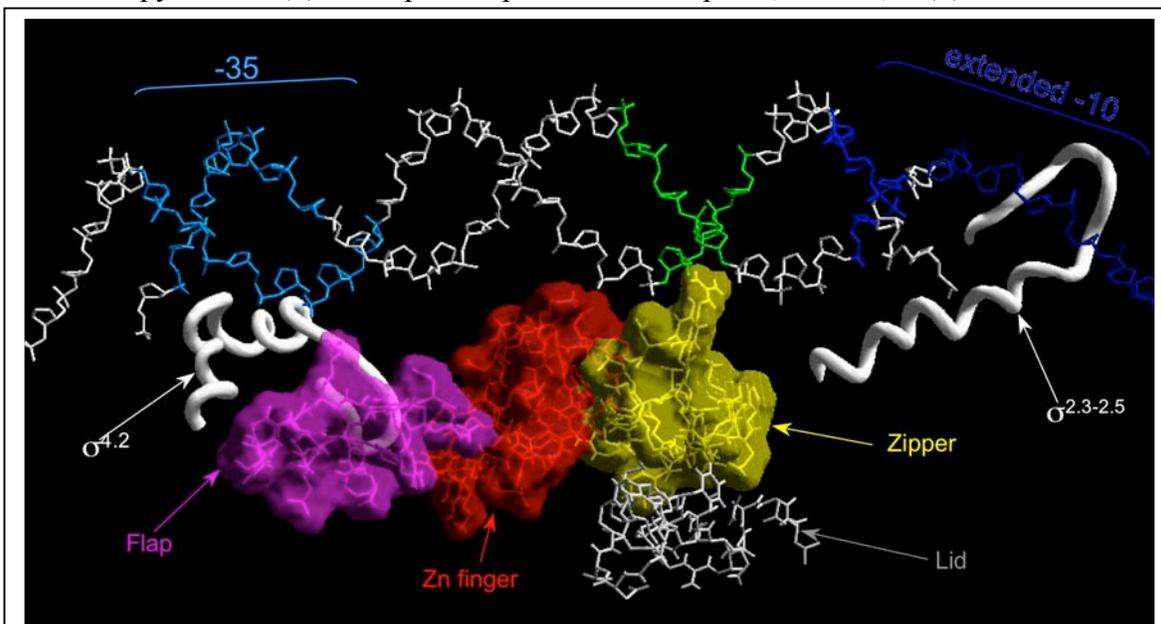


Рис. 7. Структурные элементы кор-фермента РНКП, которые взаимодействуют с ДНК промоторного спейсера (по структуре комплекса холофермента РНКП *T. aquaticus* с ДНК-вилкой) На рисунке показана ДНК-вилка, с обозначенными промоторными элементами, а также структурные элементы σ , σ и σ' -субъединиц, которые находятся в непосредственной близости от нее в структуре комплекса.

функциональной роли этих элементов в образовании промоторных комплексов были получены РНКП, не содержавшие цинк-связывающего домена или молнии, и изучено взаимодействие мутантных холоферментов с промоторами *in vitro*. Изучение фермента, не содержавшего цинк-связывающего домена, не выявило каких-либо качественных отличий от фермента дикого типа. Таким образом, цинк-связывающий домен β' -субъединицы не принимает участие в специфическом взаимодействии с ДНК, по крайней мере, на стадии инициации транскрипции. С другой стороны, изучение фермента, не содержавшего молнии, привело к интересным результатам. Выше уже упоминалось, что имеющиеся данные

позволяют утверждать, что -10 элемент можно считать единственным действительно необходимым элементом бактериальных промоторов. Остальные элементы: -35 элемент, UP элементы, TGn-мотив или участок, взаимодействующий с районом 1.2 σ -субъединицы, следует рассматривать как вспомогательные, роль которых проявляется особенно ярко, когда последовательность -10 элемента далека от оптимальной. В ходе изучения сильного промотора -10/-35 класса T7 A1 бактериофага T7 нами было показано, что -10 элемент этого промотора достаточен для узнавания РНКП, несмотря на то, что все остальные известные дополнительные элементы отсутствуют. Однако РНКП, не содержащая β' -молнии, была не способна транскрибировать с мутантного T7 A1 промотора, который содержал консенсусный -10 элемент и не содержал никаких известных дополнительных элементов. В ходе проведенных исследований было показано, что взаимодействие β' -молнии с участком ДНК между положениями -22 и -18 необходимо для образования промоторного комплекса и транскрипции с мутантного T7 A1 промотора. Результаты дополнительного анализа с использованием производных мутантного T7 A1 промотора, у которых систематически удалялись все большие участки ДНК «выше» элемента -10 показало, что взаимодействие β' -молнии с ДНК промоторного спейсера важно лишь тогда, когда не происходит специфического взаимодействия 4-ого района σ с -35 элементом. Для объяснения этого явления мы предполагаем, что одновременное взаимодействие 4-ого района σ и β' -молнии со своими ДНК-мишенями невозможно, скорее всего по стерическим соображениям. Далее, мы предполагаем, что могут существовать регуляторы транскрипции, которые

ослабляют взаимодействие 4-ого района σ с -35 элементом, но зато усиливают взаимодействие β' -молнии с ДНК промоторного спейсера. Поиски таких регуляторов ведутся в настоящее время. Возможно, что ранее упомянутый белок AsiA, который ингибирует транскрипцию с большинства промоторов, но в некоторых случаях выступает как активатор, действует по такому механизму.

Во всех описанных выше примерах σ -субъединица осуществляла специфические взаимодействия с базальными элементами промоторов, а роль различных элементов кор-фермента проявлялась в тех случаях, когда взаимодействия были неоптимальны. Однако, по-видимому, σ -субъединица способна также играть важную роль в инициации транскрипции, даже тогда, когда она не участвует во взаимодействии с базальными промоторными элементами. Примером этому служит изученный нами процесс синтеза праймера репликации бактериофага M13, который осуществляется σ^{70} -холоферментом РНКП *E. coli* (Zenkin и Severinov, 2004). Аналогичный механизм синтеза праймера используется некоторыми другими фагами, имеющими в цикле размножения одноцепочечную форму, а также F-фактором и некоторыми плазмидами.

Геном бактериофага M13 - одноцепочечная кольцевая ДНК. При попадании в клетку *E. coli* эта ДНК узнается σ^{70} -холоферментом, который синтезирует на ней короткую (15-20 нуклеотидов) РНК. Эта РНК (пРНК) служит праймером для ДНК-полимеразы III, которая синтезирует вторую цепь ДНК, с образованием двуцепочечной формы генома бактериофага. σ^{70} -холофермент специфически узнает участок одноцепочечного генома M13, называемый участком начала репликации «-» цепи (VHP). Последовательность VHP содержит 2 палиндромных

повтора, которые могут формировать 2 шпильки. Расположенные друг против друга эти шпильки формируют подобие фрагмента двуцепочечной ДНК. Начало синтеза праймера происходит в стебле правой шпильки и заканчивается в ее петле. Так как синтез праймера абсолютно зависим от присутствия σ^{70} , считалось, что псевдодвуцепочечная структура *UHP* функционирует, как бактериальный промотор. Действительно, анализ нуклеотидной последовательности *UHP* позволил выделить участки последовательности, которые было похоже на -10 и -35 элементы промотора и находились на правильном расстоянии от точки начала синтеза пРНК (Рис. 8).

Для того, чтобы определить детерминанты специфического узнавания *UHP* холоферментом РНКП, нами был идентифицирован минимальный фрагмент одноцепочечного генома M13, на котором может быть осуществлен синтез пРНК. В качестве исходного фрагмента использовали 128-нуклеотидный фрагмент, который содержал оба палиндромных повтора *UHP* и специфически узнавался РНКП (фрагмент 1, Рис. 8). Чтобы проверить роль предполагаемого -35 элемента, была удалена содержащая его левая шпилька *UHP*. Оказалось, что 50-нуклеотидный фрагмент без левой шпильки (фрагмент 2, Рис. 8), эффективно использовался холоферментом для синтеза пРНК, указывая на то, что предполагаемый -35 элемент не важен для узнавания *UHP* и синтеза пРНК. Еще более удивительным оказалось то, что удаление области, содержащей предполагаемый -10 элемент (фрагмент 3, Рис. 8), также не повлияло на транскрипцию пРНК. Дальнейший анализ привел к получению минимального фрагмента *UHP* длиной в 33 нуклеотида, который был способен поддерживать

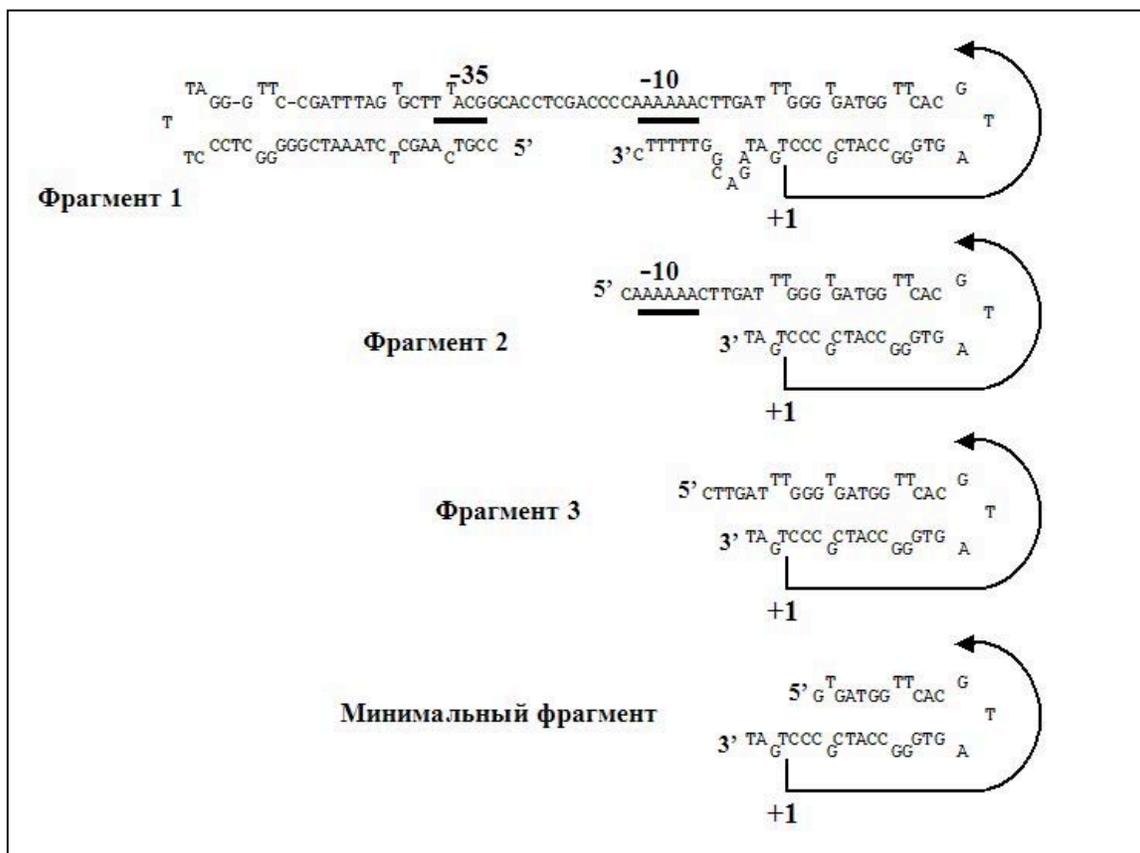


Рис. 8. Фрагменты УНР фага М13, функционирующие как матрицы для синтеза пРНК. Фрагменты показаны в виде предполагаемой шпильчатой структуры. Изогнутой стрелкой обозначена пРНК, точка старта транскрипции отмечена как «+1». Черные отрезки обозначают предполагаемые -10 и -35 промоторные элементы.

синтез пРНК (Рис. 8). Этот фрагмент может быть уложен в несовершенную шпильку длиной 12 пар оснований с трехнуклеотидной петлей и шестинуклеотидным одноцепочечным участком на 3'-конце. Укорочение минимального 33-нуклеотидного фрагмента с 5'- или 3'-конца хотя бы на один нуклеотид приводило к полному отсутствию синтеза пРНК. Так как синтез пРНК с минимального фрагмента УНР полностью зависел от наличия σ^{70} -субъединицы, приходится признать, что ни -10, ни -35 области не играют роли в узнавании УНР,

и σ^{70} -зависимое узнавание происходит по какому-то иному механизму, нежели узнавание промоторов.

Кор-фермент и холофермент одинаковым образом защищали фрагмент 1 *UHP* от расщепления ДНКазой I. Таким образом, кор-фермент взаимодействует с *UHP*, но неактивен в синтезе пРНК. Следовательно, σ^{70} -субъединица становится важна только на стадии синтеза пРНК и не играет роли в узнавании *UHP*. Эта ситуация крайне необычна, так как считалось, что σ^{70} -субъединица необходима лишь для узнавания промотора и формирования промоторного комплекса а в синтезе РНК не участвует.

Разделение продуктов транскрипции с *UHP* в высокопроцентных гелях показало, что кор и холофермент синтезируют сравнимые количества дунуклеотидного abortивного продукта pppArG, однако только холофермент способен синтезировать полноразмерную пРНК. Таким образом, отсутствие синтеза пРНК корферментом не связано с его неспособностью инициировать транскрипцию; кор не может синтезировать пРНК, потому что он не может удлинять abortивные продукты далее второго нуклеотида.

Каким образом σ^{70} позволяет холоферменту перейти от abortивной инициации к элонгации? Одна из возможностей - это то, что σ -субъединица понижает сродство РНКП к нуклеозидтрифосфатам - субстратам реакции транскрипции. Однако, так как кор-фермент не синтезировал пРНК даже в присутствии очень высоких концентраций нуклеотидов, σ^{70} по-видимому участвует в переходе от инициации к элонгации пРНК каким-то другим образом.

Результаты химических сшивок показывают, что район 3.2 σ^{70} -субъединицы находится вблизи каталитического центра РНКП и может контактировать с 5'-концом коротких транскриптов (Severinov и др., 1994). В структуре холофермента район образует 3.2 линкерный домен, который выпетливается внутрь главного канала РНКП и почти что дотягивается до каталитического центра фермента. Линкерный домен мог бы стабилизировать связывание коротких абортивных транскриптов, делая возможным их удлинение. Чтобы проверить это предположение, синтез пРНК инициировали с ApG - динуклеотида, который могут синтезировать и кор- и холоферменты, или с ApGpG - тринуклеотида, который может синтезировать только холофермент. Оказалось, что кор-фермент приобретал способность синтезировать пРНК при использовании тринуклеотида в качестве затравки. Таким образом, σ^{70} -субъединица перестает быть необходимой для синтеза пРНК после того, как сформирована вторая фосфодиэфирная связь.

Синтез пРНК не наблюдался, при использовании холофермента, реконструированного из мутантной σ^{70} -субъединицы, у которой отсутствовал район 3.2, хотя мутантный фермент был активен на промоторе T7 A1. Таким образом, полученные результаты действительно согласуются с гипотезой, что район 3.2 σ^{70} -субъединицы необходим для синтеза пРНК потому, что взаимодействуя с новосинтезированным динуклеотидом и стабилизируя его связывание, он способствует дальнейшему удлинению транскрипта. В случае транскрипции с T7 A1, такая стабилизация очевидно несущественна для перехода из инициации в элонгацию.

Из приведенных выше данных следует, что кор-фермент специфически узнает *УНР* без помощи σ^{70} -субъединицы. Скорее всего, место связывания *УНР* находится в той части канала РНКП, где при нормальной транскрипции связывается передний дуплекс ДНК. Аминокислотные остатки 1149-1190 β' -субъединицы *E. coli* образуют отдельный домен, выступающий в эту часть канала (Рис. 9). Холофермент, несущий делецию этих остатков β' -субъединицы ($\Delta 1149-1190$), активен на стандартном промоторе (T7 A1), но не способен осуществлять синтез пРНК с *УНР*, что указывает на то, что этот район канала участвует в узнавании *УНР* или в поддержании стабильности комплекса. Более того, клетки *E. coli*, ген *rpoC* которых несет делецию кодонов 1149-1190 непермисивны для фага

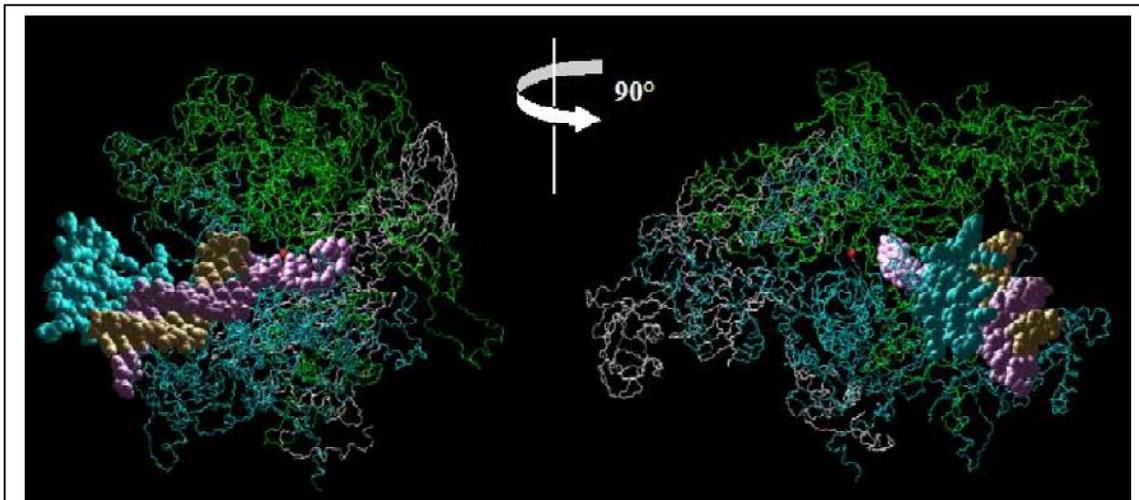


Рис. 9. Структурное моделирование связывания минимального фрагмента *УНР* кор-ферментом. Показаны две проекции, отличающиеся поворотом на 90° вокруг вертикальной оси. Светло-зеленым и бирюзовым показаны β - и β' -субъединицы, соответственно, розовым и оранжевым – матричная и нематричная цепи шпильки, соответственно, петля шпильки не показана. Шариками показаны цепи ДНК и домен β' -субъединицы, отсутствующий в полимеразе $\Delta 1149-1190$.

М13. С другой стороны, белок *gp2* бактериофага T7, который взаимодействует с РНКП прочно связываясь с β' -субъединицей в районе аминокислотных остатков

1149-1190 (Nechaev и Severinov, 1999) предотвращает узнавание *УНР* как кор-ферментом, так и холоферментом. Таким образом, специфическое связывание *УНР* по-видимому осуществляется в той части канала, которая в норме занимается передним дуплексом ДНК. На Рис. 9 приведена структурная модель комплекса минимального фрагмента с кор-ферментом. Шпилька *УНР* помещена в канал, связывающем передний дуплекс ДНК при элонгации, а также в открытом комплексе во время инициации транскрипции. Как видно, домен β' -субъединицы, отсутствующий в полимеразе Δ 1149-1190 (выделен зелеными шариками), находится в непосредственной близости от шпильки *УНР*, подтверждая гипотезу о том, что этот домен участвует в узнавании или стабилизации комплекса РНКП с *УНР* фага M13.

Вопрос о специфичности взаимодействий между передним дуплексом ДНК и доменом, образованным аминокислотными остатками 1149-1190 β' -субъединицы, остается открытым. В этой связи интересно отметить, что вышеупомянутый белок *gr2*, который связывается с этим доменом β' -субъединицы, и, следовательно, не может напрямую влиять на взаимодействие β' -субъединицы с базальными промоторными элементами, проявляет значительную промоторную специфичность ингибирования образования промоторного комплекса (Nechaev и Severinov, 1999). Возможно, эта специфичность объясняется различной силой взаимодействия между местом связывания *gr2* и передним дуплексом ДНК на разных промоторах.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что взаимодействие α STD с UP-элементами промоторов является мишенью АДФ-рибозилирования бактериофагом T4. АДФ-рибозилирование бактериофагом T4 α STD таким образом является «антиактивационным» регулированием транскрипции за счет ковалентной модификации кор-фермента РНК-полимеразы.
2. Охарактеризована роль подвижной заслонки β -субъединицы РНК-полимеразы в узнавании промоторов и предложен молекулярный механизм, объясняющий изменение промоторной специфичности голофермента РНК-полимеразы бактерий за счет изменения конформации подвижной заслонки.
3. Показано, что транскрипционный фактор AsiA регулирует утилизацию промоторов нарушая взаимодействие подвижной заслонки с четвертым районом σ^{70} -субъединицы.
4. Охарактеризован дополнительный базальный элемент бактериальных промоторов, который находится между транскрипционным стартом и -10 элементом и узнается консервативным районом 1.2 σ -субъединицы.
5. Показана роль β' -молнии в узнавании промоторного спейсера между -10 и -35 элементами промоторов.
6. Показана роль нижней челюсти β' -субъединицы во взаимодействии с двуцепочечной ДНК ниже точки транскрипционного старта.

7. Определен молекулярный механизм изменения промоторной специфичности голофермента РНК-полимеразы *E. coli* при связывании белка gp2 бактериофага T7.
8. Определена первичная структура генов *rpo Thermus aquaticus*.
9. Определена третичная структура кор-фермента РНК-полимеразы *T. aquaticus*.
9. Создана генетическая система, позволяющая проводить функциональные и структурные исследования рекомбинантной РНК-полимеразы *T. aquaticus* и ее мутантных производных.
10. Определен молекулярный механизм узнавания участка начала репликации минус цепи бактериофага M13. Показано, что это узнавание является независимым от σ^{70} -субъединицы и осуществляется кор-ферментом РНК-полимеразы за счет взаимодействия с каналом кор-фермента, ответственным за связывание переднего дуплекса ДНК. Кор-фермент способен специфически инициировать abortивный синтез на участке начала репликации M13, а для образования более длинных транскриптов необходим район 3.2 σ^{70} -субъединицы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Обзоры

1. Tang, H., Kim, Y., **Severinov, K.**, Goldfarb, A., and Ebright, R. H. (1996) *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme: Rapid reconstitution from recombinant α , β , β' , and σ subunits. *Methods Enzymol.*, **273**, 130-134
2. Kashlev, M., Nudler, E., **Severinov, K.**, Borukhov, S., Komissarova, N., and Goldfarb, A. (1996) Histidine-tagged RNA polymerase of *Escherichia coli* and transcription in solid phase. *Methods Enzymol.*, **274**, 326-334
3. Darst, S. A., Roberts, J. W., Malhotra, A., Marr, M., **Severinov, K.**, and Severinova, E. (1997) Pribnow box recognition and melting by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids & Mol. Biol.* (F. Ekstein & D. Lilley, eds.) **11**, Springer, (London), 27-40

4. **Severinov, K.** (2000) RNA polymerase structure/function: Insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 118-125
5. Severinov, K. (2001) T7 RNA polymerase elongation complex: What you see is not what you get. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 5-7
6. Borukhov, S. and **Severinov, K.** (2002) Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res. Microbiol.*, **153**, 557-562
7. Nechaev, S. and **Severinov, K.** (2003) Bacteriophage-induced modifications of host RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 301-322
8. Kuznedelov, K., Minakhin, L., and **Severinov, K.** (2003) Preparation and characterization of recombinant *Thermus aquaticus* RNA polymerase. *Methods Enzymol.*, **370**, 94-108
9. Nechaev, S., Imburgio, D., and **Severinov, K.** (2003) Purification and characterization of bacteriophage-encoded inhibitors of host RNA polymerase: T-odd phage gp2-like proteins. *Methods Enzymol.*, **370**, 212-225
10. Wigneshweraraj, S. R., Nechaev, S., Bordes, P., Jones, S., Cannon, W., **Severinov, K.**, and Buck, M. (2003) Enhancer-dependent transcription by σ^{54} -RNAP: the β subunit dispensable region 1 is used by σ^{54} in open complex formation. *Methods Enzymol.*, **370**, 646-657
11. Mustaev, A., Zaychikov, E., Grachev, M., Kozlov, M., **Severinov, K.**, Epshtein, V., Korzheva, N., Bereshchenko, O., Markovtsov, V., Lukhtanov, V., Tsarev, I., Maximova, T., Kashlev, M., Bass, I., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (2003) Studies of methods of cross-linking of RNA polymerase active center. *Methods Enzymol.*, **371**, 191-206
12. Phadtare, S., **Severinov, K.**, and Inouye, M. (2003) Assay of transcription antitermination by proteins of the CspA family. *Methods Enzymol.*, **371**, 460-471
13. Minakhin, L. and **Severinov, K.** (2005) Transcription regulation by bacteriophage T4 AsiA. *Prot. Expr. Purif.*, **41**, 1-8
14. Зоров, С. Д., Юзенкова, Ю. В., Северинов, К. В. (2006) Низкомолекулярные ингибиторы бактериальной РНК-полимеразы. *Мол. Биол.*, **40**, 1-12
15. Павлова, О. А., Северинов, К. В. (2006) Пост-трансляционно модифицированные микроцины. *Генетика*, **11**, 1-11

Статьи:

16. Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, K., Ishihama, A., **Severinov, K.**, and Gourse, R. L. (1993) A third recognition element in prokaryotic promoters: Site-specific DNA binding by the α subunit of RNA polymerase. *Science*, **262**, 1407-1413
17. **Severinov, K.**, Kashlev, M., Severinova, E., Bass, I., McWilliams, K., Kutter, E., Nikiforov, V., Snyder, L., and Goldfarb, A. (1994) A non-

- essential domain of *E. coli* RNA polymerase required for the action of the termination factor Alc. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14254-14259
18. **Severinov, K.**, Soushko, M., Goldfarb, A., and Nikiforov, V. (1994) Rif^R mutations in the beginning of *Escherichia coli rpoB* gene. *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 120-126
 19. **Severinov, K.**, Fenyö, D., Severinova, E., Mustaev, A., Chait, B. T., Goldfarb, A., and Darst, S. A. (1994) The σ -subunit conserved region 3 is part of the "5'-face" of the active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20826-20828
 20. Mustaev, A., Zaychikov, E., **Severinov, K.**, Kashlev, M., Polyakov, A., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (1994) Topology of RNA polymerase active center probed by chimerical rifampicin-nucleotide compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12036-12040
 21. **Severinov, K.** and Goldfarb, A. (1994) Topology of the product binding site in RNA polymerase revealed by transcript slippage at the phage λ P_L promoter. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31701-31705
 22. Tang, H., **Severinov, K.**, Goldfarb, A., Fenyö, D., Chait, B. T., and Ebright, R. (1994) Identification of a transcription activation target on RNA polymerase: Mutants of RNA polymerase alpha subunit specifically defective in transcription activation at class I CAP-dependent promoters. *Genes & Dev.*, **8**, 3058-3067
 23. **Severinov, K.**, Mustaev, A., Severinova, E., Bass, I., Kashlev, M., Landick, R., Nikiforov, V., Goldfarb, A., and Darst, S. A. (1995) Assembly of functional *Escherichia coli* RNA polymerase using β subunit fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4591-4595
 24. Tang, H., **Severinov, K.**, Goldfarb, A., and Ebright, R. (1995) Rapid RNA polymerase genetics: One-day, no-column preparation of reconstituted recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4902-4906
 25. Tinker, R. L., Sanders, G. M., **Severinov, K.**, Kassavetis, G. A., and Geiduschek, E. P. (1995) The COOH-terminal domain of the RNA polymerase α subunit in transcriptional enhancement and deactivation at the bacteriophage T4 late promoter. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15899-15907
 26. **Severinov, K.**, Markov, D., Nikiforov, V., Severinova, E., Landick, R., Darst, S. A., and Goldfarb, A. (1995) Streptolydigin-resistant mutants in an evolutionary conserved region of the β' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23926-23929
 27. **Severinov, K.**, Mustaev, A., Severinova, E., Kozlov, M., Darst, S. A., and Goldfarb, A. (1995) The β subunit Rif-cluster I is only angstroms away from the active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29428-29432
 28. Liu, K., Zhang, K., **Severinov, K.**, Das, A., and Hanna, M. (1996) Modulation of pausing, termination and antitermination in *E. coli* by elongation factor NusA: Role of RNA polymerase alpha subunit. *EMBO J.*, **15**, 150-161

29. Heyduk, T., Heyduk, E., **Severinov, K.**, Tang, H., and Ebright, R. H. (1996) Rapid epitope mapping by hydroxyl-radical protein footprinting: determinants of RNA polymerase alpha subunit for interaction with beta, beta' and sigma subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10162-10166
30. **Severinov, K.**, Mustaev, A., Kukarin, A., Muzzin, O., Bass, A., Darst, S. A., and Goldfarb, A. (1996) Structural modules of the largest subunits of RNA polymerase: Introducing archaebacterial and chloroplast split sites in the β and β' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 27969-27974
31. Severinova, E., **Severinov, K.**, Fenyö, D., Chait, B. T., Brody, E. T., and Darst, S. A. (1996) Domain organization of the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **263**, 637-647
32. Wang, Y., **Severinov, K.**, Loizos, N., Fenyö, D., Heyduk, E., Heyduk, T., Chait, B. T., and Darst, S. A. (1997) Determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase assembly within the β subunit. *J. Mol. Biol.*, **270**, 648-662
33. Wang, D., **Severinov, K.**, and Landick, R. (1997) Preferential interaction of the his pause RNA hairpin with RNA polymerase beta subunit residues 904-950 correlates with strong transcriptional pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8433-8438
34. **Severinov, K.**, Mooney, R., Darst, S. A., and Landick, R. (1997) Tethering of the largest subunits of *E. coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24137-24140
35. **Severinov, K.** and Darst, S. A. (1997) A mutant RNA polymerase that forms unusual promoter complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13481-13486
36. Severinova, E., **Severinov, K.**, and Darst, S. A. (1998) Inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by T4 AsiA. *J. Mol. Biol.*, **279**, 9-18
37. Muzzin, O., Campbell, E. A., Xia, L., Severinova, E., Darst, S. A., and **Severinov, K.** (1998) Disruption of *Escherichia coli* HepA, an RNA polymerase associated protein, causes UV sensitivity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15157-15182
38. **Severinov, K.** and Muir, T. (1998) Expressed protein ligation: A novel method to study protein-protein interactions in transcription. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16205-16209
39. Zakharova, N., Hoffman, P. S., Berg, D. E., and **Severinov, K.** (1998) The largest subunits of RNA polymerase from gastric helicobacters are tethered. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19371-19374
40. Zakharova, N., Bass, A., Arsenieva, E., Nikiforov, V., and **Severinov, K.** (1998) Mutations in and monoclonal antibody binding to evolutionary hypervariable region of *E. coli* RNA polymerase β' subunit inhibit transcript cleavage and transcript elongation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24912-24920
41. Bae, W., Phadtare, S., **Severinov, K.**, and Inouye, M. (1999) Characterization of *Escherichia coli* *cspA*, whose product negatively regulates transcription of *cspA*, the gene for the major cold-shock protein. *Mol. Microbiol.*, **31**, 1429-1442
42. Raudonikiene, A., Zakharova, N., Su, W. W., Jeong, J.-Y., Bryden, L., Hoffman, P. S., Berg, D. E., and **Severinov, K.** (1999) *Helicobacter pylori*

- with separate β and β' subunits of RNA polymerase is viable and can colonize conventional mice. *Mol. Microbiol.*, **32**, 131-138
43. Nedeá, E. C., Markov, D., Naryshkina, T., and **Severinov, K.** (1999) Localization of *E. coli rpoC* mutations that affect RNA polymerase assembly and activity at high temperature. *J. Bacteriol.*, **181**, 2663-2665
 44. Zakharova, N., Paster, B. J., Wesley, I., Dewhirst, F. E., Berg, D. E., and **Severinov, K.** (1999) Fused and overlapping *rpoB* and *rpoC* genes in Helicobacters, Campylobacters and related bacteria. *J. Bacteriol.*, **181**, 3857-3859
 45. Nechaev, S. and **Severinov, K.** (1999) Inhibition of *E. coli* RNA polymerase by bacteriophage T7 gene 2 protein. *J. Mol. Biol.*, **289**, 815-826
 46. Lohrke, S. M., Nechaev, S., Yang, H., **Severinov, K.**, and Jin, S. (1999) Transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene promoters in *Escherichia coli* requires the *rpoA* gene from *A. tumefaciens* encoding the α subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.*, **181**, 4533-4539
 47. Markov, D., Naryshkina, T., Mustaev, A., and **Severinov, K.** (1999) A zinc binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes & Devl.*, **13**, 2439-2448
 48. Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., **Severinov, K.**, and Darst, S. A. (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, **98**, 811-824
 49. Sharp, M. M., Chan, C. L., Lu, C. Z., Marr, M. T., Nechaev, S., Merritt, E. W., **Severinov, K.**, Roberts, J. W., and Gross, C. A. (1999) The sigma interface with core RNA polymerase is extensive, functionally specialized, and conserved. *Genes & Devl.*, **13**, 3015-3026
 50. Opalka, N., Weilbaecher, R., Richter, C., **Severinov, K.**, Landick, R., and Darst, S. A. (2000) Direct localization of a β subunit domain on the three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 617-622
 51. Brodolin, K., Mustaev, A., **Severinov, K.**, and Nikiforov, V. (2000) Identification of RNA polymerase β' subunit segment contacting the melted region of the *lacUV5* promoter. *J. Biol. Chem.*, **275**, 3661-3666
 52. Bae, W., Xia, B., Inouye, M., and **Severinov, K.** (2000) *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7784-7789
 53. Nechaev, S., Chlenov, M., and **Severinov, K.** (2000). Dissection of two hallmarks of the open promoter complex by mutation in RNA polymerase core subunit. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25516-25522
 54. Naryshkina, T., Rogulja, D., Golub, L., and **Severinov, K.** (2000) Inter- and intrasubunit interactions during the formation of RNA polymerase assembly intermediate. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31183-31190
 55. Mah' T.-F., Kuznedelov, K., Mushegian, A., **Severinov, K.**, and Greenblatt, J. (2000) The α subunit of *E. coli* RNA polymerase activates RNA-binding by NusA. *Genes & Devl.* **14**, 2664-2675

56. Minakhin, L., Nechaev, S., Campbell, E. A., and **Severinov, K.** (2001) Recombinant *Thermus aquaticus* RNA polymerase-A new tool for structure-based analysis of transcription. *J. Bacteriol.*, **183**, 71-76
57. Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., and **Severinov, K.** (2001) Bacterial RNA polymerase subunit ω and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 892-897
58. Minakhin, L., Camarero, J. A., Holford, M., Parker, C., Muir, T., and **Severinov, K.** (2001) Mapping the molecular interface between the σ^{70} subunit of *E. coli* RNA polymerase and T4 AsiA. *J. Mol. Biol.*, **306**, 631-642
59. Naryshkina, T., Mustaev, A., Darst, S. A., and **Severinov, K.** (2001) The β' subunit of *E. coli* RNA polymerase is not required for interaction with initiating nucleotide but is necessary for interaction with rifampicin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 13308-13313
60. Gruber, T., Markov, D., Sharp, M., Young, B., Lu, C. Z., Zhong, H. J., Artsimovitch, I., Geszvain, K., Arthur, T., Burgess, R. R., Landick, R., **Severinov, K.**, and Gross, C. A. (2001) Binding of the initiation factor σ^{70} to core RNA polymerase is a multistep process. *Mol. Cell*, **8**, 21-31
61. Kuznedelov, K., Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Dove, S. L., Rogulja, D., Nickels, B. E., Hochschild, A., Heyduk, T., and **Severinov, K.** (2002) The RNA polymerase core flap domain triggers conformational switch in the σ subunit to allow promoter recognition. *Science*, **295**, 855-857
62. Phadtare, S., Inouye, M., and **Severinov, K.** (2002) The nucleic acid melting activity of *Escherichia coli* CspE is critical for transcription antitermination and cold-acclimation of cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7239-7245
63. Kuznedelov, K., Korzheva, N., Mustaev, A., and **Severinov, K.** (2002) Structure-based analysis of RNA polymerase function: the largest subunit' rudder contributes critically to the elongation complex stability and is not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length. *EMBO J.*, **21**, 1369-1378
64. Wigneshweraraj, S. R., Nechaev, S., **Severinov, K.**, and Buck, M. The β subunit residues 186-433 and 436-445 are commonly used by σ^{54} and σ^{70} RNA polymerase holoenzyme for open promoter complex formation. *J. Mol. Biol.*, **319**, 1067-1083
65. Nechaev, S., Yuzenkova, Y., Niedziela-Majka, A., Heyduk, T., and **Severinov, K.** (2002) A novel bacteriophage-encoded RNA polymerase binding protein inhibits transcription initiation and abolishes transcription termination by host RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **320**, 11-22
66. Phadtare, S., Tyagi, S., Inouye, M., and **Severinov, K.** (2002) Three amino acids in *Escherichia coli* CspE surface-exposed aromatic patch are critical for nucleic acid melting activity leading to transcription antitermination and cold-acclimation of cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 46706-46711
67. Yuzenkova, Y., Delgado, M., Nechaev, S., Savalia, D., Epshtein, V., Artsimovitch, I., Landick, R., Farias, R. N., Salomon, R., and **Severinov, K.** (2002) Mutations leading to microcin J25 resistance affect evolutionary

- conserved residues in the secondary channel of bacterial RNA polymerase *J. Biol. Chem.*, **277**, 50867-50875
68. Wigneshweraraj, S. R., Kuznedelov, K., **Severinov, K.**, and Buck, M. (2003) Multiple roles for the RNAP β subunit flap domain in sigma 54 dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, **278**, 3455-3465
 69. Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Kuznedelov, K., Adelman, K., Heyduk, T., and **Severinov, K.** (2003) Interaction of T4 AsiA with its target sites in the RNA polymerase σ^{70} subunit leads to distinct and opposite effects on transcription. *J. Mol. Biol.*, **326**, 679-690
 70. Yuzenkova, Y., Nechaev, S., Berlin, J., Rogulja, D., Kuznedelov, K., Schloss, M., Inman, R., Mushegian, R., and **Severinov, K.** (2003) Genome of *Xanthomonas oryzae* bacteriophage Xp10: an odd T-odd phage. *J. Mol. Biol.*, **330**, 735-748
 71. Minakhin, L., and **Severinov, K.** (2003) On the role of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} region 4.2 and α subunit C-terminal domains in promoter complex formation on the extended -10 *galP1* promoter. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29710-29718
 72. Burrows, P. C., **Severinov, K.**, Ishihama, A., Buck, M., and Wigneshweraraj, S. R. (2003) Mapping σ^{54} -RNAP interactions at the -24 consensus promoter element. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29728-29743
 73. Naryshkina, T., Bruning, A., Gadai, O., and **Severinov, K.** (2003). The role of the second-largest RNA polymerase I subunit Zn-binding domain in the enzyme assembly. *Eukaryot. Cell*, **2**, 1046-1052
 74. Phadtare, S., Hwang, J., **Severinov, K.**, and Inouye, M. (2003) CspB and CspL, thermostable cold-shock proteins from *Thermotoga maritima*. *Genes Cells*, **8**, 801-810
 75. Wilson, K.-A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B. T., Landick, R., Muir, T., **Severinov, K.**, and Darst, S. A. (2003) The structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12475-12483
 76. Zakharova, M., Minakhin, L., Solonin, A., and **Severinov, K.** (2004) Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA. *J. Mol. Biol.*, **335**, 103-111
 77. Phadtare, S., Inouye, M., and **Severinov, K.** (2004) The mechanism of nucleic acid melting by a CspA family protein. *J. Mol. Biol.*, **337**, 147-155
 78. Zenkin, N. and **Severinov, K.** (2004) The role of RNA polymerase σ subunit in promoter-independent initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4396-4400
 79. Gregory, B., Nickels, B. E., Garrity, S., Severinova, E., Minakhin, L., Bieber Urbauer, R. J., Urbauer, J. L., Heyduk, T., **Severinov, K.**, and Hochschild, A. (2004) A regulator that inhibits transcription by targeting an intersubunit interaction of the RNA polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4554-4559
 80. Adelman, K., Yuzenkova, J., La Porta, A., Zenkin, N., Lee, J., Lis, J. T., Borukhov, S., Wang, M. D., and **Severinov, K.** (2004) Molecular mechanism

- of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Mol. Cell*, **16**, 753-762
81. Markov, D., Christie, G., Sauer, B., Calendar, R., Park, T., Young, R., **Severinov, K.** (2004) P2 growth restriction on *rpoC* mutants is suppressed by alleles of the *RzI* homolog *lysC*. *J. Bacteriol.*, **186**, 4628-4637
 82. King, R., Markov, D., **Severinov, K.**, and Weisberg, R. A. (2004). A universally conserved zinc binding bite in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase modulates transcription termination and antitermination but does not stabilize the elongation complex. *J. Mol. Biol.*, **342**, 1143-1154
 83. Budarina, Z. I., Nikitin, D. V., Zenkin, N., Semenova, E., Shlyapnikov, M. G., Rodikova, E. A., Ogarkov, O., Baida, G. E., Solonin, A. S., and **Severinov, K.** (2004) A new *B. cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* hemolysin II. *Microbiol.*, **150**, 3691-3701
 84. Burrows, P. C., **Severinov, K.**, Buck, M., and Wigneshweraraj, S. R. (2004) Re-organization of an RNA polymerase-promoter DNA complex for DNA melting. *EMBO J.*, **23**, 4253-4263
 85. Wigneshweraraj, S. R., Burrows, P. S., Nechaev, S., Zenkin, Z., **Severinov, K.**, and Buck, M. (2004) Regulated communication between the upstream face of the RNA polymerase and the β' subunit jaw domain. *EMBO J.*, **23**, 4264-4274
 86. Semenova, E., Djordjevic, M., Shraiman, B., and **Severinov, K.** (2005) The tale of two polymerases: Transcription profiling and gene expression strategy of bacteriophage Xp10. *Mol. Microbiol.*, **55**, 764-777
 87. Campbell, E. A., Pavlova, O., Zenkin, N., Leon, F., Irschik, H., Jansen, R., **Severinov, K.**, and Darst, S. A. (2005) Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *EMBO J.*, **24**, 674-682
 88. Nickels, B. E., Garrity, S., Mekler, V., Minakhin, L., **Severinov, K.**, Ebright, R. H., and Hochschild, A. (2005) Altering the interaction between σ^{70} and the β -flap of *E. coli* RNA polymerase provides evidence for a barrier to the extension of the nascent RNA during early elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4488-4493
 89. Semenova, E., Yuzenkova, J., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and **Severinov, K.** (2005) Structure-activity analysis of Microcin J25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *J. Bacteriol.*, **187**, 3859-3863
 90. Brodolin, K., Zenkin, N., and **Severinov, K.** (2005) Remodeling of the σ^{70} subunit non-template DNA strand contacts during the final step of transcription initiation. *J. Mol. Biol.*, **350**, 930-937
 91. Sosunov, V., Zorov, S., Sosunova, E., Nikolaev, A., Bass, I., Goldfarb, A., Nikiforov, V., **Severinov, K.**, and Mustaev, A. (2005) The role of the aspartate triad in catalytic activities of multisubunit RNA polymerase. *Nucl. Acids. Res.*, **33**, 4202-4211

92. Phadtare, S. and **Severinov, K.** (2005) The extended -10 motif is critical for activity of the *cspA* promoter but does not contribute to low-temperature transcription. *J. Bacteriol.*, **187**, 6584-6589
93. Temiakov, D., Zenkin, N., Vassylyeva, M., Tahirov, T., Anikin, M., Kashkina, E., Savkina, M., Zorov, S., Nikiforov, V., Igarashi, N., Matsugaki, N., Wakatsuki, S., Perederina, A., **Severinov, K.**, and Vassylyev, D. (2005) Structural basis for transcription inhibition by antibiotic streptolydigin. *Mol. Cell*, **19**, 655-666
94. Wigneshweraraj, S. R., Burrows, P. S., **Severinov, K.**, and Buck, M. (2005) Stable DNA opening within open promoter complexes is mediated by the RNA polymerase β' -jaw domain. *J. Biol. Chem.*, **280**, 36176-36184
95. Phadtare, S. and **Severinov, K.** (2005) Elucidation of the mechanism of nucleic acid melting by *Escherichia coli* CspE. *Nucl. Acids. Res.*, **33**, 5583-5590
96. Minakhin, L., Semenova, E., Liu, J., Vasilov, A., Severinova, E., Gabisonia, T., Inman, R., Mushegian, A., and **Severinov, K.** (2005) Genome and gene expression of *Bacillus anthracis* bacteriophage Fah. *J. Mol. Biol.*, **354**, 1-15
97. Semenova, E., Minakhin, M., Vasilov, A., Solonin, A., Heyduk, T., Zakharova, M., and **Severinov, K.** (2005) Transcription regulation of the *EcoRV* restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6942-6951
98. Zenkin, N., Naryshkina, T., Kuznedelov, K., and **Severinov, K.** (2006) The molecular mechanism of replication primer synthesis by RNA polymerase. *Nature*, **439**, 617-620
99. Phadtare, S., Tadigotla, V., Shin, W.-H., Sengupta, A., and **Severinov, K.** (2006) Analysis of *Escherichia coli* global gene expression profiles in response to overexpression and deletion of CspC and CspE. *J. Bacteriol.*, **188**, 2521-2527
100. Cristóbal, R. E., Solbiati, J. O., Zenoff, A. M., Vincent, P., Y. Yuzenkova, Salomón, R. A., **Severinov, K.**, and Farías, R. N. (2006) Microcin J25 uptake: His5 of the MccJ25 lariat ring is involved in the interaction with the inner-membrane MccJ25-transporter protein SbmA. *J. Bacteriol.*, **188**, 3324-3328
101. Heyduk, E., Kuznedelov, K., **Severinov, K.**, and Heyduk, T. (2006) Bacterial promoter consensus adenine at position -11 of nontemplate strand is important for the nucleation of promoter melting. *J. Biol. Chem.*, **281**, 12362-12369
102. Severinova, E. and **K. Severinov.** (2006) Localization of the *E. coli* RNA polymerase β' subunit residue phosphorylated by bacteriophage T7 kinase Gp0.7. *J. Bacteriol.*, **188**, 3470-3476
103. Kuznedelov, K., Lamour, V., Patikoglou, G., Darst, S. A., and **Severinov, K.** (2006) Recombinant *Thermus aquaticus* RNA polymerase for structural studies. *J. Mol. Biol.*, **359**, 110-121
104. Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Krashenninikov, I., Kolb, V., Khmel', I., and **Severinov, K.** (2006) Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptidenucleotide antibiotic Microcin C. *J. Biol. Chem.*, **281**, 18033-18042

105. Wigneshweraraj, S. R., Savalia, D., **Severinov, K.**, and Buck, M. (2006) Collaboration between the β' clamp and the β' jaw domains during DNA opening by the bacterial RNA polymerase at σ^{54} -dependent promoters. *J. Mol. Biol.*, **359**, 1182-1195
106. Naryshkina, T., Kuznedelov, K., and **Severinov, K.** (2006) Structure-based analysis of RNA polymerase function: the role of the largest subunit's lid element in the formation of extended RNA-DNA hybrid. *J. Mol. Biol.*, **361**, 634-643
107. Кузнецелов, К. Д., Коммиссарова, Н. В., **Северинов, К. В.** (2006) Роль подвижной заслонки β -субъединицы РНК-полимеразы в терминации транскрипции. *Докл. Акад. Наук РАН*, **410**, 1-5
108. Zenkin, N., Yuzenkova, Y., and **Severinov, K.** (2006) Transcriptional proofreading through a ribozyme-like activity of the nascent transcript. *Science*, **313**, 518-520
109. Feklistov, A., Barinova, N., Sevostyanova, A., E. Heyduk, Bass, I., Vvedenskaya, I., Heyduk, E., Nikiforov, V., Heyduk, T., **Severinov, K.**, and Kulbachinskiy, A. (2006) A novel downstream promoter element recognized by free RNA polymerase σ subunit determines species-specific promoter recognition by RNA polymerase holoenzyme. *Mol. Cell*, **23**, 97-107
110. Djordjevic, M., Semenova, E., Shraiman, B., and **Severinov, K.** (2006) Quantitative analysis of bacteriophage Xp10 transcription strategy. *Virology*, doi:10.1016/j.virol.2006.05.038
111. Baxter, K., Lee, J., Minakhin, L., **Severinov, K.**, D. H. Hinton. (2006) Interactions of region 4 of the σ^{70} subunit of *E. coli* RNA polymerase with the T4 co-activator, AsiA, and the T4 activator, MotA, needed for σ^{70} appropriation. *J. Mol. Biol.*, doi:10.1016/j.jmb.2006.08.074