

УДК 577.214

σ^{24} -СУБЪЕДИНИЦА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *Escherichia coli* СПОСОБНА ВЫЗЫВАТЬ ПАУЗЫ ТРАНСКРИПЦИИ *in vitro**

© 2019 А.Б. Шикалов, Д.М. Есюнина, Д.В. Пупов,
А.В. Кульбачинский, И.В. Петушков**

Институт молекулярной генетики Российской академии наук,
123182 Москва, Россия; электронная почта: telomer1@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.11.2018

После доработки 05.12.2018

Принята к публикации 12.12.2018

Бактерия *Escherichia coli* имеет семь σ -факторов, которые связываются с кор-ферментом РНК-полимеразы (РНКП) и обеспечивают узнавание разных групп промоторов. Ранее было показано, что σ^{70} и σ^{38} -субъединицы могут также взаимодействовать с элонгационным комплексом (ЭК) и вызывать паузы транскрипции, узнавая последовательности ДНК, которые напоминают –10-элемент промотора. В данной работе исследована способность σ^{32} , σ^{28} и σ^{24} -субъединиц вызывать паузы транскрипции *in vitro* в реконструированных ЭК, содержащих соответствующие консенсусные –10-элементы. Показано, что σ^{24} -субъединица способна вызывать паузу транскрипции в зависимости от наличия –10-элемента. Формирование паузы подавляется Gre-факторами транскрипции. Обнаружено, что некоторые природные промоторы содержат потенциальные сигналы σ^{24} -зависимых пауз в начале транскрибируемой области. Это позволяет предположить, что такие паузы могут играть регуляторную роль в транскрипции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: паузы транскрипции, РНК-полимераза, альтернативные σ -факторы, Gre-белки.

DOI: 10.1134/S0320972519040109

σ -Субъединица РНК-полимеразы (РНКП) играет ключевую роль в инициации транскрипции, обеспечивая узнавание различных классов промоторов. У всех известных бактерий имеется одна главная σ -субъединица (σ^{70} у *E. coli*), ответственная за транскрипцию генов домашнего хозяйства [1, 2]. Альтернативные σ -субъединицы могут узнавать промоторы, которые значительно отличаются от последовательностей, узнаваемых главной σ -субъединицей, и контролируют экспрессию генов в ответ на изменения в окружающей среде и стрессовые факторы. *E. coli* имеет 6 альтернативных σ -субъединиц, которые делятся на 2 семейства: σ^{70} - и σ^{54} -семейство [2, 3]. В первое семейство входят σ^{70} , σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} и σ^{19} -субъединицы. Ко второму относится единственная σ^{54} -субъединица, которая значительно отличается от остальных по структуре и механизму действия и требует для инициации транскрипции участия белка-активатора и затрат АТФ [4]. Внутри σ^{70} -семейства выделяют 4 груп-

пы [2, 5]. Главная σ^{70} -субъединица *E. coli* относится к 1-й группе и состоит из 4-х консервативных районов $\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$ и $\sigma 4$ и неконсервативного региона (НР) между $\sigma 1$ и $\sigma 2$. σ -Субъединицы 2-й группы произошли в результате независимых дупликаций генов у различных бактерий [6]. У *E. coli* ко 2-й группе относится σ^{38} -субъединица; она утратила $\sigma 1$ и НР. Выравнивание аминокислотных последовательностей районов $\sigma 2$, $\sigma 3$ и $\sigma 4$, а также анализ структуры промоторного комплекса показывают значительное сходство между σ^{70} и σ^{38} -субъединицами, что позволяет им узнавать очень похожие промоторы [2, 7, 8]. Данная субъединица нужна для транскрипции генов во время стационарной фазы, участвует в ответе на некоторые виды стресса (осмотический шок, повышение температуры), а также отвечает за экспрессию значительной части генов при низкой температуре [9, 10]. 3-я группа σ -субъединиц является гетерогенной и включает несколько подгрупп [6]. У *E. coli* к ней относятся σ^{32} и σ^{28} -субъединицы, их доменная организация аналогична σ^{38} -субъединице, но они значительно отличаются от нее по первичной структуре и узнают промоторы с другой последовательностью [11, 12]. σ^{32} -Субъединица узнает промоторы генов, которые участвуют в ответе на тепловой шок [13, 14]. σ^{28} -Субъединица

Принятые сокращения: РНКП – РНК-полимераза; ЭК – элонгационный комплекс.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimija>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-301, 11.02.2019.

** Адресат для корреспонденции.

участвует в транскрипции генов, необходимых для формирования жгутиков [15–17]. Уровень экспрессии этой субъединицы также влияет на формирование биопленок [18].

Представители 4-й группы σ -субъединиц содержат лишь домены $\sigma 2$ и $\sigma 4$, которые необходимы для узнавания -10 и -35 -элементов промотора соответственно [1, 2, 6]. У *E. coli* есть два представителя этого семейства: σ^{24} и σ^{19} . σ^{24} -Субъединица инициирует транскрипцию генов в ответ на тепловой шок и на появление белков с неправильной укладкой в периплазматическом пространстве [19–21], а также способствует устойчивости бактерий к ионам меди, цинка и кадмия [22]. Самая маленькая σ^{19} -субъединица ответственна за транспорт ионов железа при его дефиците в клетке [23].

Согласно классическим представлениям, во время ухода РНКП с промотора происходит диссоциация σ -субъединицы. Однако многочисленные исследования последних лет показали, что это не так: σ^{70} -субъединица может оставаться связанной с РНКП и в процессе элонгации транскрипции [24–29]. Более того, σ^{70} -субъединица может повторно присоединяться к свободному элонгационному комплексу (ЭК) [30–34]. Наличие σ -субъединицы позволяет ЭК узнавать мотивы в ДНК, напоминающие последовательности ключевых элементов промотора, что приводит к паузам транскрипции [35, 36]. Было показано, что для формирования паузы наиболее важным является присутствие в транскрибируемой ДНК -10 -подобного элемента, который, как и в случае промоторов, узнается районом $\sigma 2$ в составе нематричной цепи ДНК [30, 36–39]. Кроме того, в образование пауз могут вносить вклад -35 -подобные элементы, а также последовательности около 3'-конца РНК, способствующие обратному смещению ЭК по матрице ДНК в противоположном относительно хода транскрипции направлении. Все эти нуклеотидные последовательности (при их наличии) формируют сигнал паузы в транскрибируемой области [40–42]. Показано, что σ^{70} -зависимые паузы могут наблюдаться при транскрипции как фаговых, так и бактериальных генов [30, 36, 38, 43], но их функциональная роль в большинстве случаев остается неизвестной (обзоры [35, 44]).

Недавно нами было продемонстрировано, что не только σ^{70} , но и σ^{38} -субъединица способна вызывать остановки транскрипции, для чего необходимо наличие -10 -подобного элемента [34]. Способны ли остальные σ -субъединицы вызывать паузы транскрипции, неизвестно. Целью данной работы явилось исследование способности альтернативных σ^{32} , σ^{28} и σ^{24} -субъединиц вызывать паузы транскрипции в системах *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: Tris, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, мочевины, имидазол, хлорид магния, хлорид натрия, хлорид калия, фенолметилсульфонилфторид (все производства компании «Sigma», США, чистота >99%), ЭДТА («Диаэм», Россия, >99,2%), изопропил- β -D-1-тиогактопиранозид («Thermo Fisher Scientific», Литва, чистота >99%), дигидрофосфат калия («Roth», Германия), гидрофосфат калия («Roth»), лизоцим («Amresco», США, ultra pure), нуклеозидтрифосфаты («Illustra», Великобритания, >98%). Для экспрессии белков использовали антибиотики канамицин и ампицилин («Синтез», Россия) и рифампицин («Sigma»).

Выделение белков. Кор-фермент РНК-полимеразы (РНКП) *E. coli*, содержащий шесть остатков гистидина на N-конце β' -субъединицы, выделяли из штамма *E. coli* BL21(DE3), несущего экспрессионную плазмиду pVS10, содержащую гены всех субъединиц кор-фермента под контролем промоторов РНКП бактериофага T7. Экспрессию, разрушение клеток и хроматографическую очистку фермента проводили по опубликованной ранее методике [45].

Гены *rpoH* и *rpoF* (кодируют σ^{32} и σ^{28} -субъединицы соответственно) клонировали в вектор pET29 по участкам узнавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI. Полученные плазмиды pET29_*rpoH* и pET29_*rpoF* использовали для трансформации штамма *E. coli* 3013 («New England Biolabs», США). Ночную культуру (500 мкл) сеяли в 500 мл среды LB с канамицином (50 мкг/мл) и хлорамфениколом (25 мкг/мл, для поддержания плазмиды pLys, которая имеется в штамме *E. coli* 3013), растили до достижения A_{600} 0,6. Далее в среду вносили ИПТГ до концентрации 1 мМ. При экспрессии σ^{32} -субъединицы через 30 мин после внесения ИПТГ в среду добавляли рифампицин (для предотвращения транскрипции генов шаперонов, которые препятствуют выпадению целевого белка в тельца включения) до концентрации 150 мкг/мл. Индукцию проводили в течение 2 ч при температуре 22 °С. Клетки осаждали центрифугированием. Из клеток выделяли тельца включения как было описано ранее [46]. После ренатурации белковую смесь очищали путем анионообменной хроматографии на колонке MonoQ объемом 1 мл («GE Healthcare»). Колонка была предварительно уравновешена буфером следующего состава: 40 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 5%-ный глицерин, 1 мМ динатриевой соли ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ. Белковую смесь наносили на колонку со скоростью 0,5 мл/мин. Элюцию проводили буфером аналогичного сос-

тава со скоростью 1 мл/мин с линейным градиентом NaCl от 120 до 600 мМ в течение 90 мин [47]. Пик элюции σ³²-субъединицы пришелся на 17–22 мин, σ²⁸-субъединицы – на 38–43 мин. Эти фракции были собраны и сконцентрированы с помощью системы для ультрафильтрации Amicon Ultra-4 Ultracel-10K («Merc Millipore», США).

Ген *rpoE* (кодирует σ²⁴-субъединицу) клонировали в вектор pLATE52 («Thermo Fisher Scientific») по протоколу производителя. Полученным вектором трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). Клетки выращивали в 500 мл среды LB, содержащей 20 мл аминокислоты и 200 мкг/мл ампициллина. Индукцию проводили путем добавления ИПТГ до концентрации 1 мМ. Клетки собирали центрифугированием и суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,4, 500 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 0,2 мг/мл лизоцим, 80 ед. акт. ДНКазы I («Thermo Fisher Scientific»). σ²⁴-Субъединицу выделяли из клеточного лизата с помощью Co²⁺-аффинной хроматографии на колонке HiTrap TALON crude объемом 1 мл («GE Healthcare», США). Колонку уравнивали буфером следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,4, 500 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂. Клеточный лизат наносили на колонку со скоростью 0,5 мл/мин, затем колонку промывали 5 мл буфера. Целевой белок элюировали аналогичным буфером, но с 200 мМ имидазола. Факторы GreA и GreV выделяли из растворимой фракции клеточных белков как описано ранее [48]. Чистота всех белковых препаратов превышала 98%, выход белков составлял от одного до нескольких миллиграммов.

Транскрипция *in vitro*. Для изучения способности альтернативных σ-субъединиц вызывать паузы транскрипции ЭК получали методом сборки из олигонуклеотидов и кор-фермента РНКП. Олигодезоксирибонуклеотиды и олиго-рибонуклеотиды были синтезированы на фирмах «ДНК-синтез» (Россия) или «Евроген» (Россия) (см. последовательности на рис. 1 и 2). Радиоактивная метка была введена на 5'-конец РНК-олигонуклеотида с помощью T4 полинуклеотидкиназы («New England Biolabs») в присутствии [γ-³²P]АТР (согласно протоколу производителя). Меченую РНК (конечная концентрация 250 нМ) смешивали с матричной цепью ДНК (2,5 мкМ) в буфере ТК (40 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 40 мМ KCl). Образец прогревали при 65 °С в течение 3 мин и затем охлаждали до 20 °С со скоростью 1 °С/мин. После гибридизации олигонуклеотидов препарат разбавляли в три раза буфером ТК и добавляли кор-фермент РНКП до концентрации 190 нМ. Смесь инкубировали 15 мин

при 37 °С. Далее добавляли нематричную цепь ДНК до конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали 15 мин при 37 °С. Препарат делили на две части. К одной части прибавляли σ-субъединицу до конечной концентрации 2,5 мкМ и инкубировали 10 мин при 37 °С, ко второй – аналогичное количество буфера для хранения белков (40 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 100 мМ NaCl, 50%-ный глицерин). Далее собранный ЭК разбавляли предварительно прогретым до 37 °С буфером ТК в 10 раз, отбирали аликвоту для приготовления контрольного образца. Если реакцию проводили в присутствии транскрипционных факторов GreA или GreV, их вносили в реакционную смесь до концентрации 1 мкМ. Реакцию инициировали добавлением смеси всех NTP и MgCl₂ до конечной концентрации 100 мкМ и 10 мМ, соответственно, и останавливали через фиксированные интервалы времени добавлением

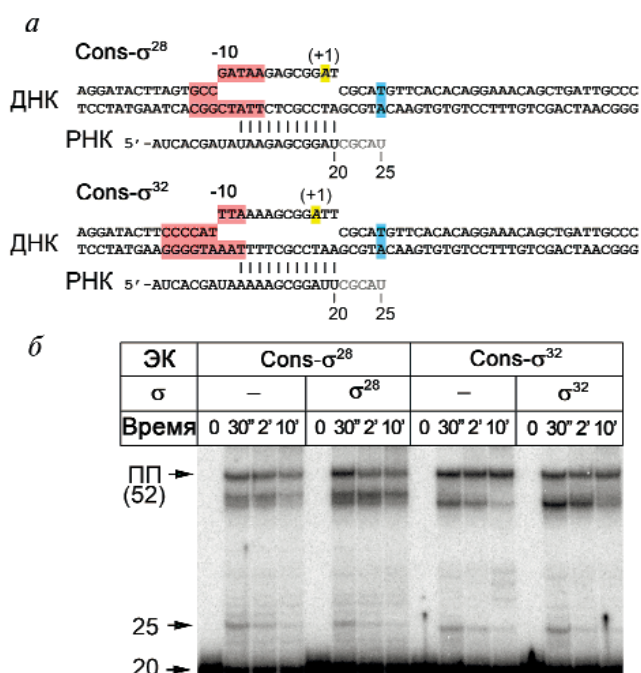


Рис. 1. Анализ формирования пауз транскрипции с участием σ³² и σ²⁸-субъединиц. **а** – Структура ЭК, использованных в экспериментах. Показан –10-элемент (выделен розовым цветом), ожидаемое положение паузы транскрипции (голубой цвет), а также обычное расположение стартовой точки транскрипции относительно –10 элемента в промоторах (желтый цвет). Нуклеотиды, добавляемые к 3'-концу исходной РНК в ходе транскрипции, показаны серым; **б** – анализ продуктов транскрипции, синтезируемых в использованных ЭК в зависимости от присутствия σ²⁸ и σ³²-субъединиц. Приведена электрофореграмма РНК-продуктов, разделенных в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Указано положение исходной РНК (20 нт), РНК в положении паузы (25 нт) и полноразмерного продукта (ПП, 52 нт). С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

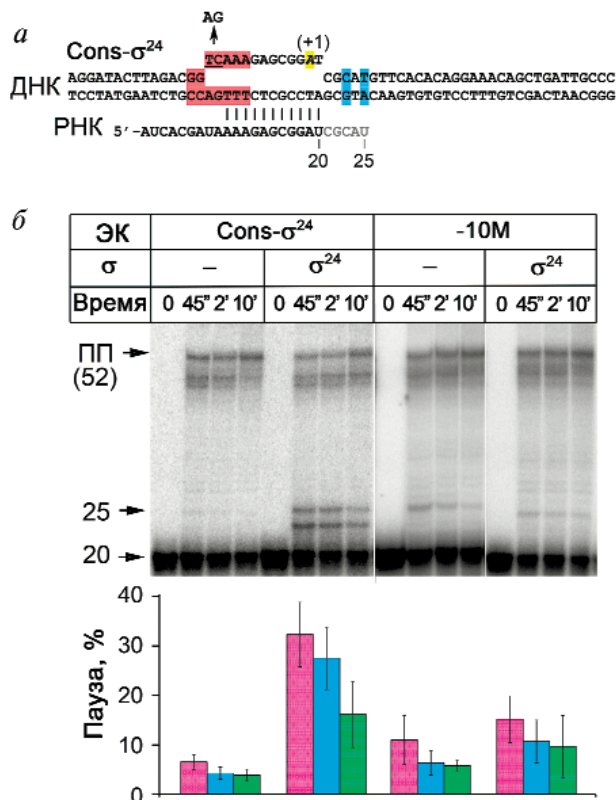


Рис. 2. Анализ формирования σ^{24} -зависимой паузы. *a* – Структура ЭК; *б* – анализ продуктов транскрипции в ЭК, содержащих консенсусный -10 -элемент и -10 -элемент с заменой динуклеотида ТС на АГ ($-10M$). Электрофореграмма РНК-продуктов, разделенных в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Указано положение исходной РНК (20 нт), РНК в положении основного продукта паузы (25 нт) и полноразмерного продукта (ПП 52 нт). На гистограмме показана эффективность формирования паузы (доля РНК продуктов, соответствующих паузе, относительно общего количества удлиненной РНК в процентах). Каждый столбец в диаграмме соответствует дорожке в геле. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте www.elibrary.ru

стоп-буфера. Продукты транскрипции разделяли в 15%-ном ПААГ (19 : 1) в денатурирующих условиях, визуализировали с помощью сканера Turhoon 9500. Эффективность образования паузы рассчитывали для каждой временной точки как отношение продуктов в состоянии паузы к суммарному количеству продуктов в состоянии паузы и продуктов большей длины. Качественные эксперименты выполняли два раза, для количественных расчетов 3–5 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы понять, способны ли альтернативные σ^{32} , σ^{28} и σ^{24} -субъединицы вызывать паузы транскрипции, в работе были поставлены

следующие задачи: 1) получить очищенные препараты исследуемых σ -субъединиц, 2) методом сборки *in vitro* получить ЭК, содержащие потенциальные сигналы паузы для этих субъединиц, 3) изучить влияние σ -субъединиц на синтез РНК в таких комплексах. Для этого нами был предложен подход с использованием ЭК, собранных из синтетических олигонуклеотидов и содержащих консенсусные промоторные элементы для каждой из альтернативных σ -субъединиц. Аналогичный подход был ранее успешно применен для изучения формирования паузы с участием σ^{70} и σ^{38} -субъединиц РНКП *E. coli* [33, 34].

На первом этапе работы были клонированы гены всех исследуемых субъединиц, затем экспрессировали их в клетках *E. coli* и получили данные белки в очищенном виде. Контрольные эксперименты показали, что все три σ -субъединицы обладают транскрипционной активностью и способны осуществлять промотор-специфическую инициацию транскрипции в составе холофермента РНКП (данные не приведены).

Формирование паузы транскрипции было исследовано в системе *in vitro* с использованием реконструированных ЭК, полученных из синтетических олигонуклеотидов и кор-фермента РНКП. Каждый из комплексов содержал последовательности консенсусного -10 -элемента для одной из трех субъединиц (Cons- σ^{28} , Cons- σ^{32} , Cons- σ^{24} , рис. 1, *a* и рис. 2, *a*) [11, 12, 49]. Ранее при исследовании σ^{70} и σ^{38} -зависимых паузы было показано, что -10 -подобный элемент при узнавании сигнала паузы находится на том же расстоянии от 3'-конца РНК, что и расстояние между -10 -элементом и стартом транскрипции в промоторных комплексах [33, 34]. При этом сама пауза наблюдается на несколько нуклеотидов ниже по ходу транскрипции из-за того, что РНКП после узнавания сигнала паузы некоторое время продолжает синтез РНК. В связи с этим, положение 3'-конца РНК относительно -10 -подобных мотивов в реконструированных ЭК соответствовало расстоянию между -10 -элементом и стартом транскрипции в природных промоторах исследуемых альтернативных σ -субъединиц (рис. 1, *a* и 2, *a*, стандартное расположение стартовой точки транскрипции относительно -10 -элемента показано желтым). Кроме того, в ожидаемом месте паузы (обозначено голубым цветом на рис. 1, *a* и рис. 2, *a*) эти комплексы содержали последовательность, которая благоприятна для обратного смещения ЭК. Как было показано ранее, такая последовательность является важной составляющей сигнала паузы [41]. За основу был взят участок из начала транскрибируемой области промотора *lacUV5*, который вызывает сильную σ^{70} -зависимую паузу [30, 33, 38].

Сборку комплексов проводили в следующем порядке: вначале с использованием синтетических олигонуклеотидов получали РНК-ДНК гибрид, который затем инкубировали с кор-ферментом РНКП, после чего к полученному продукту добавляли избыток нематричной цепи ДНК, что приводит к формированию полноценного ЭК [33, 34].

На рис. 1, б представлена электрофореграмма разделения продуктов транскрипции, синтезируемых в реконструированных ЭК, содержащих консенсусные -10-элементы для σ^{32} - и σ^{28} -субъединиц. Можно видеть, что заметная часть исходной РНК удлиняется ферментом, что говорит об успешной сборке ЭК. В случае обоих ЭК даже в отсутствие σ -субъединиц с низкой эффективностью наблюдается пауза транскрипции, которая, по-видимому, определяется особенностями последовательности ДНК в этом участке [33, 41, 42, 50]. В то же время добавление σ^{28} - и σ^{32} -субъединиц не приводит к усилению пауз транскрипции: большая часть активных комплексов проходит область ожидаемой паузы и доходит до конца матрицы, синтезируя полно-размерный продукт длиной 52 нуклеотида (часть продуктов имеют меньшую длину, вероятно из-за преждевременной остановки ЭК при приближении к концу матрицы). Следовательно, эти две σ -субъединицы не способны к формированию σ -зависимых пауз в исследуемых модельных системах.

Для σ^{24} -субъединицы был использован аналогичный подход. Как можно видеть на рис. 2, б, в отсутствие σ^{24} -субъединицы наблюдаются незначительные паузы и большинство транскрипционных комплексов синтезируют полно-размерные продукты или останавливаются за несколько нуклеотидов до конца матрицы. Добавление σ^{24} -субъединицы приводит к значительному увеличению количества РНК-продуктов размером 23 и 25 нт, которые соответствуют паузе транскрипции. Остановка транскрипции происходит со значительно большей эффективностью, чем в эксперименте в отсутствие σ -фактора (~40 и 7% соответственно).

Для того, чтобы понять, связана ли наблюдаемая остановка транскрипции с имеющимся в ЭК -10-подобным элементом (консенсус GTCAAA, [49]), мы провели в нем замену наиболее консервативных нуклеотидов ТС на АG (ЭК -10M, рис. 3, а). Как можно видеть, в таком ЭК происходит некоторое увеличение эффективности образования паузы в отсутствие σ -субъединицы. В то же время, добавление σ^{24} -субъединицы в данном случае не приводит к увеличению эффективности образования паузы (рис. 3, б). Таким образом, формирование паузы требует на-

личия в -10-подобного элементе динуклеотида ТС. Роль этих нуклеотидов понятна со структурной точки зрения. Согласно имеющимся данным о пространственной структуре комплекса σ^{24} -субъединицы с одноцепочечным ДНК-олигонуклеотидом, который имитирует нематричную цепь промотора, остатки ТС -10-элемента образуют многочисленные специфические контакты с остатками района 2 σ^{24} -субъединицы [51]. Весьма вероятно, что эти же взаимодействия приводят к узнаванию сигнала паузы.

Ранее было показано, что при образовании σ^{70} и σ^{38} -зависимых пауз ЭК переходит в смещенное состояние, в котором дальнейшее присоединение нуклеотидов невозможно [30, 33, 38, 41, 52]. Это происходит за счет того, что при узнавании сигнала паузы σ -субъединица взаимодействует с ДНК, а РНКП продолжает включение нуклеотидов. В результате формируется малоустойчивый напряженный комплекс, который может изомеризоваться путем смещения в обратном направлении. Результатом такого перемещения является выход 3'-конца РНК из активного центра, что приводит к остановке тран-

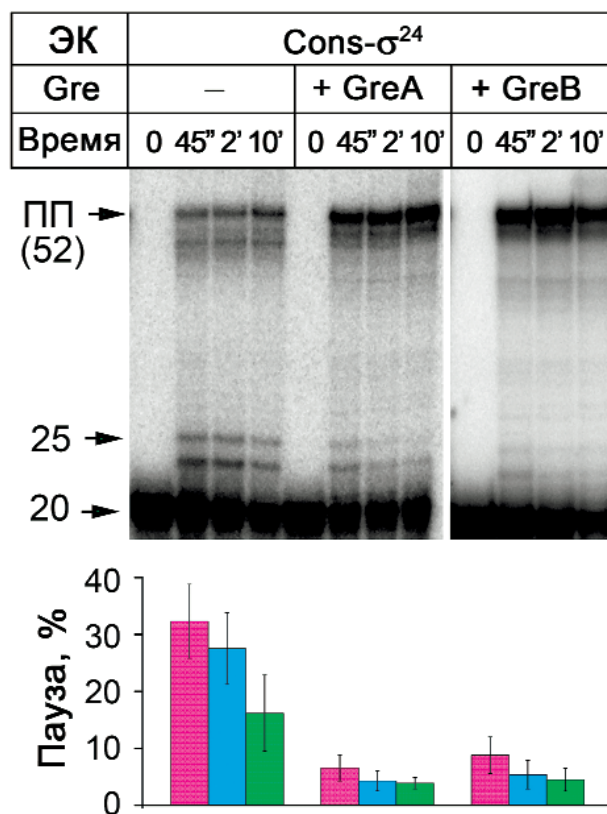


Рис. 3. Влияние Gre-факторов на эффективность формирования σ^{24} -зависимой паузы. Все обозначения соответствуют рис. 2. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

скрипции. Для реактивации такого комплекса клетки *E. coli* используют транскрипционные факторы GreA и GreB, которые способствуют расщеплению РНК-транскрипта в активном центре РНКП [53, 54]. Gre-факторы реактивируют транскрипционные комплексы при формировании σ^{70} и σ^{38} -зависимых пауз транскрипции [30, 33, 34, 41, 52]. Мы протестировали действие этих факторов на открытую нами паузу. Как можно видеть на рис. 3, оба белка, GreA и GreB, снижают ее эффективность. Это позволяет предполагать, что, как и в случае других σ -субъединиц, при формировании σ^{24} -зависимой паузы комплекс переходит в смещенное состояние.

σ^{24} -субъединица является первым представителем 4-й группы σ -субъединиц, для которого показана способность вызывать паузы транскрипции. Открытая нами пауза похожа по своим свойствам на исследованные ранее σ^{70} и σ^{38} -зависимые паузы. Это означает, что консервативные районы $\sigma 1$ и $\sigma 3$, которые отсутствуют у σ -субъединиц 4-й группы, не являются обязательными для формирования пауз. Действительно, ранее было показано, что фрагмент σ^{70} -субъ-

единицы, не содержащий большей части района 1 и района 4, также способен вызывать σ^{70} -зависимые паузы [39]. По аналогии с σ^{70} -зависимыми паузами можно предположить, что формирование σ^{24} -паузы происходит благодаря связыванию района $\sigma 2$ с кор-ферментом РНКП и с -10 -подобным элементом в нематричной цепи ДНК [32].

Известно два механизма возникновения σ -зависимых пауз. В первом случае сигнал паузы узнает та же молекула σ -субъединицы, которая участвовала в инициации транскрипции и осталась связанной с РНКП после ухода с промотора (действие *in cis*, рис. 4, а) [37]. В втором случае σ -субъединица связывается со свободным ЭК и вызывает паузы *in trans* (рис. 4, а). Формирование пауз по механизму *in trans* было показано как для σ^{70} , так и для σ^{38} -субъединицы [30, 31, 33, 34]. Эксперименты, проведенные в данной работе, были направлены на анализ возможности формирования пауз именно по такому механизму, при добавлении альтернативных σ -субъединиц к ЭК, содержащим консенсусные последовательности соответствующих -10 -элементов.

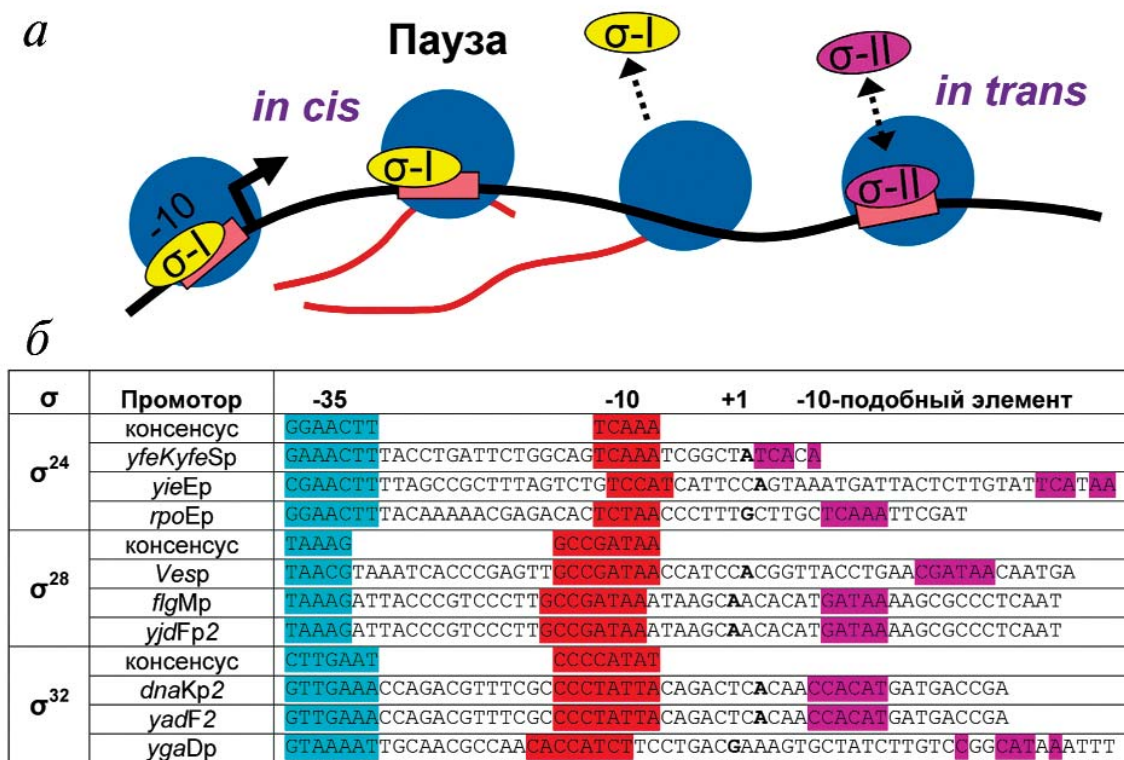


Рис. 4. Возможные механизмы формирования пауз транскрипции с участием альтернативных σ -субъединиц. а – Схема образования пауз по механизму *in cis*, при узнавании сигнала паузы в промотор-проксимальной области той же σ -субъединицей, которая участвовала в узнавании промотора, и *in trans*, при связывании другой молекулы σ -субъединицы со свободным ЭК; б – примеры промоторов, содержащих потенциальные сигналы σ -зависимых пауз в начале транскрибируемой области. Для каждой из σ -субъединиц показаны консенсусные последовательности -35 и -10 элементов, стартовая точка транскрипции показана полужирным шрифтом.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

В отличие от σ^{24} -субъединицы, σ^{28} и σ^{32} , которые относятся к 3-й группе σ -факторов, не вызывают пауз транскрипции в данной модельной системе. Используемая концентрация σ -субъединиц (2,5 мкМ) значительно превышает ранее измеренные значения констант диссоциации для связывания σ^{70} и σ^{38} -субъединиц с ЭК (~150 и 300 нМ соответственно) [34]. Также это сопоставимо или даже больше концентрации факторов σ^{28} и σ^{32} в клетке [55, 56]. Понять, почему в отличие от других σ -субъединиц 3-й группы не вызывают паузу транскрипции, сложно из-за отсутствия данных о структуре холофермента РНКП с этими альтернативными σ -субъединицами. Известно, что сигнал σ^{70} -зависимых пауз включает не только –10-подобный элемент, но и последовательность РНК-ДНК-гибрида, а также может быть дополнен –35-подобным элементом [40, 42, 50]. Возможно, что для формирования пауз транскрипции σ^{28} и σ^{32} -субъединицами нужны дополнительные последовательности ДНК, которые отсутствуют в использованных ЭК.

Важной задачей дальнейших исследований является изучение способности альтернативных σ -факторов вызывать паузы транскрипции при промотор-зависимой инициации транскрипции. Анализ известных промоторов σ^{32} , σ^{28} и σ^{24} показывает, что некоторые из них содержат в начале транскрибируемой области последовательности, которые близки к консенсусу –10-элемента для данных субъединиц (рис. 4, б). Можно предположить, что при транскрипции промотор-проксимальных участков на таких матрицах могут возникать σ -зависимые паузы по механизму *in cis*, за счет того, что σ -субъединицы остаются связанными с РНКП после инициации транскрипции. Не исключено, что σ^{28} и σ^{32} -зависимые паузы могут быть детектированы в дальнейшем в такой экспериментальной системе. Кроме того, интересной задачей является исследование влияния температуры на формирование пауз при инициации транскрипции с участием σ^{32} -субъединицы, так как эта σ -субъединица участвует в транскрипции генов при тепловом шоке.

Несмотря на то, что σ -зависимые паузы открыты довольно давно и известны как у фагов, так и у нескольких филогенетически далеких видов бактерий [30, 36, 38, 57], до сих пор неизвестна их распространенность и функциональное значение при транскрипции генома даже модельных организмов, таких как *E. coli* [44]. Имеются лишь приблизительные оценки, что σ^{70} -зависимые паузы происходят при транскрипции ~10–20% оперонов [43, 58]. Однако многие гены транскрибируются при участии альтернативных σ -субъединиц, что говорит о том, что частота встречаемости таких пауз может быть недооценена. Ранее было продемонстрировано, что главная σ^{70} -субъединица способна связываться с ЭК после инициации транскрипции холоферментом РНКП, содержащим альтернативную σ^{28} -субъединицу (рис. 4, а) [31]. Поскольку нами показано, что вызывать паузы транскрипции способны несколько альтернативных σ -факторов, смена σ -субъединиц может увеличивать многообразие пауз транскрипции, а значит, потенциально расширяет возможность тонкой регуляции экспрессии генов.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-14-10377).

Благодарности

Авторы благодарят И. Арцимович за предоставленную плазмиду (pVS10), А. Огиенко за тестирование активности σ^{28} -субъединицы, а также рецензентов за ценные замечания по редактированию рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта по вопросам финансирования и другим вопросам при исполнении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feklistov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., and Gross, C.A. (2014) Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective, *Annu. Rev. Microbiol.*, **68**, 357–376, doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155737.
2. Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space, *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 441–466, doi: 10.1146/annurev-micro.57.030502.090913.
3. Paget, M.S. (2015) Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution, *Biomolecules*, **5**, 1245–1265, doi: 10.3390/biom5031245.
4. Zhang, N., Darbari, V.C., Glyde, R., Zhang, X., and Buck, M. (2016) The bacterial enhancer-dependent RNA polymerase, *Biochem. J.*, **473**, 3741–3753, doi: 10.1042/BCJ20160741C.
5. Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships, *J. Bacteriol.*, **174**, 3843–3849, doi: 10.1128/jb.174.12.3843-3849.1992.
6. Iyer, L.M., and Aravind, L. (2012) Insights from the architecture of the bacterial transcription apparatus, *J. Struct. Biol.*, **179**, 299–319, doi: 10.1016/j.jsb.2011.12.013.

7. Maciag, A., Peano, C., Pietrelli, A., Egli, T., De Bellis, G., and Landini, P. (2011) *In vitro* transcription profiling of the sigmaS subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the sigmaS regulon and identification of sigmaS-specific promoter sequence elements, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5338–5355, doi: 10.1093/nar/gkr129.
8. Liu, B., Zuo, Y., and Steitz, T.A. (2016) Structures of *E. coli* sigmaS-transcription initiation complexes provide new insights into polymerase mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 4051–4056, doi: 10.1073/pnas.1520555113.
9. White-Ziegler, C.A., Um, S., Perez, N.M., Berns, A.L., Malhowski, A.J., and Young, S. (2008) Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and *RpoS*-dependent genes in *Escherichia coli* K-12, *Microbiology*, **154**, 148–166, doi: 10.1099/mic.0.2007/012021-0.
10. Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 189–213, doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946.
11. Zhao, K., Liu, M., and Burgess, R.R. (2007) Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to «foraging»-like behavior in *E. coli*, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4441–4452, doi: 10.1093/nar/gkm456.
12. Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C.A., and Rhodius, V.A. (2006) Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress, *Genes Dev.*, **20**, 1776–1789, doi: 10.1101/gad.1428206.
13. Neidhardt, F.C., VanBogelen, R.A., and Lau, E.T. (1983) Molecular cloning and expression of a gene that controls the high-temperature regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **153**, 597–603, doi: 10.1016/0092-8674(83)90396-3.
14. Grossman, A.D., Erickson, J.W., and Gross, C.A. (1984) The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters, *Cell*, **38**, 383–390.
15. Komeda, Y. (1986) Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, **168**, 1315–1318, doi: 10.1128/jb.168.3.1315-1318.1986.
16. Komeda, Y., Kutsukake, K., and Iino, T. (1980) Definition of additional flagellar genes in *Escherichia coli*, K12, *Genetics*, **94**, 277–290.
17. Arnosti, D.N., and Chamberlin, M.J. (1989) Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 830–834.
18. Barrios, A.F., Zuo, R., Ren, D., and Wood, T.K. (2006) Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility, *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 188–200, doi: 10.1002/bit.20681.
19. Lipinska, B., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1988) Sequence analysis and regulation of the *htpA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 10053–10067.
20. Wang, Q.P., and Kaguni, J.M. (1989) A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **171**, 4248–4253.
21. Rouviere, P.E., De Las Penas, A., Mecas, J., Lu, C.Z., Rudd, K.E., and Gross, C.A. (1995) *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*, *EMBO J.*, **14**, 1032–1042.
22. Egler, M., Grosse, C., Grass, G., and Nies, D.H. (2005) Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **187**, 2297–2307, doi: 10.1128/JB.187.7.2297-2307.2005.
23. Angerer, A., Enz, S., Ochs, M., and Braun, V. (1995) Transcriptional regulation of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. Fecl belongs to a new subfamily of sigma 70-type factors that respond to extracytoplasmic stimuli, *Mol. Microbiol.*, **18**, 163–174.
24. Bar-Nahum, G., and Nudler, E. (2001) Isolation and characterization of sigma(70)-retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*, *Cell*, **106**, 443–451, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00461-5.
25. Kapanidis, A.N., Margeat, E., Laurence, T.A., Doose, S., Ho, S.O., Mukhopadhyay, J., Kortkhonja, E., Mekler, V., Ebright, R.H., and Weiss, S. (2005) Retention of transcription initiation factor sigma70 in transcription elongation: single-molecule analysis, *Mol. Cell*, **20**, 347–356, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.012.
26. Mukhopadhyay, J., Kapanidis, A.N., Mekler, V., Kortkhonja, E., Ebright, Y.W., and Ebright, R.H. (2001) Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA, *Cell*, **106**, 453–463, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00464-0.
27. Mooney, R.A., Davis, S.E., Peters, J.M., Rowland, J.L., Ansari, A.Z., and Landick, R. (2009) Regulator trafficking on bacterial transcription units *in vivo*, *Mol. Cell*, **33**, 97–108, doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.021.
28. Raffaele, M., Kanin, E.I., Vogt, J., Burgess, R.R., and Ansari, A.Z. (2005) Holoenzyme switching and stochastic release of sigma factors from RNA polymerase *in vivo*, *Mol. Cell*, **20**, 357–366, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.011.
29. Harden, T.T., Wells, C.D., Friedman, L.J., Landick, R., Hochschild, A., Kondev, J., and Gelles, J. (2016) Bacterial RNA polymerase can retain sigma70 throughout transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 602–607, doi: 10.1073/pnas.1513899113.
30. Brodolin, K., Zenkin, N., Mustaev, A., Mamaeva, D., and Heumann, H. (2004) The sigma 70 subunit of RNA polymerase induces lacUV5 promoter-proximal pausing of transcription, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 551–557, doi: 10.1038/nsmb768.
31. Goldman, S.R., Nair, N.U., Wells, C.D., Nickels, B.E., and Hochschild, A. (2015) The primary sigma factor in *Escherichia coli* can access the transcription elongation complex from solution *in vivo*, *eLife*, **4**, e10514, doi: 10.7554/eLife.10514.
32. Mooney, R.A., Darst, S.A., and Landick, R. (2005) Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell*, **20**, 335–345, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.015.
33. Zhilina, E., Eshunina, D., Brodolin, K., and Kulbachinskiy, A. (2012) Structural transitions in the transcription elongation complexes of bacterial RNA polymerase during sigma-dependent pausing, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3078–3091, doi: 10.1093/nar/gkr1158.
34. Petushkov, I., Eshunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2017) Sigma38-dependent promoter-proximal pausing by bacterial RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 3006–3016, doi: 10.1093/nar/gkw1213.
35. Perdue, S.A., and Roberts, J.W. (2011) Sigma(70)-dependent transcription pausing in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **412**, 782–792, doi: 10.1016/j.jmb.2011.02.011.
36. Ring, B.Z., Yarnell, W.S., and Roberts, J.W. (1996) Function of *E. coli* RNA polymerase sigma factor sigma70 in promoter-proximal pausing, *Cell*, **86**, 485–493, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80121-X.
37. Marr, M.T., Datwyler, S.A., Meares, C.F., and Roberts, J.W. (2001) Restructuring of an RNA polymerase holoenzyme elongation complex by lambdaoid phage Q proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8972–8978, doi: 10.1073/pnas.161253298.
38. Nickels, B.E., Mukhopadhyay, J., Garrity, S.J., Ebright, R.H., and Hochschild, A. (2004) The sigma70 subunit of RNA

- polymerase mediates a promoter-proximal pause at the lac promoter, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 544–550, doi: 10.1038/nsmb757.
39. Zenkin, N., Kulbachinskiy, A., Yuzenkova, Y., Mustaev, A., Bass, I., Severinov, K., and Brodolin, K. (2007) Region 1,2 of the RNA polymerase sigma subunit controls recognition of the -10 promoter element, *EMBO J.*, **26**, 955–964, doi: 10.1038/sj.emboj.7601555.
 40. Devi, P.G., Campbell, E.A., Darst, S.A., and Nickels, B.E. (2010) Utilization of variably spaced promoter-like elements by the bacterial RNA polymerase holoenzyme during early elongation, *Mol. Microbiol.*, **75**, 607–622, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07021.x.
 41. Perdue, S.A., and Roberts, J.W. (2010) A backtrack-inducing sequence is an essential component of *Escherichia coli* sigma(70)-dependent promoter-proximal pausing, *Mol. Microbiol.*, **78**, 636–650, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07347.x.
 42. Strobel, E.J., and Roberts, J.W. (2014) Regulation of promoter-proximal transcription elongation: enhanced DNA scrunching drives lambdaQ antiterminator-dependent escape from a sigma70-dependent pause, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5097–5108, doi: 10.1093/nar/gku147.
 43. Deighan, P., Pukhrambam, C., Nickels, B.E., and Hochschild, A. (2011) Initial transcribed region sequences influence the composition and functional properties of the bacterial elongation complex, *Genes Dev.*, **25**, 77–88, doi: 10.1101/gad.1991811.
 44. Petushkov, I., Esyunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2017) Possible roles of sigma-dependent RNA polymerase pausing in transcription regulation, *RNA Biol.*, **14**, 1678–1682, doi: 10.1080/15476286.2017.1356568.
 45. Svetlov, V., and Artsimovitch, I. (2015) Purification of bacterial RNA polymerase: tools and protocols, *Methods Mol. Biol.*, **1276**, 13–29, doi: 10.1007/978-1-4939-2392-2_2.
 46. Pupov, D., Kuzin, I., Bass, I., and Kulbachinskiy, A. (2014) Distinct functions of the RNA polymerase sigma subunit region 3,2 in RNA priming and promoter escape, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4494–4504, doi: 10.1093/nar/gkt1384.
 47. Anthony, L.C., Foley, K.M., Thompson, N.E., and Burgess, R.R. (2003) Expression, purification of, and monoclonal antibodies to sigma factors from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol.*, **370**, 181–192, doi: 10.1016/S0076-6879(03)70016-0.
 48. Laptenko, O., and Borukhov, S. (2003) Biochemical assays of Gre factors of *Thermus thermophilus*, *Methods Enzymol.*, **371**, 219–232, doi: 10.1016/S0076-6879(03)71016-7.
 49. Rhodius, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A. (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes, *PLoS Biol.*, **4**, e2, doi: 10.1371/journal.pbio.0040002.
 50. Strobel, E.J., and Roberts, J.W. (2015) Two transcription pause elements underlie a sigma70-dependent pause cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 4374–4380, doi: 10.1073/pnas.1512986112.
 51. Campagne, S., Marsh, M.E., Capitani, G., Vorholt, J.A., and Allain, F.H. (2014) Structural basis for -10 promoter element melting by environmentally induced sigma factors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 269–276, doi: 10.1038/nsmb.2777.
 52. Marr, M.T., and Roberts, J.W. (2000) Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site, *Mol. Cell*, **6**, 1275–1285, doi: 10.1016/S1097-2765(00)00126-X.
 53. Borukhov, S., Sagitov, V., and Goldfarb, A. (1993) Transcript cleavage factors from *E. coli*, *Cell*, **72**, 459–466, doi: 10.1016/0092-8674(93)90121-6.
 54. Laptenko, O., Lee, J., Lomakin, I., and Borukhov, S. (2003) Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase, *EMBO J.*, **22**, 6322–6334, doi: 10.1093/emboj/cdg610.
 55. Grigorova, I.L., Phleger, N.J., Mutalik, V.K., and Gross, C.A. (2006) Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5332–5337, doi: 10.1073/pnas.0600828103.
 56. Jishage, M., Iwata, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions, *J. Bacteriol.*, **178**, 5447–5451, doi: 10.1128/jb.178.18.5447-5451.
 57. Zhilina, E., Miropolskaya, N., Bass, I., Brodolin, K., and Kulbachinskiy, A. (2011) Characteristics of sigma-dependent pausing in RNA polymerases from *E. coli* and *T. aquaticus*, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1348–1358, doi: 10.1134/S0006297911100038.
 58. Hatoum, A., and Roberts, J. (2008) Prevalence of RNA polymerase stalling at *Escherichia coli* promoters after open complex formation, *Mol. Microbiol.*, **68**, 17–28, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06138.x.

THE σ^{24} SUBUNIT OF *Escherichia coli* RNA POLYMERASE CAN INDUCE TRANSCRIPTIONAL PAUSING *in vitro*

A. B. Shikalov, D. M. Esyunina, D. V. Pupov, A. V. Kulbachinskiy, and I. V. Petushkov*

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
123182 Moscow, Russia; E-mail: telomer1@rambler.ru*

Received November 2, 2018

Revised December 5, 2018

Accepted December 12, 2018

The bacterium *Escherichia coli* has seven σ subunits that bind core RNA polymerase and are necessary for promoter recognition. It was previously shown that the σ^{70} and σ^{38} subunits can also interact with the transcription elongation complex (TEC) and stimulate pausing, by recognizing DNA sequences similar to the -10 element of promoters. In this study, we analyzed the ability of the σ^{32} , σ^{28} , and σ^{24} subunits to induce pauses in reconstituted TECs containing corresponding -10 consensus elements. It was shown that the σ^{24} subunit can induce a transcriptional pause depending on the presence of -10 element. The pause formation is suppressed by Gre-factors suggesting that the paused complex adopts a backtracked conformation. Some natural promoters contain potential signals of σ^{24} -dependent pauses in the initially transcribed regions suggesting that such pauses may have regulatory functions in transcription.

Keywords: transcriptional pausing, RNA polymerase, alternative σ factors, Gre proteins