

На правах рукописи

Степанова Екатерина Викторовна

Изучение клеточной функции транскрипционного фактора *E. coli* GreA

03.00.28 – биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2009

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Учреждения Российской академии наук Института биологии гена и лаборатории механизмов регуляции транскрипции Департамента клеточной биологии Университета медицины и стоматологии штата Нью-Джерси (Стратфорд, США).

Научные руководители: доктор биологических наук
Северинов Константин Викторович
кандидат биологических наук
Борухов Сергей Ионович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Кульбачинский Андрей Владимирович
УРАН Институт молекулярной генетики
кандидат биологических наук
Родионов Дмитрий Александрович
УРАН Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт Молекулярной Биологии им.
Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится 25 декабря 2009 года в 13 часов 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д002.077.02 при Учреждении Российской академии наук Институте проблем передачи информации им. А.А. Харкевича по адресу: г.Москва, ГСП-4, Большой Каретный переулок, 19, стр.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича

Автореферат разослан « » ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Доктор физико-математических наук

Г. И. Рожкова

Список сокращений

РНКП	РНК-полимераза
ДТ	дикий тип
ПРП	полноразмерный РНК-продукт
НТ	нуклеотид
ЭК	элонгационный комплекс
NTP	рибонуклеотидтрифосфаты
АТР	аденозинтрифосфат
СТР	цитидинтрифосфат
GTP	гуанозинтрифосфат
УТР	уридинтрифосфат
ПААГ	полиакриламидный гель
э/ф	электрофорез

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение механизмов регуляции экспрессии генов – одна из бурно развивающихся областей молекулярной биологии и генетики. РНК-полимераза (РНКП) – ключевой фермент первого этапа экспрессии генов – транскрипции ДНК. Активность РНКП регулируется большим количеством транскрипционных факторов, координирующих экспрессию генов в клетке на различных стадиях роста и в ответ на изменения внешней среды. Недавно охарактеризована особая группа факторов, связывающихся во вторичном канале РНКП и действующих на её активный центр. К настоящему моменту известно шесть факторов этой группы: пять прокариотических: GreA, GreB, Gfh1, Rnk, DksA и TraR, и эукариотический фактор TFIIS. Кроме того, известно что антибиотики микроцин J25 и стрептолидин также действуют через вторичный канал РНКП. Среди факторов этой группы большой интерес вызывают GreA, GreB и TFIIS, которые стимулируют транскрипт-расщепляющую (РНказную) активность РНКП. Считается, что за счёт этой активности Gre/TFIIS факторы способствуют повышению точности транскрипции, преодолению транскрипционных пауз и перманентных остановок РНКП, а также ускоряют переход от стадии инициации транскрипции к элонгации.

За два десятилетия изучения бактериальных транскрипционных факторов GreA и GreB накоплен большой объём данных: получены рентгеновские структуры высокого разрешения, охарактеризована биохимическая активность белков *in vitro*, изучено их связывание с РНКП и установлен механизм катализа расщепления РНК этими факторами. Однако остается невыясненной клеточная функция факторов Gre. Очевидно, наличие транскрипт-расщепляющей активности в клетке способствует выживанию, так как гены *gre* широко распространены в геномах бактерий, а белковые последовательности факторов высоко консервативны. Хотя делеция генов *greA* и *greB* не является летальной для *E. coli*, клетки штамма $\Delta greA \Delta greB$ отличаются от штамма дикого типа замедленным ростом, повышенной чувствительностью к соли, ионам тяжёлых металлов, а также температурочувствительностью. Эти и другие данные указывают на то, что Gre факторы необходимы для выживания клетки в условиях стресса.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение регуляторной роли GreA *in vivo*. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) выявить гены, транскрипция которых регулируется фактором GreA, 2) определить основные клеточные процессы, в которые вовлечены гены, регулируемые GreA, 3) установить, какая стадия транскрипции этих генов регулируется GreA, 4) охарактеризовать механизм регуляции транскрипции фактором GreA

Научная новизна и практическая ценность работы. В работе получен полный список генов, регулируемых GreA. Эти данные могут быть использованы для детального изучения механизма регуляции транскрипции GreA на промоторах этих генов.

Впервые показано, что основной стадией транскрипции, регулируемой GreA *in vivo*, является инициация, а не элонгация, как считалось ранее.

Впервые показано образование тупиковых инициаторных комплексов РНКП (перманентной остановки транскрипции) вблизи промотора *in vivo* и *in vitro*. Комплексы могут быть использованы как модель в дальнейших исследованиях взаимодействий РНКП с промоторной и начальной транскрибируемой областями генов, которые приведут к глубокому пониманию механизма инициации транскрипции в целом.

Впервые показано, что одной из основных функций GreA в клетке является предотвращение перманентных остановок транскрипции вблизи промотора.

Изучение активности транскрипт-расщепляющих факторов *in vivo*, проделанное в данной работе, расширяет представления о процессах регуляции экспрессии генов в клетке и в дальнейшем поможет в разработке новых видов антибиотиков, связывающихся во вторичном канале РНКП и ингибирующих её каталитическую активность.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на Biannual Meeting on Transcription Termination (2008, Mountain Lake, VA, USA); E-coli Aliance Conference (2008, Cambridge, London, UK); IV Съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, Россия, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов ВАК, и тезисы международных конференций в количестве 3.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 132 страницах, содержит 27 рисунков и 4 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 95 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ КРАТКИЙ ОБЗОР

В процессе элонгации движение РНКП по ДНК-матрице не является непрерывным. Монотонное продвижение вперед чередуется с остановками различной продолжительности [Herbert K.M. et al. 2006, Cell]. Во время паузы РНКП вместе с каталитическим центром может сместиться на несколько (2-20) нт назад относительно 3'-конца РНК [Komissarova N., Kashlev M., 1997, J. Biol. Chem.]. Фермент теряет способность самостоятельно совместить каталитический центр с 3'-концом транскрипта, который попадает во вторичный канал [Borukhov S. et al., 1991, J. Biol. Chem.]. Факторы GreA и GreB стимулируют реакцию расщепления транскрипта РНКП. GreA стимулирует гидролиз 2-3 нуклеотидов (нт) с 3'-конца РНК, а GreB способен расщеплять РНК фрагменты длиной 2-18 нт, в зависимости от степени обратного смещения РНКП в транскрипционных комплексах. За счет реакции гидролиза РНК в каталитическом центре РНКП образуется новый 3'-конец транскрипта, и транскрипция возобновляется.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выяснения клеточной функции GreA проводился анализ экспрессионных профилей на микрочипах и экспрессии генов репортерных белков, серию реакций транскрипции *in vitro* и реакций достройки праймеров, и перманганатный футпринтинг *in vitro* и *in vivo*. Для компьютерной обработки данных микрочипов использовались программы Cytoscape 2.6.0, BinGO 2.3, PathwayTools 13.0 и базу данных Ecid. Для транскрипции *in vitro* использовались линейные матрицы, полученные ПЦР. Для перманганатного футпринтинга использовались плазмиды, содержащие последовательности исследуемых промоторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнение экспрессионных профилей клеток *E. coli* в отсутствие и присутствии GreA. Ген *greA* присутствует в геномах практически всех групп бактерий (исключениями являются отделы *Aquificae*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi* и *Cyanobacteria*), а распространенность гена *greB* ограничена отделом *Proteobacteria*. Поэтому на данном этапе работы мы исследовали клеточную функцию более распространенного транскрипционного фактора GreA

Для исследования роли GreA в клетке мы выбрали метод экспрессионных микрочипов как наиболее системный подход. С помощью микрочипов мы сравнили профили экспрессии штамма *E. coli* с делецией обоих генов *gre* ($\Delta greA \Delta greB$), несущего плазмиду для экспрессии *greA* ($\Delta greA \Delta greB + pGreA$) или контрольную плазмиду ($\Delta greA \Delta greB + pTrc99A$). По имеющимся данным, GreA является стрессовым фактором, экспрессия которого возрастает в ответ на внешние сигналы. Таким образом, условия суперэкспрессии GreA имитируют условия стрессовых воздействий на клетку. С помощью иммуноблотинга мы показали, что количество GreA в клетках штамма $\Delta greA \Delta greB + pGreA$ после индукции 0.05 mM IPTG в 10 раз превышает количество белка в клетках штамма $\Delta greB$ с хромосомной экспрессией GreA

По результатам анализа данных, полученных с использованием микрочипов, плазмидная экспрессия GreA приводит к изменению уровня мРНК 282 генов (в 1,7 и более раз) по сравнению с контрольным штаммом $\Delta greA \Delta greB + pTrc99A$. При этом экспрессия 103 генов увеличивается, а 179 генов – уменьшается.

Для подтверждения специфичности наблюдаемых эффектов для суперпродукции GreA мы профили экспрессии клеток, несущих плазмиду для экспрессии каталитически неактивного мутанта GreA (GreA-D41E) или контрольную плазмиду. В этом эксперименте мы не наблюдали значимых изменений уровня экспрессии генов.

2. Проверка данных, полученных с использованием экспрессионных микрочипов, с помощью реакции достройки праймеров. Для подтверждения данных микрочипов мы проверили изменения уровня мРНК 14 GreA-зависимых генов с помощью реакции достройки праймеров.

Для этого были приготовлены препараты тотальной РНК, выделенной из клеток всех исследованных штаммов *E. coli*: $greA \Delta greB + pGreA$, $\Delta greA \Delta greB + pGreAD41E$ и $\Delta greA \Delta greB + pTrc99A$. Одинаковые количества тотальной РНК использовались как матрицы в обратнотранскриптной реакции с радиоактивно меченым праймером, комплементарным мРНК выбранного гена *E. coli*. В каждом из экспериментов контролем служила реакция достройки праймера, комплементарного мРНК генов *ompA* или *ppa*, уровень экспрессии которых не зависел от GreA.

Результаты анализа реакций достройки праймера подтвердили данные анализа экспрессионных микрочипов.

3. Функциональный анализ данных экспрессионных микрочипов с помощью компьютерной обработки. Мы провели функциональный анализ данных микрочипов с помощью программы Cytoscape 2.6.0. С помощью встроенного расширения BinGO 2.3 мы провели статистическую обработку перепредставленности функциональных подсистем среди генов положительно и отрицательно регулируемых GreA. Среди положительно регулируемых генов статистически достоверно перепредставлены гены, продукты которых участвуют в процессе трансляции. Индукция GreA приводит к стимуляции экспрессии 50% генов, продукты которых участвуют в трансляции (Рис. 1). Кроме того, перепредставлены гены, продукты которых участвуют в процессах транскрипции, синтеза СТР и синтеза АТР АТР-синтетазой (Рис. 1).

Среди генов, отрицательно регулируемых GreA, перепредставлены гены, участвующие в ключевых стадиях процесса получения энергии за счет катаболизма органических веществ: транспорте и катаболизме углеводов и спиртов, гликолизе и цикле Кребса. В присутствии GreA снижается уровень экспрессии 25% генов, участвующих в получении энергии за счет окисления органических веществ.

К наблюдаемым изменениям уровня экспрессии генов может приводить как прямое действие GreA (за счет непосредственной регуляции транскрипции генов) так и опосредованное (за счет изменения распределения компонентов транскрипционной машинерии, факторов транскрипции или их лигандов).

Кроме того, в эту группу входят гены протеолиза, гены шоперонов и гены факторов стресса.

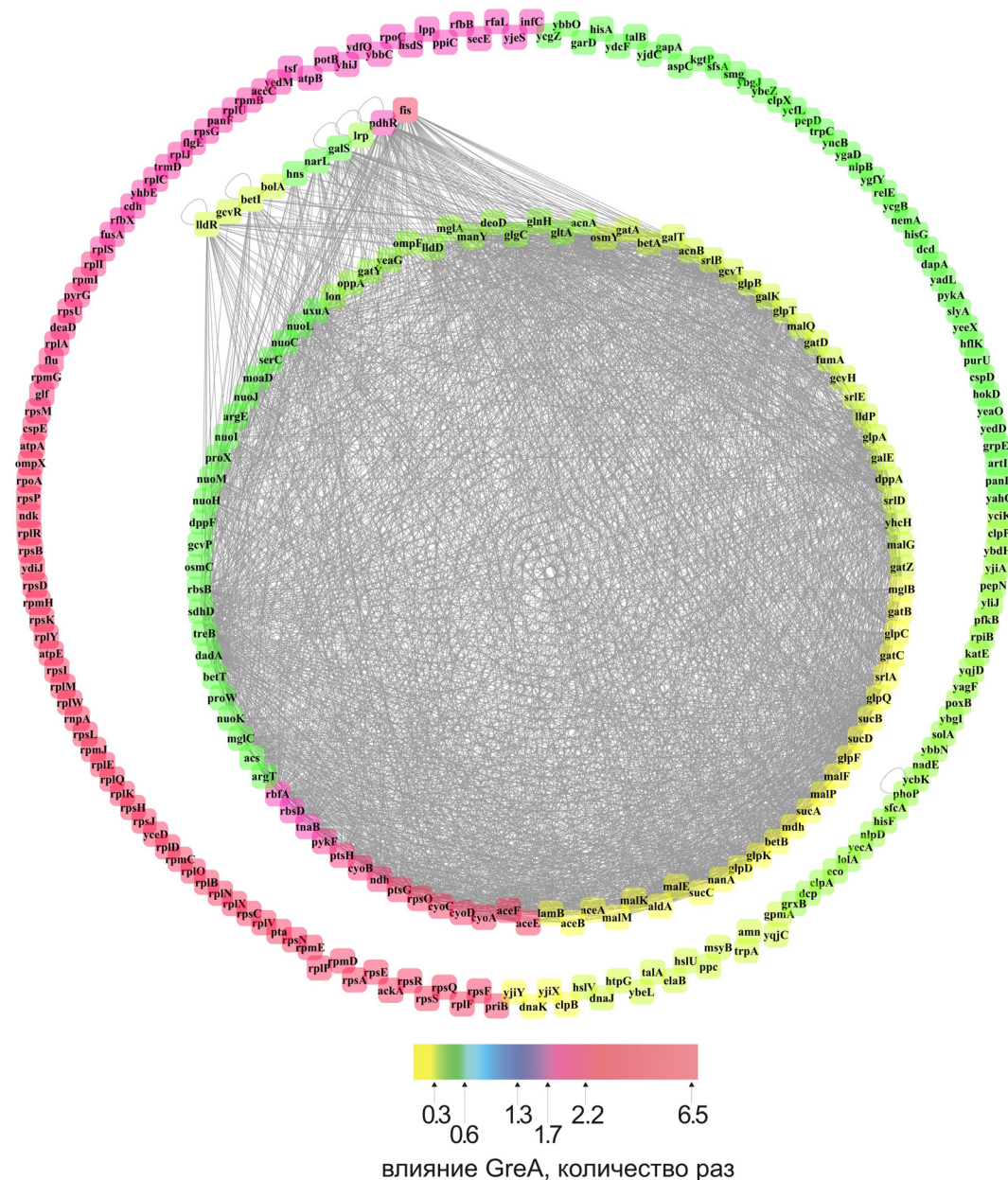


Рис. 2 Взаимодействия между генами, регулируемые GreA, по данным базы Esid. Во внутреннем круге расположены 120 генов согласованно регулируемых на уровне транскрипции (2138 ко-регуляторных взаимодействий, обозначенных серыми линиями). В линии между двумя кругами расположены 10 GreA-зависимых факторов транскрипции, образующих 269 взаимодействий на основе согласованной регуляции. В наружном круге расположены 162 гена, не регулируемых согласованно с другими GreA-зависимыми генами на уровне транскрипции. Значки генов окрашены в соответствии с влиянием GreA на экспрессию (легенда снизу).

Мы отдельно проанализировали гены транскрипционных факторов, которые согласованно регулируются на уровне транскрипции с другими GreA-зависимыми генами. GreA положительно регулирует транскрипцию генов *fis* и *pdhR*, и отрицательно – транскрипцию генов *gcvR*, *betI*, *lldR*, *narL*, *bolA*, *hns* и *gatS*. Мы не выявили корреляцию между изменением экспрессии этих факторов в присутствии GreA и наблюдаемым изменением уровня транскрипции согласованно регулируемых GreA-зависимых генов. Возможно, GreA

оказывает эффект на транскрипцию согласованно регулируемой группы генов опосредовано, за счет изменения пула метаболитов или изменения числа молекул РНКП и рибосом, доступных для транскрипции и трансляции, соответственно.

С помощью программы Pathway Tools 13.0 мы проанализировали расположение GreA-зависимых генов на хромосоме *E. coli*. Мы обнаружили, что регуляция транскрипции GreA согласуется с оперонной организацией генов. GreA одинаково влияет (положительно или отрицательно) на транскрипцию всех генов, находящихся в одном опероне. Для большинства оперонов величина влияния GreA уменьшается от первого гена оперона к последнему. Это указывает на то, что GreA регулирует стадию инициации транскрипции, а не элонгации, как считалось ранее.

Исходя из результатов компьютерного анализа, мы выбрали для дальнейшего исследования несколько положительно регулируемых генов, на которые GreA, предположительно оказывает прямой эффект. Среди них гены рибосомных белков *rpsJ*, *rplY*, *rpsB*, *rplN*, ген основного мембранного липопротеина *lpp* и ген неохарактеризованного белка наружной мембраны *ompX*. С помощью ПЦР мы получили ДНК-матрицы, содержащие промоторы этих генов, чтобы изучить механизм прямого действия GreA на инициацию транскрипции.

4. Анализ механизма регуляции фактором GreA с помощью *in vitro* транскрипции. ДНК-матрицы, содержащие последовательность промоторов выбранных генов (примерно ± 100 нт относительно старта транскрипции), содержали также последовательность транскрипционного терминатора tR2 (длиной 115 нт). Реакция транскрипции проводилась в отсутствие и в присутствии GreA. В качестве контроля, вместо GreA в реакцию добавляли каталитически неактивный мутант GreA-D41E или ортолог GreA из *T. thermophilus*, неспособный связываться с РНКП *E. coli*.

При транскрипции на выбранных промоторных ДНК происходит образование как продуктов терминации на tR2, так и полноразмерных РНК-продуктов (Рис. 3). Эффективность терминации варьировала на разных промоторах, от 30% до 60%.

Мы наблюдали увеличение количества полноразмерного транскрипта в 1.6-6 раз в присутствии GreA, но не в присутствии контрольных белков (Рис. 3). Таким образом, GreA стимулирует транскрипцию на выбранных промоторах как *in vivo*, так и в очищенной системе *in vitro*. Эти данные подтверждают предположение о прямой регуляции транскрипции GreA, сделанное на основе биоинформатического анализа.

Чтобы изучить механизм стимуляции транскрипции фактором GreA, мы проанализировали короткие РНК-продукты реакции. В отсутствие GreA дикого типа (дт) на всех исследованных промоторах происходит накопление коротких РНК длиной 4-14 нт, в то время как в присутствии фактора эти РНК исчезают и появляются лишь продукты реакции расщепления транскрипта.

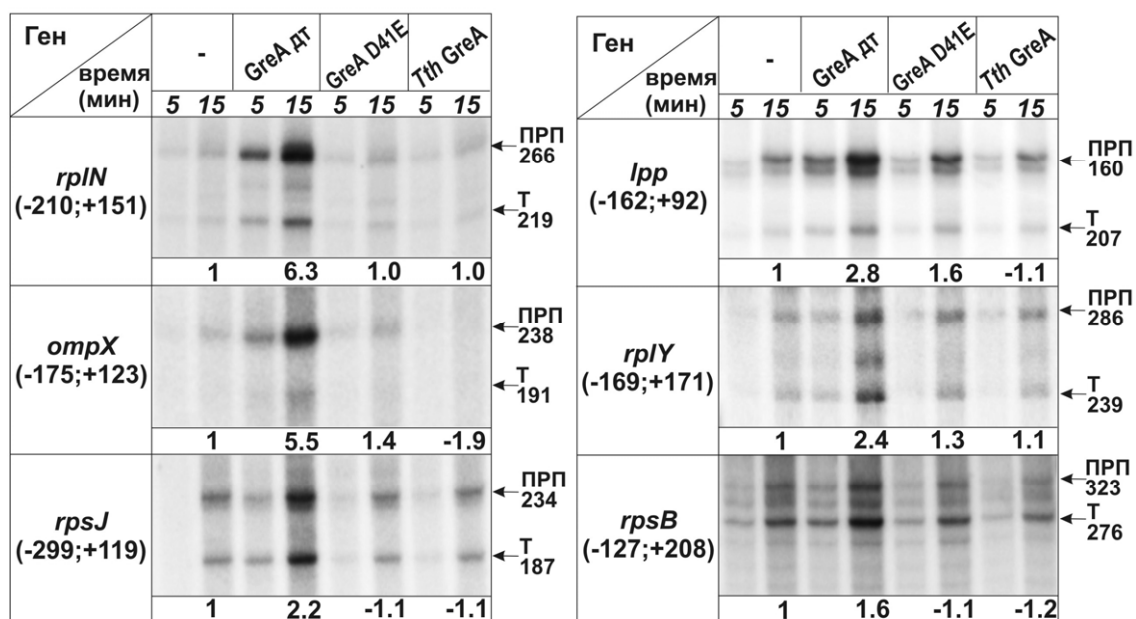


Рис. 3. Стимулирующий эффект GreA на транскрипцию *in vitro* с промоторов генов *rplN*, *ompX*, *rpsJ*, *lpp*, *rplY* и *rpsB*. Приведены авторадииограммы РНК-продуктов, разделенных в 10% денатурирующем ПААГ. В столбцах слева указаны названия использованных матриц (по названию генов), в скобках, позиции концов ПЦР-фрагментов относительно точки старта транскрипции. Длина продуктов терминации (Т) или полноразмерных РНК-продуктов (ПРП) указана стрелками справа. Реакции проведены в присутствии 100 μ M NTP и $[\alpha^{32}\text{P}]\text{CTP}$, в течение 5 и 15 минут инкубации, в отсутствие и в присутствии 4 μ M GreA факторов, как указано в подписи сверху. Величина влияния Gre-факторов на количество РНК-продукта (Т+ПРП), синтезированного за 15 минут по сравнению с контролем указана снизу.

Итак, GreA стимулирует накопление полноразмерного транскрипта и подавляет образование коротких РНК. При этом для стимуляции необходима каталитическая активность фактора, поскольку ни GreA *T. thermophilus*, ни GreA-D41E не обладают подобным свойством. На исследованных промоторах GreA стимулирует транскрипцию, когда РНКП синтезирует РНК длиной до 14 нт и должна освободить промотор. Таким образом, за счет транскрипт-расщепляющей активности GreA стимулирует переход от инициации к элонгации.

5. Характеристика коротких РНК-продуктов транскрипции на промоторах генов *ompX* и *rplN*. Мы предположили два механизма образования коротких РНК, синтезируемых при транскрипции *in vitro* в отсутствие GreA. В первом случае, происходит ранняя терминация синтеза, приводящая к распаду транскрипционного комплекса, с высвобождением всех его компонентов. Во втором случае, происходит остановка синтеза, при которой транскрипционный комплекс, содержащий короткие РНК, сохраняет целостность. Чтобы выяснить находятся короткие РНК в растворе или входят в состав транскрипционных комплексов, мы детально проанализировали короткие РНК, образующиеся при транскрипции *in vitro* в отсутствие GreA с промоторов *ompX* и *rplN* (Рис. 4). Для удобства анализа мы использовали укороченные ДНК-матрицы, не содержащие терминатора.

При транскрипции на *PrplN* в присутствии GreA или GreB (Рис. 4А дорожки 1, 2), происходит накопление полноразмерного РНК-продукта (77 нт). В отсутствие Gre-факторов, практически не образуется полноразмерного РНК-продукта. Вместо этого образуются короткие РНК длиной 9-14 нт (дорожка 3).

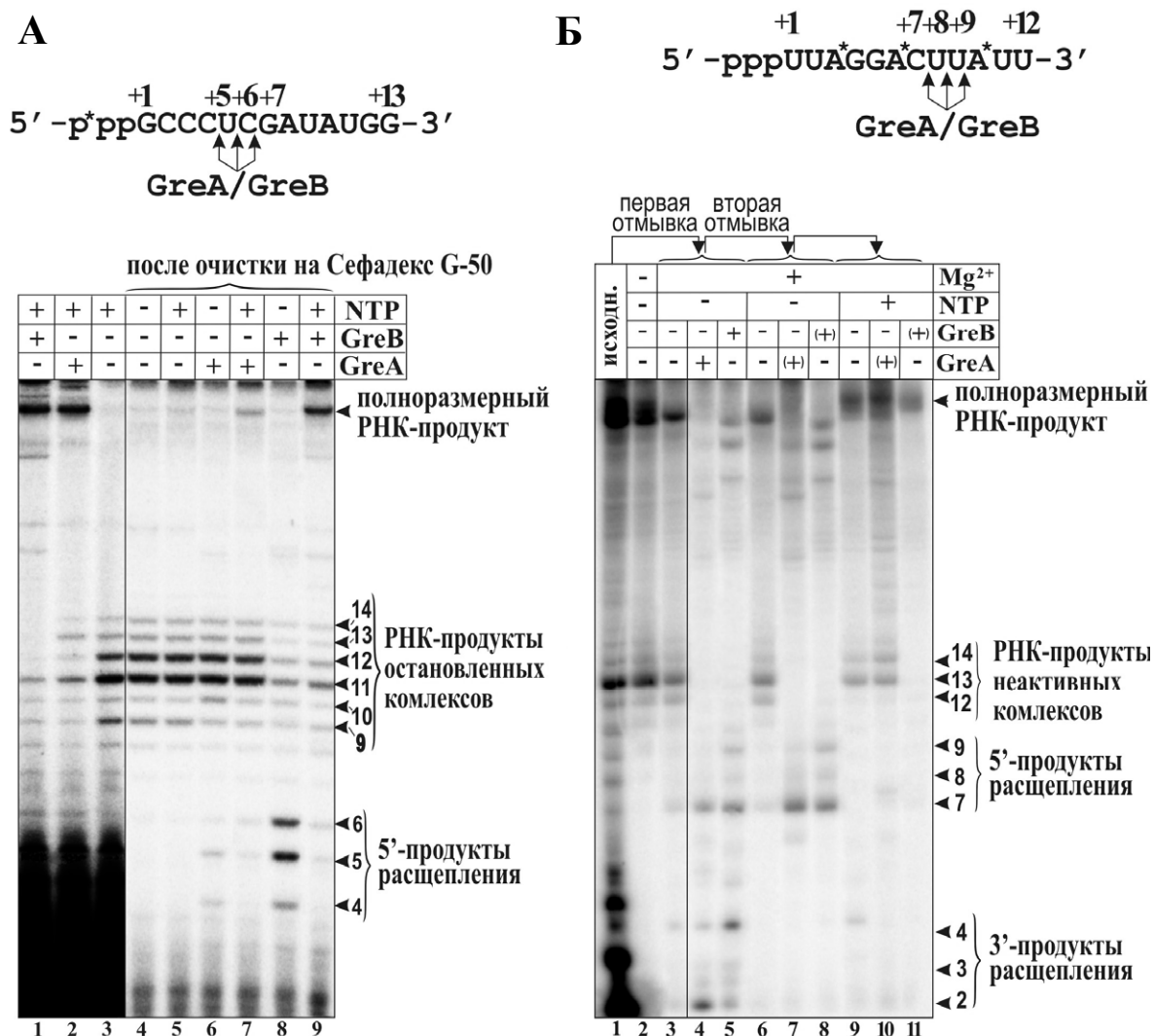


Рис. 4 Анализ РНК-продуктов *in vitro* транскрипции на *PrplN* и *PompX*. Приведены автордиограммы 23% денатурирующего ПААГ. Полноразмерные РНК, короткие РНК и продукты расщепления указаны стрелками справа. На диаграммах сверху указаны позиции расщепления РНК факторами GreA и GreB. Звездочками (*) обозначены позиции ³²P в РНК. **(А)** Продукты реакции транскрипции на *PrplN*, полученные до и после очистки на гель-фильтрации, после инкубации в отсутствие и в присутствии 4 μ M GreA или 0.4 μ M GreB и/или 100 μ M NTP, как указано в подписи над автордиограммой. **(Б)** Продукты реакции транскрипции на *PompX* с 6xHis-РНКП, иммобилизованной на Ni-NTA агарозе. Последовательность отмывок неактивных комплексов буфером до и после инкубации с 4 μ M GreA или 0.4 μ M GreB, в отсутствие и в присутствии 100 μ M NTP, указана в подписи над автордиограммой. Присутствие остаточных количеств GreA и GreB после отмывки отмечено (+). В каждую дорожку нанесена 1/12 исходной суспензии агарозного сорбента. Приведённые данные показывают, что на обоих промоторных ДНК образуются неактивные транскрипционные комплексы, которые находятся в состоянии обратного смещения и в которых происходит расщепление транскрипта и реактивация под действием Gre факторов.

Мы нанесли реакционную смесь, в которую не добавлялись Gre-факторы, на гель-фильтрационную колонку с Сефадексом G-50. На колонке задерживаются вещества малого размера: ионы металлов, NTP и РНК-продукты (длиной менее 70 нт), не связанные с РНКП. При очистке на колонке оказалось, что короткие РНК длиной 9-14 нт не задерживаются на колонке (дорожка 4). Это означает что эти РНК стабильно связаны с РНКП и находятся в составе транскрипционного комплекса.

При исследовании коротких продуктов транскрипции на промоторе гена *ompX* (*PompX*) мы использовали методику иммобилизованной реакции транскрипции *in vitro*. Реакция проводилась с помощью РНКП, связанной через 6xHis якорь с Ni-NTA агарозным сорбентом (Рис. 4Б). После проведения реакции мы анализировали по отдельности продукты реакции, находящиеся в растворе, и продукты, связанные с сорбентом (т.е. с РНКП). После отмывки сорбента, (Рис. 4Б, дорожка 1), РНК длиной 11-13 нт оставались прочно связаны РНКП в транскрипционном комплексе (дорожка 2).

Продолжительная инкубация с субстратами не приводила к удлинению коротких РНК, образованных на *PrplN* (Рис. 4А, дорожка 5) и *PompX* (Рис. 4Б, дорожка 9). Таким образом, в самом начале транскрипции на *PrplN* и *PompX* образуются неактивные комплексы, содержащие короткие РНК-продукты.

Как уже упоминалось, субстратом для Gre факторов являются транскрипционные комплексы в состоянии обратного смещения. Так как расщепление и синтез происходят в одном каталитическом центре РНКП, то по длине продуктов расщепления можно судить о положении каталитического центра относительно 3'-конца коротких РНК. Чтобы выяснить, на сколько нуклеотидов смещена РНКП в неактивных транскрипционных комплексах, образованных на *PrplN* и *PompX*, мы обрабатывали очищенные комплексы Gre-факторами. Во всех экспериментах помимо GreA, стимулирующего гидролиз 2-3 нт с 3'-конца РНК, мы также использовали GreB, который способен расщеплять РНК фрагменты длиной 2-18 нт, в зависимости от степени обратного смещения РНКП в транскрипционных комплексах.

При добавлении GreB к неактивным комплексам, образованным на *PrplN*, транскрипты длиной 9-14 нт исчезали и образовывались видимые на автордиограмме меченные 5'-концевые продукты реакции расщепления размером 4-6 нт (Рис. 4А, дорожка 8). Таким образом, в неактивных комплексах, образованных на *PrplN*, расщепление транскрипта происходит в 8-10 нт от 3'-конца РНК (Рис. 4А, диаграмма сверху). Этим объясняется низкая эффективность расщепления коротких РНК фактором GreA (дорожка 6), не способным стимулировать гидролиз РНК более, чем в трех нт от 3'-конца.

Добавление Gre-факторов к очищенным комплексам, образованным на *PompX*, приводило к образованию продуктов расщепления длиной 2-9 нт (Рис. 4Б, дорожки 4, 5). После отмывки сорбента (т.е. в комплексе с РНКП) оставались связаны 5'-концевые продукты длиной 7-9 нт, находящиеся в составе транскрипционного комплекса (дорожки 7, 8). Из этого следует, что расщепление коротких РНК, образованных на *PompX*, происходит в 2-4 нт от

3'-конца (Рис. 4Б, диаграмма сверху). В отличие от *PrplN*, на *PompX* GreA и GreB одинаково эффективно стимулируют расщепление транскрипта.

В присутствии субстратов 5'-концевые продукты реакции расщепления в комплексах, образованных на *PrplN* и *PompX*, удлинялись (Рис. 4А, дорожки 7, 9; Рис. 4Б, дорожки 10, 11), из чего следует, что Gre-факторы реактивируют неактивные комплексы, образованные на этих ДНК, за счет транскрипт-расщепляющей активности.

Таким образом, мы установили, что на двух промоторах, положительно регулируемых Gre-факторами, на начальных стадиях синтеза РНК образуются неактивные, или тупиковые, комплексы, неспособные возобновить синтез даже при продолжительной инкубации с субстратами. Эти тупиковые комплексы могут быть активированы за счет реакции расщепления транскрипта Gre-факторами. При транскрипции на хорошо изученных промоторах T7A1 и T5N25 мы не наблюдали ни образования подобных комплексов, ни стимуляции транскрипции Gre-факторами. Следовательно, образование тупиковых комплексов на стадии инициации транскрипции может являться общим свойством промоторов, положительно регулируемых GreA.

6. Характеристика тупиковых комплексов, образованных на *PrplN* и *Pomp*. Для выяснения механизма активации транскрипции фактором GreA на промоторах генов *rplN* и *ompX* *in vitro* и *in vivo* мы использовали перманганатный футпринтинг. Этот метод позволяет определить положение транскрипционного пузыря, а соответственно и РНКП, на ДНК по положению чувствительных к перманганату неспаренных остатков тимина.

Мы сконструировали плазмиды, содержащие промоторы генов *rplN* и *ompX*, pES-*rplN* и pES-*ompX*, которые можно использовать для футпринтинга в клетке и проанализировали перманганатный футпринт тупиковых комплексов, образуемый на этих матрицах *in vitro*. Детекцию модифицированных остатков тимина проводили с помощью реакции достройки радиоактивно меченного праймера.

Чтобы оценить, как изменяется положение РНКП на промоторе при переходе от ранних этапов инициации к образованию тупиковых комплексов мы сравнили футпринты комплексов, образуемых на *PrplN* и *PompX* *in vitro* в отсутствие и присутствии субстратов.

Как видно из Рис. 5, футпринт открытого промоторного комплекса на промоторе гена *rplN* не детектируется на нематричной цепи и имеет очень слабый сигнал на матричной цепи ДНК (дорожка 3). Это связано с нестабильностью открытого комплекса на pES-*rplN*, что является свойством всех известных промоторов рибосомных генов.

Чтобы проанализировать начальные стадии инициации *PrplN*, мы получили KMnO₄ футпринт транскрипционного комплекса, содержащего РНК-продукт длиной 7 нт (ЭК-7G), образуемого в присутствии GTP, CTP и UTP. Остатки Т модифицировались в позициях -10, -8, -7, +8 на матричной цепи (Рис. 5, данные показаны на верхней диаграмме), на нематричной – в позициях -6, +5, +9 (Рис. 5, дорожки 4-6, верхняя диаграмма). В присутствии GreA дт или GreA-D41E футпринт ЭК-7G не изменялся (Рис. 5, дорожки 4-6).

Появление дополнительной радиоактивной зоны, соответствующей позиции +11, а также множественные зоны, соответствующие одной позиции Т, являются артефактами детекции с помощью реакции достройки праймера ДНК-полимеразой, которая останавливается в двух нт до и после поврежденного остатка Т.

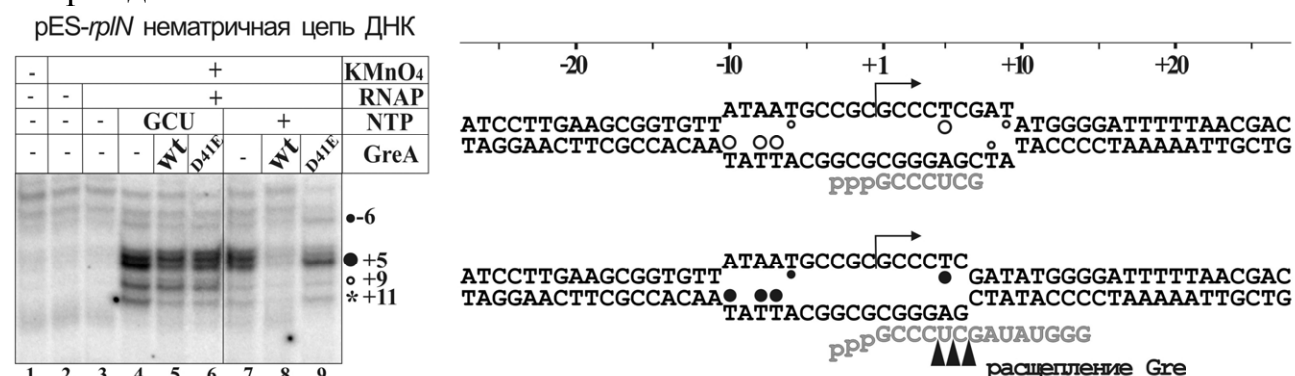


Рис. 5. KMnO₄ футпринт тупиковых комплексов, образованных на плазмидной матрице рES-*rplN*. Приведена автордиограмма 5'-меченных продуктов реакции достройки праймера на модифицированной KMnO₄ нематричной цепи ДНК рES-*rplN*, разделенных в 6% секвенирующем ПААГ. Комплексы образованы в отсутствие или присутствии 100 мМ субстратов и 4 мМ GreA дт или GreA-D41E. Позиции расщепления отмечены кругами справа. На диаграммах справа указаны позиции высокой (большие круги) и низкой (маленькие круги) чувствительности оснований Т к KMnO₄ в обеих ДНК-цепях ЭК-7G (белые круги) и тупиковых комплексов (ЭК-14G, черные круги). Старт транскрипции (+1) указан прямоугольной стрелкой. Позиции расщепления РНК Gre-факторами и Fe²⁺-индуцированными гидроксил-радикалами указаны стрелками снизу. Эти результаты показывают, что в тупиковых комплексах на рES-*rplN* передняя граница транскрипционного пузыря смещена назад на 5-8 нт по отношению к 3'-концу РНК.

Наконец, мы провели анализ футпринтов тупиковых комплексов, которые образуются на рES-*rplN* в присутствии четырех NTP и в отсутствие GreA (см Рис 4А, дорожка 3). Остатки Т в этих комплексах интенсивно модифицируются в позиции +5 и частично в позиции -6 (Рис. 5, дорожка 7). Таким образом, по сравнению с ЭК-7G, удлинение транскрипта до 9-14 нт приводит к сокращению размера транскрипционного пузыря в тупиковых комплексах и к сдвигу его передней границы назад на 4-5 нт (Рис. 5, верхняя и нижняя диаграммы).

В присутствии GreA дт, но не мутанта GreA-D41E, зоны футпринта значительно ослабевают (дорожки 8, 9), так как РНКП переходит от стадии инициации к стадии элонгации и освобождает промотор.

В отличие от *PrplN*, на промоторе гена *ompX* образуется стабильный открытый комплекс в отсутствие субстратов (Рис. 6, дорожка 6). Остатки Т в позициях +3, от -2 до -5, -9 и -11 на матричной цепи ДНК и Т в позициях +9, +8, +2, +1, -6, -8 и -10, на нематричной цепи чувствительны к KMnO₄ (Рис. 6, верхняя диаграмма).

При добавлении всех четырех NTP в отсутствие GreA на *PompX* образуются тупиковые комплексы, содержащие транскрипт длиной 12-14 нт (см. Рис. 4Б). Это приводит к изменению набора зон чувствительности Т: на матричной цепи появляются зоны в положениях от -5 до -2, а в положениях -

11 и -9, на нематричной цепи появляются зоны в положениях +8, +9, исчезают -10, -8 и -6 (Рис. 6, дорожка 5). Следовательно, переход от открытого комплекса на *pES-ompX* к неактивному (тупиковому) комплексу сопровождается сокращением размера транскрипционного пузыря, приблизительно от 14 до 12 пн, при этом границы пузыря сдвигаются вперед: передняя – от +1/+3 до +9/+10, задняя – от -10/-11 до -2 (Рис. 6, диаграммы). Таким образом, по отношению к 3'-концу РНК передняя граница пузыря смещена назад на 2-4 нт в сторону старта транскрипции. Аналогичные результаты были получены при картировании положения транскрипционного пузыря на линейных матрицах *PrplN* и *PompX*. Как и в случае тупиковых комплексов на *pES-rplN*, в присутствии GreA интенсивность футпринта сильно снижается (Рис. 6, дорожка 4), а в присутствии мутанта GreAD41E набор зон чувствительности такой же, как и без GreA (дорожка 3).

pES-ompX матричная цепь ДНК

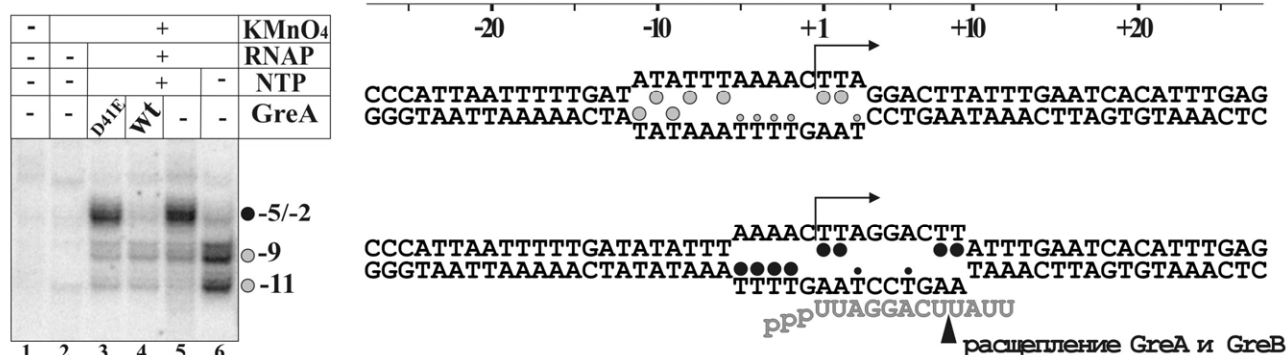


Рис. 6 KMnO₄ футпринт тупиковых комплексов, образованных на плазмидной матрице *pES-ompX*. Приведена автордиограмма 5'-меченных продуктов реакции достройки праймера на модифицированной KMnO₄ матричной цепи *pES-ompX*, разделенных в 6% секвенирующем ПААГ. Комплексы образованы в отсутствие или присутствии 100 μM NTP, и 4 μM GreA дт или GreA-D41E. Позиции расщепления отмечены кругами справа. На диаграммах справа указаны позиции высокой (большие круги) и низкой (маленькие круги) чувствительности Т к KMnO₄ в обеих ДНК-цепях открытых (серые круги) и тупиковых комплексах (ЭК-12U, черные круги). Старт транскрипции (+1) указан прямоугольной стрелкой. Позиции расщепления РНК Gre-факторами указаны стрелкой снизу. Результаты анализа показывают, что в тупиковых комплексах на *pES-ompX* передняя граница транскрипционного пузыря смещена назад на 2-4 нт по отношению к 3'-концу РНК.

Таким образом, на стадии инициации на промоторах генов *rplN* и *ompX* в отсутствие транскрипт-расщепляющих факторов РНКП образует вблизи промоторных участков тупиковые комплексы, неспособные образовывать полноразмерный РНК-продукт. Перманентная остановка транскрипции наступает, когда РНКП синтезирует транскрипт длиной 9-14 нт и смещается в обратном направлении на 5-8 нт на *PrplN* и 2-4 нт на *PompX*. Gre-факторы предотвращают образование тупиковых комплексов за счет стимуляции расщепления РНК на начальной стадии обратного смещения, и способствуют продуктивному удлинению коротких транскриптов. Тупиковые комплексы, образованные на *PompX*, могут быть реактивированы и GreA, и GreB. Тупиковые комплексы на *PrplN* реактивируются только GreB, поскольку они находятся в состоянии глубокого смещения, и для их реактивации необходимо

отщепление фрагмента РНК длиной 5-8 нт. Такой тип расщепления свойственен только GreB.

7. Перманганатный футпринт тупиковых комплексов *in vivo*. Чтобы подтвердить образование тупиковых комплексов на промоторах генов *rplN* и *ompX* *in vivo*, мы провели анализ KMnO_4 -футпринтов РНКП на этих промоторах в клетках штаммов *E. coli* $\Delta greA \Delta greB$ и $\Delta greB$, несущих плазмиды *pES-rplN* и *pES-ompX*.

Как следует из Рис. 7, на плаزمидах, выделенных из клеток $\Delta greA \Delta greB$ (дорожки 3, 7, 9), виден интенсивный футпринт, характерный для тупиковых комплексов. Футпринт на нематричной цепи *pES-rplN* повторял футпринт, полученный для тупиковых комплексов *in vitro* с основной зоной чувствительности Т в позиции +5 (дорожка 3). Аналогично, футпринт на матричной цепи *pES-ompX* повторял футпринт тупиковых комплексов, полученный на *pES-ompX* *in vitro*, и соответствовал позициям Т -5/-2 (дорожка 7). При наличии GreA в клетках (плазмиды были выделены из клеток $\Delta greB$), футпринт исчезал на обеих матрицах (дорожки 4 и 8).

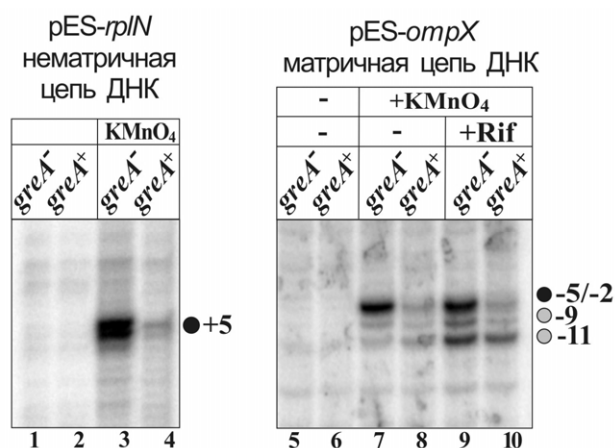


Рис. 7. KMnO_4 футпринт тупиковых комплексов, образованных *in vivo* на плазмидных матрицах *pES-ompX* и *pES-rplN*. Приведены автордиограммы 5'-меченных продуктов реакции достройки праймера на модифицированной KMnO_4 нематричной цепи *pES-rplN* и матричной цепи *pES-ompX*, разделенных в 6% секвенирующем ПААГ. Позиции Т, чувствительные к KMnO_4 в тупиковых комплексах (черные круги) и в открытых комплексах (серые круги), отмечены справа. Эти результаты показывают что в отсутствие Gre-факторов тупиковые комплексы с характерным футпринтом образуются *in vivo* на обоих промоторах.

Чтобы определить, насколько эти результаты отражают способность GreA подавлять образование тупиковых комплексов, а не его способность дестабилизировать открытые промоторные комплексы, мы получили футпринты комплекса на начальных стадиях инициации транскрипции в клетке с использованием антибиотика рифампицина. При обработке рифампицином в клетке ингибируется синтез РНК длиной более 4 нт и блокируется переход РНКП от инициации к элонгации. Таким образом, получаемый при последующем добавлении KMnO_4 футпринт является характерным для инициаторных комплексов. Футпринт на матричной цепи *pES-ompX*, выделенной из клеток $\Delta greA \Delta greB$, обработанных рифампицином, показывает положение тупиковых (позиции -5/-2) и инициаторных (позиции -11, -9) комплексов (Рис. 7, дорожка 9). В присутствии рифампицина и GreA футпринт тупиковых комплексов исчезает, а футпринт инициаторных комплексов остается без изменений (дорожка 10).

Эти выводы также согласовались с результатами анализа экспрессии белка-репортера в *E. coli*. Для этого мы сконструировали плазмиды, содержащие ген β -галактозидазы (*lacZ*), экспрессия которого находится под контролем *PrplN* (*prplN-lacZ*) или *PompX* (*pompX-lacZ*). Клетки штамма *E. coli* $\Delta greA \Delta greB$, содержащие плазмиду для экспрессии GreA дт (pGreA-wt), GreA-D41E (pGreA-D41E) или контрольную плазмиду (pBAD), были трансформированы репортерной плазмидой *prplN-lacZ* или *pompX-lacZ*. По сравнению с контролями, активный GreA увеличивал экспрессию гена *lacZ* под контролем *PrplN* в 7 раз, а под контролем *PompX* – в 2 раза.

Полученные результаты подтверждают механизм положительной регуляции транскрипции на промоторах *PrplN* и *PompX* фактором GreA в клетке. За счет транскрипт-расщепляющей активности GreA предотвращает образование тупиковых комплексов на ранних стадиях транскрипции и таким образом стимулирует экспрессию генов под контролем *PrplN* и *PompX*. Вероятно, механизм стимуляции транскрипции за счет механизма подавления образования тупиковых комплексов является характерным для многих генов, положительно регулируемых GreA.

8. Изучение механизма образования тупиковых комплексов на *PrplN* и *PompX*. Ранее, в работах Roberts и сотрудников был описан механизм образования транскрипционных пауз на ранних стадиях элонгации за счет связывания σ -субъединицы, в составе транскрипционного комплекса, с последовательностями ДНК, похожими на «-10»-промоторный элемент ТАТААТ. Биоинформатический анализ начальных транскрибируемых последовательностей *PrplN* и *PompX* не выявил элементов, похожих на «-10»-промоторный элемент. Однако это не исключает возможность того, что σ -субъединица принимает участие в образовании тупиковых комплексов на промоторах, положительно регулируемых GreA. Для выяснения роли σ -субъединицы в этом процессе мы использовали в экспериментах по транскрипции *in vitro* холо-фермент РНКП, содержащий мутантную σ -субъединицу с заменой L402F. Предполагается, что замена L402F ослабляет взаимодействия σ -субъединицы с кор-ферментом.

В отсутствие GreA при транскрипции на матрице *PompX* *in vitro* холо-ферментом с σ -L402F образует значительно меньше тупиковых комплексов и больше полноразмерных РНК-продуктов, чем при транскрипции холо-ферментом дикого типа (дт) (Рис. 8 дорожки 1, 3). С другой стороны, количество тупиковых комплексов, образованных холо-ферментом с σ -L402F на *PrplN* при транскрипции в отсутствие GreA, незначительно снизилось по сравнению с холо-ферментом дт. В то же время, количество полноразмерного РНК-продукта увеличилось (дорожки 5, 7).

В присутствии GreA количество тупиковых комплексов резко снижается, а количество полноразмерного РНК-продукта существенно увеличивается на обеих матрицах при транскрипции холо-ферментом дт и холо-ферментом с σ -L402F (дорожки 2 и 4, 6 и 8).

Чтобы выяснить причину одновременного накопления полноразмерного РНК-продукта и коротких РНК при транскрипции на *PrplN* холо-ферментом с

σ -L402F, мы проанализировали продукты одного цикла реакции транскрипции *in vitro*. Для этого мы использовали рифампицин, который добавляли к открытым промоторным комплексам одновременно с добавлением субстратов. В одном цикле транскрипции на *PrplN* холо-фермент с σ -L402F образует гораздо меньше тупиковых комплексов и больше полноразмерного РНК-продукта, чем холо-фермент дт. Анализ количеств продуктов одного цикла транскрипции показывает, что только около 12% молекул холо-фермента дт синтезируют полноразмерный продукт, а 88% – образуют тупиковые комплексы. В то же время, более 45% молекул холо-фермента с σ -L402F синтезируют полноразмерный продукт, и около 55% – образуют тупиковые комплексы. Добавление Gre-факторов в обоих случаях приводило к увеличению количества полноразмерного РНК-продукта. Таким образом, накопление значительного количества коротких продуктов на *PrplN* холо-ферментом с σ -L402F (Рис. 8) происходит в результате большого количества циклов реакции транскрипции, чем в случае холо-фермента с σ дт. Благодаря этому возрастает эффективность рециркуляции РНКП и увеличивается количество полноразмерной РНК.

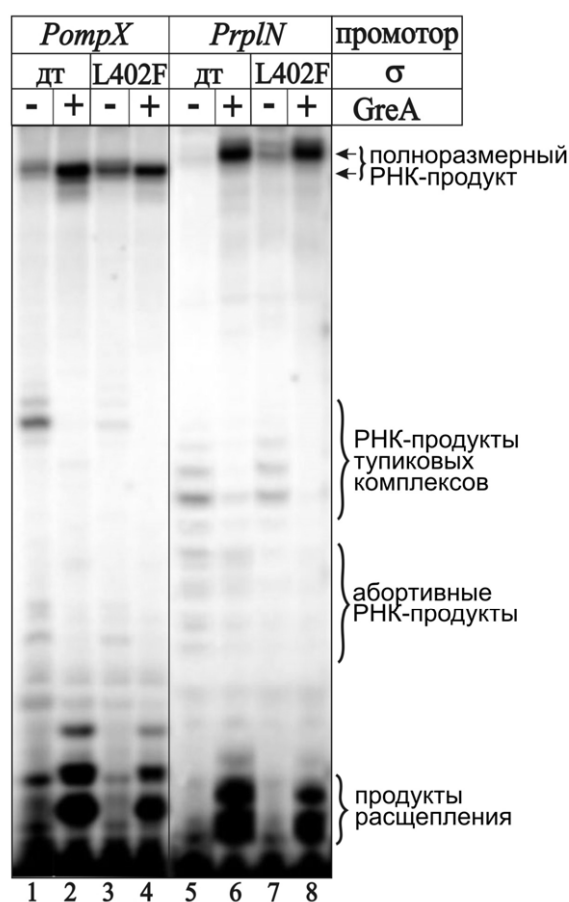


Рис. 8. Анализ продуктов реакции транскрипции *in vitro* на *PrplN* и *PompX* холо-ферментом РНКП содержащим σ -L402F или холо-ферментом содержащим σ дт. Приведена автордиограмма [α^{32} P]АТР-меченных РНК-продуктов, разделенных в 23% денатурирующем ПААГ. Транскрипционные реакции проводили в присутствии 30 μ M NTP, в отсутствие или в присутствии 4 μ M GreA в течение 15 мин. Полноразмерные РНК, короткие РНК и продукты расщепления указаны стрелками и фигурными скобками справа. Приведённые данные показывают, что образование тупиковых комплексов и синтез полноразмерного РНК-продукта на обоих промоторах в значительной степени зависит от взаимодействия σ с холо-ферментом РНКП.

Приведенные выше результаты указывают на существенную роль σ -субъединицы в образовании тупиковых комплексов на *PrplN* и *PompX*. Ослабление взаимодействий мутантной σ -L402F с холо-ферментом приводит к увеличению эффективности прохождения точки образования тупиковых комплексов и к общему повышению эффективности транскрипции.

Мы подтвердили полученные результаты с помощью KMnO_4 футпринтинга на *PrplN* и *PompX* in vitro. В присутствии субстратов футпринт тупиковых комплексов значительно слабее для холо-фермента с $\sigma\text{-L402F}$, чем для холо-фермента дт. На нематричной цепи *PrplN* уменьшается интенсивность футпринта в позиции +5, на нематричной цепи *PompX* отсутствует зона +8/+9.

Описанные в настоящей работе тупиковые комплексы, образующиеся на промоторах *PrplN* и *PompX* in vitro и in vivo, отличаются от известных « σ -зависимых» транскрипционных пауз. Максимальное время полураспада описанных ранее « σ -зависимых» пауз, измеренное в одном цикле транскрипционной реакции в присутствии рифампицина, составляет 5 минут. В нашем исследовании РНК-продукты тупиковых комплексов не достраивались в течение 30 минут инкубации с NTP в присутствии рифампицина. Это согласуется с экспериментами, описанными в главе 5, в которых после удаления субстратов мы не наблюдали удлинения коротких РНК-продуктов при дополнительной инкубации с NTP.

9. Поиск элементов промотора, вызывающих образование тупиковых комплексов. Поскольку последовательности, похожие на «-10» промоторный элемент, отсутствуют в начальной транскрибируемой последовательности как *PrplN*, так и *PompX*, мы поставили задачу определить участок промотора, присутствие которого вызывает образование тупиковых комплексов. Так как образование тупиковых комплексов наиболее выражено для *PrplN*, для детального анализа был выбран этот промотор. Для этого мы сконструировали с помощью ПЦР 15 вариантов промоторов, в которых участки ДНК от позиции -50 до -1 или от позиции +1 до +25 *PrplN* были заменены соответствующими частями промотора A1 бактериофага T7 или случайными последовательностями (Рис. 9). Промотор T7A1 – один из самых сильных и хорошо изученных природных промоторов. Транскрипционную активность полученных вариантов промоторов анализировали с помощью транскрипции in vitro в присутствии или в отсутствие GreA. Количество тупиковых комплексов, образованных на каждом из вариантов *PrplN*, оценивалось по количеству коротких РНК-продуктов, прошедших очистку на гель-фильтрационной колонке.

Результаты анализа (Рис. 9, диаграмма справа) показывают, что замены как промоторной (позиции от -84 до -1, промотор 14), так и начальной транскрибируемой (позиции от +2 до +45, промотор 9) областях *PrplN* на соответствующие части промотора T7A1 незначительно увеличивают количество полноразмерного РНК-продукта (1,7-2,5 раза), но значительно уменьшают количество тупиковых комплексов. Следовательно, образование тупиковых комплексов определяется и промоторной, и начальной транскрибируемой последовательностями *PrplN*.

Удаление или изменение «UP»-подобного элемента (АТ-богатый участок в области позиции -45, промотор 3), «-35» области (промотор 2, 4), дискриминатора (DSR, позиции от -5 до -1, промотор 6), а также нуклеотида в позиции +1 (промотор 7) практически не влияют на активность промотора и образование тупиковых комплексов. Замена нуклеотидов TG в области

расширенного «-10» промоторного элемента (позиции -13 и -14, промотор 5) на СС приводит к снижению активности промотора более, чем в 20 раз, и исчезновению тупиковых комплексов. Это указывает на то, что *PrpIN* относится к классу промоторов с расширенной «-10» областью и что связывание σ -субъединицы с TG элементом расширенной «-10» области важно для образования тупиковых комплексов. Этот вывод согласуется с результатами экспериментов, описанных в главе 8.

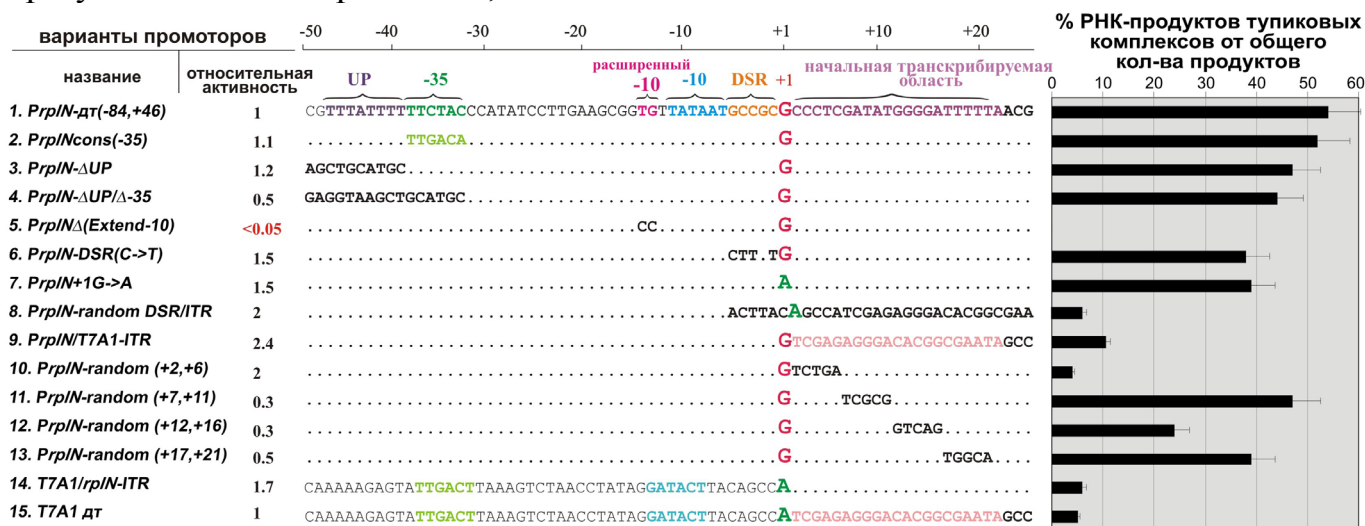


Рис. 9 Сравнение эффективности образования тупиковых комплексов на *PrpIN* и искусственных вариантах промотора. Диаграмма слева показывает выравненные последовательности исследованных промоторов. Позиции, идентичные *PrpIN* дт, обозначены точками. Элементы *PrpIN*, подвергшиеся замене или делеции, выделены цветом. Цифрами слева показана относительная активность промоторов, где за единицу принята активность *PrpIN* дт, измеренная по количеству полноразмерной РНК синтезированной в многоциклической реакции за 15 минут в присутствии 100 μ M NTP и 4 μ M GreA. На гистограмме показано количество РНК-продуктов тупиковых комплексов (после очистки на колонке с Сефадексом G-50) в процентах от общего количества РНК, синтезированных в одном цикле транскрипции в присутствии 30 μ M NTP. Приведённые данные указывают, что участки расширенного «-10» элемента промотора и начальной транскрибируемой последовательности от +2 до +6 необходимы для образования тупиковых комплексов на *PrpIN*.

Далее, в начальной транскрибируемой области были заменены четыре участка длиной пять нуклеотидов с позиции +2 до +21 (промоторы 10-13). Только замена нуклеотидов в позициях +2,+4,+5,+6 приводила к резкому снижению количества тупиковых комплексов. Замена других участков начальной транскрибируемой области *PrpIN* не приводила к существенным изменениям набора РНК-продуктов. Таким образом, участок от позиции +2 до +6 также вносит вклад в узнавание сигнала для перманентной остановки транскрипции.

Итак, мы установили, что в образование тупиковых комплексов на промоторе *PrpIN* основной вклад вносят последовательности расширенной «-10» промоторной области и начальная транскрибируемая последовательность в позициях от +2 до +6. При анализе начальной транскрибируемой последовательности других исследованных промоторов, активируемых GreA

напрямую, как и в случае *PrpLN*, мы наблюдали присутствие 2-3 нт С или G. Возможно, наличие этого элемента способствует образованию тупиковых комплексов при транскрипции на этих промоторах.

Результаты, полученные в настоящей работе, указывают на то, что предотвращение образования тупиковых комплексов является основной функцией транскрипт-расщепляющих факторов GreA и GreB в клетке. Известные механизмы устранения транскрипционных пауз в клетке и остановок транскрипции не могут быть задействованы в случае образования тупиковых комплексов на промоторе. Кооперативное действие молекул РНКП невозможно в связи с тем, что промоторная последовательность ДНК остается занятой молекулой первой РНКП, образовавшей тупиковый комплекс [Epshtein I et al., 2003, EMBO]. Вторая молекула РНКП не может начать инициацию, чтобы сместить тупиковый комплекс с точки остановки транскрипции. С другой стороны, действие АТР-зависимого фактора Mfd также невозможно из-за наличия σ -субъединицы в составе тупикового комплекса [Park J.S. et al., 2002, Cell]. Действительно, наши эксперименты демонстрируют высокую эффективность образования тупиковых комплексов в отсутствие GreA и GreB *in vivo*, несмотря на наличие фактора Mfd и избытка РНКП в клетке.

Мы предполагаем, что образование тупиковых комплексов на промоторах является общим свойством для генов, стимулируемых транскрипт-расщепляющими факторами. Недавние исследования показали, что образование ранних пауз и перманентных остановок транскрипции является способом регуляции экспрессии в эукариотических клетках [Nechaev S, Adelman K., 2008, Cell Cycle]. Остановленные инициаторные комплексы могут быть быстро активированы в ответ на внешние сигналы. Образование тупиковых комплексов на бактериальных промоторах и их активация Gre-факторами, возможно, является аналогичным механизмом регуляции экспрессии генов в прокариотических клетках.

ВЫВОДЫ.

1. Выявлено 282 гена, экспрессия которых регулируется за счет транскрипт-расщепляющей активности GreA (103 гена активируются, 179 генов репрессируются).
2. С помощью компьютерного анализа предсказано, что регуляция транскрипции фактором GreA *in vivo* происходит на стадии инициации, а не на стадии элонгации, как считалось ранее. Выявлен ряд генов, экспрессию которых GreA стимулирует напрямую (среди них гены трансляционной машинерии, а также гены синтеза липополисахаридов и несколько неохарактеризованных генов).
3. С помощью транскрипционных реакций *in vitro* подтверждена гипотеза о прямой стимуляции транскрипции фактором GreA на стадии инициации. Для стимуляции необходима транскрипт-расщепляющая активность.
4. Показано на примере промоторов генов *rplN* и *ompX*, что РНКП образует ранее не описанные тупиковые инициаторные комплексы, находящиеся в состоянии обратного смещения, и что Gre-факторы реактивируют эти комплексы за счет реакции расщепления транскрипта. Этот механизм осуществляется *in vitro* и *in vivo*.
5. Показано, что в образовании тупиковых инициаторных комплексов на *PrplN* и *PompX* принимает участие σ -субъединица РНКП.
6. Установлено, что для образования тупиковых комплексов на *PrplN* необходимо наличие двух участков промоторной последовательности – одного в области расширенного элемента “-10”, а другого – в начальной транскрибируемой последовательности в области от +2 до +5.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи.

1. Stepanova E., Lee J., Ozerova M., Semenova E., Datsenko K., Wanner B.L., Severinov K., and Borukhov S. Analysis of promoter targets for *Escherichia coli* transcription elongation factor GreA *in vivo* and *in vitro*. (2007) *J. Bacteriol.* **189(24):8772-85**
2. Stepanova E., Wang M, Severinov K, Borukhov S. Early transcriptional arrest at *E. coli* *rplN* and *ompX* promoters. (2009) *J Biol Chem.* Epublication. M109.053983.
3. Степанова Е.В., Шевелёв А.Б., Борухов С.И., Северинов К.В. Физико-химические механизмы действия транскрипционных факторов, связывающихся с РНК-полимеразой, но не связывающихся с ДНК. (2009) *Биофизика.* **54(5):773-790.**

Тезисы конференций и сообщения.

1. Stepanova, E., Lee, J., Ozerova, M., Semenova, E., Datsenko, K., Wanner, B., Severinov, K., and Borukhov S. Analysis of promoter targets for *E. coli* transcription elongation factor greA *in vivo* and *in vitro*. Biannual Meeting on Transcription Termination. 2008, Mountain Lake, VA, USA, P. 7;
2. Stepanova, E., Lee, J., Ozerova, M., Semenova, E., Datsenko, K., Wanner, B., Severinov, K., and Borukhov S. Analysis of promoter targets for *E. coli* transcription elongation factor GreA *in vivo* and *in vitro*. *E. coli* Alliance. 2008, Hinxton, UK, P.T17;
3. Степанова Е., Ли Дж, Озерова М, Семёнова Е., Даценко К., Ваннер Б. , Северинов К., Шевелёв А., Борухов С. Регуляция активности промоторов *E. coli* транскриптрассцепляющим фактором GreA *in vivo* и *in vitro*. IV Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, Россия, 2008. Стр.31