

УДК 577.214

РОЛЬ КОНТАКТОВ CRE-РАЙОНА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *Escherichia coli* С НЕМАТРИЧНОЙ ЦЕПЬЮ ДНК В ПРОЦЕССЕ УХОДА С ПРОМОТОРА*

© 2020 И.В. Петушков**, А.В. Кульбачинский

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

Поступила в редакцию 07.05.2020

После доработки 09.06.2020

Принята к публикации 10.06.2020

РНК-полимераза (РНКП) узнает последовательность промоторной ДНК благодаря множеству взаимодействий, которые обеспечивают специфичность инициации транскрипции. У бактерий, кроме главного фактора инициации – σ -субъединицы, – в узнавании промоторов может принимать участие кор-фермент РНКП. В частности, остаток гуанина в +2 положении (+2G) нематричной цепи ДНК размещается в CRE-кармане (core recognition element), сформированном β -субъединицей РНКП. Целью нашего исследования являлось изучение роли данных контактов в процессе ухода РНКП с промотора. В работе исследованы точечные мутации в β -субъединице РНКП *Escherichia coli*, которые нарушают описанные взаимодействия. Мы установили, что наличие в составе промотора остатка +2G приводит к замедлению скорости ухода с промотора и увеличению доли неактивных комплексов. Аминокислотные замены в CRE-кармане снижают стабильность промоторных комплексов и изменяют картину коротких РНК-продуктов, синтезируемых в процессе инициации, но не оказывают значительного влияния на скорость перехода к элонгации независимо от наличия остатка +2G. Таким образом, контакты CRE-кармана с +2G не вносят существенного вклада в кинетику ухода РНКП с промотора, а наблюдаемые изменения в эффективности abortивного синтеза не связаны напрямую со скоростью перехода к элонгации транскрипции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: РНК-полимераза, CRE-карман, промотор, уход с промотора.

DOI: 10.31857/S0320972520070076

ВВЕДЕНИЕ

В ходе узнавания промотора РНК-полимераза (РНКП) осуществляет локальное плавление ДНК-дуплекса размером ~13 нуклеотидов в области точки старта транскрипции, в результате чего формируется открытый промоторный комплекс (R_{Po}) [1]. Узнавание –35 и –10 элементов промотора и дискриминатора (участок между –10 элементом и стартом транскрипции) происходит при участии σ -субъединицы. β -Субъединица, входящая в состав кор-фермента РНКП, способна формировать контакты с нуклеотидами нематричной цепи ДНК в распла-

ленном участке от –4 до +2 положения, который получил название CRE (элемент, распознаваемый кор-ферментом РНКП, от англ. core recognition element). Наиболее интересными являются взаимодействия остатка гуанина в +2 положении (+2G). Этот остаток выпетливается и размещается в специальном кармане, образованном консервативными аминокислотными остатками β -субъединицы, который называется CRE-карманом (рис. 1, а) [2–4]. Несмотря на то что взаимодействия CRE с кор-ферментом были выявлены в промоторном комплексе, анализ последовательностей многочисленных промоторов не выявил никаких консенсусных элементов в этом районе, что позволяет предположить, что эти взаимодействия не являются обязательными при узнавании промотора и могут иметь значение на более поздних этапах транскрипции [5]. Например, у *Escherichia coli* были выявлены 39 промоторов, у которых взаимодействия CRE-кармана с промотором участвуют в определении точки старта транскрипции [6].

Во время синтеза первых 4–6 нуклеотидов РНК-транскрипта 5'-конец растущей РНК сталкивается с районом 3.2 σ -субъединицы, который проникает внутрь РНКП и способствует

Принятые сокращения: РНКП – РНК-полимераза; CRE – элемент, распознаваемый кор-ферментом РНКП (core recognition element); EC – элонгационный комплекс; ITS – начально транскрибируемая последовательность (initially transcribed sequence); R_{Po} – открытый промоторный комплекс; R_{Pint} – инициаторный комплекс; WT – дикий тип.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-117, 29.06.2020.

** Адресат для корреспонденции.

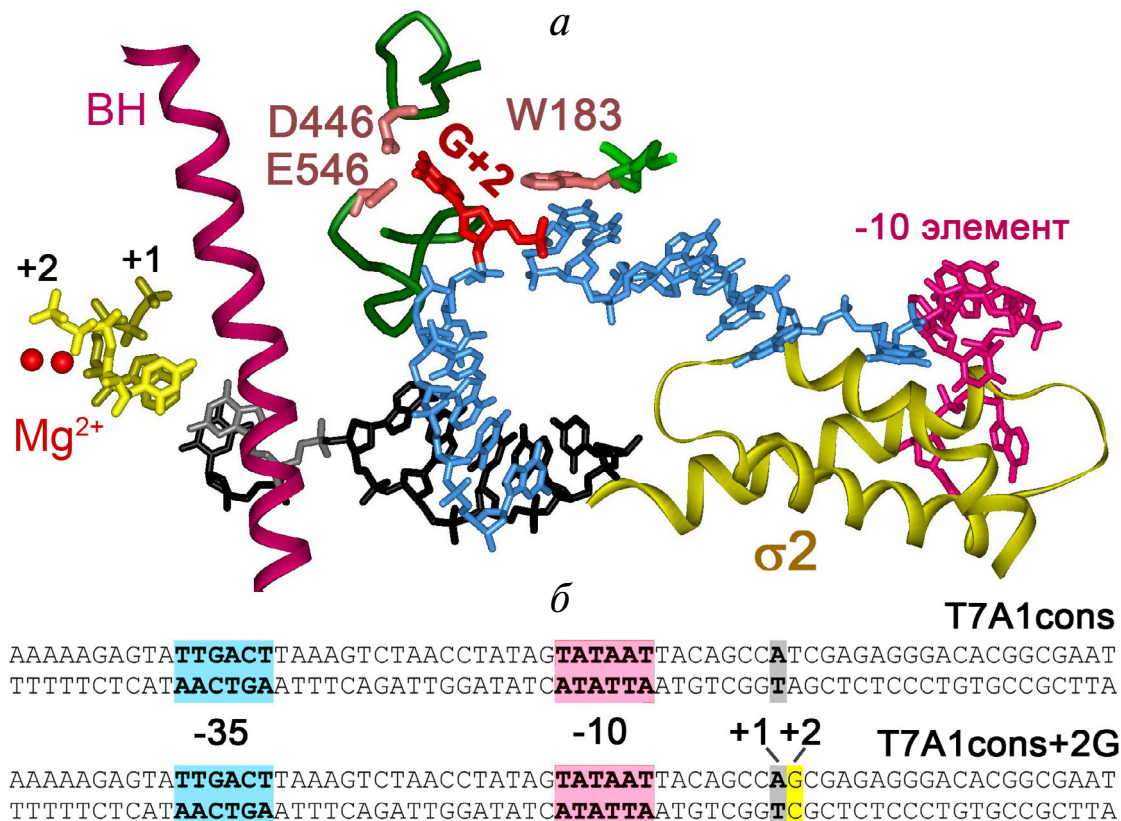


Рис. 1. Взаимодействия РНКП *Thermus thermophilus* с нематричной цепью ДНК в инициаторном комплексе [3]. *а* – Специфические контакты РНКП с ДНК в области около активного центра. Два каталитических иона Mg^{2+} обозначены красными сферами. Спираль-мост (BH, bridge helix) показана фиолетовым цветом, первые два нуклеотида РНК показаны желтым. Черным цветом показана матричная цепь ДНК, проникающая в область активного центра, синим цветом – нематричная цепь ДНК. Остаток гуанина в +2 положении (обозначен красным цветом) выпетливается из ДНК и взаимодействует с аминокислотными остатками β -субъединицы, формирующими CRE-карман (D446, E546). Нуклеотид в +1 положении нематричной цепи взаимодействует с остатком $\beta W183$ β -субъединицы. –10 элемент промотора, взаимодействующий с районом 2 σ^A -субъединицы, выделен розовым. *б* – Схема промотора T7A1cons и его варианта с остатком +2G. На схеме указаны –35 и –10 элементы промотора и стартовая точка транскрипции. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

правильному размещению матричной цепи ДНК в активном центре [3, 7, 8]. Такое столкновение приводит к затруднению дальнейшего продвижения фермента по матрице ДНК и, как следствие, вызывает паузу транскрипции в +6 положении [9]. При этом делеция района 3.2 σ -субъединицы не приводит к полному исчезновению паузы на исследованной матрице. Оказалось, что формированию паузы также способствует мотив TG, располагающийся в +6/+7 положениях промотора. Замена D446A в β -субъединице приводит к увеличению продолжительности этой паузы, что указывает на важность контактов CRE-кармана с остатком гуанина в нематричной цепи для выхода из состояния паузы на стадии инициации транскрипции [10]. Аналогичную роль данные контакты играют и в случае пауз на стадии элонгации [11]. Также бы-

ло показано, что мутации в CRE-кармане оказывают влияние на общую скорость элонгации и на терминацию транскрипции. Таким образом, данный район играет роль на всех стадиях транскрипции [12]. Кроме CRE-кармана, в формировании промоторных комплексов участвует располагающийся рядом консервативный остаток W183 β -субъединицы, который контактирует с остатком в +1 положении нематричной цепи (рис. 1). Эти контакты влияют на эффективность синтеза abortивных продуктов, а также способствуют образованию RPo на промоторе альтернативной σ^{54} -субъединицы [13].

Во время включения первых нуклеотидов сохраняются многочисленные контакты РНКП с промоторными элементами. Так как при этом расплетается передний ДНК-дуплекс, а обе цепи ДНК затягиваются внутрь фермента, в ре-

зультате формируется напряженный комплекс с неканоническим размером транскрипционного пузыря [14–16]. Накопленное напряжение может привести к частичному или полному смещению комплекса назад (в направлении к точке старта), что приводит к высвобождению abortивного продукта. Когда размер РНК-транскрипта достигает длины 9–15 нуклеотидов, накопленной энергии становится достаточно для разрыва контактов с промотором, что способствует переходу от инициаторного комплекса (RP_{int}) к элонгационному (EC) [10, 16–20]. Значительный вклад в процесс ухода с промотора вносит прямое взаимодействие РНК-транскрипта с районом 3.2 σ -субъединицы [9, 21–24].

О кинетике процесса ухода с промотора и о факторах, влияющих на этот процесс, известно немного. Показано, что более сильные контакты с ключевыми элементами промотора приводят к замедлению скорости ухода с промотора [21, 25]. Влияние последовательности в области старта синтеза ITS (начально транскрибируемая последовательность от английского *initially transcribed sequence*) понятно в меньшей степени. Замены в ITS приводят к изменению уровня транскрипции до 10 раз *in vivo* и до 25 раз *in vitro* [26, 27]. От последовательности в области ITS зависит относительное количество как abortивных, так и полноразмерных продуктов, а также размер самих abortивных продуктов [27–30]. Предложено несколько вариантов того, как ITS может влиять на скорость ухода с промотора: за счет изменений в стабильности переднего ДНК–ДНК-дуплекса, стабильности РНК–ДНК-гибрида, доли непродуктивных комплексов во время abortивного синтеза [10, 31]. Подобные непродуктивные комплексы в состоянии паузы и в частично смещенном состоянии удалось выявить методами работы с единичными молекулами [10, 32]. Можно предположить, что наличие специфических контактов нуклеотидов CRE с кор-ферментом РНКП может влиять на кинетику этого процесса. При анализе множества вариантов ITS на разных промоторах было обнаружено, что в случае замены +2G в промоторе *lacUV5* происходит увеличение скорости перехода к элонгации, хотя наличие дополнительных контактов должно было бы приводить к замедлению ухода с промотора. Данный эффект был специфичен для *lacUV5*, но не для двух других исследованных промоторов [31]. Таким образом, влияние остатка +2G на кинетику ухода с промотора остается непонятным. Также ранее не изучалась роль взаимодействий +1 нуклеотида в нематричной цепи с остатком W183 в этом процессе. В связи с этой задачей

данной работы являлось исследование роли контактов остатков в +1 и +2 положении в нематричной цепи с кор-ферментом в процессе ухода с промотора. Для этого мы применили метод молекулярных маяков [33, 34] в сочетании со стандартными тестами по транскрипции *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование и выделение белков. Кор-фермент РНКП экспрессировали с использованием плазмиды pIA679, кодирующей все субъединицы РНКП под контролем промотора РНКП бактериофага T7 (с 6 остатками гистидина на N-конце β -субъединицы) [35]. Замены W183A, D446A, E546A в β -субъединице проводили методом сайт-направленного мутагенеза в гене *rpoB* [12]. Кор-фермент РНКП выделяли из штамма *E. coli* BL21(DE3). Экспрессию, разрушение клеток, осаждение полимином Р и сульфатом аммония («Sigma-Aldrich», США), а также хроматографическую очистку фермента на гепариновой, Ni-аффинной и анионообменной колонках проводили по опубликованной методике [35]. Экспрессию и хроматографическую очистку σ^{70} -субъединицы проводили, как описано ранее [7]. σ^{70} -Субъединицу, содержащую уникальный остаток цистеина в 211 положении, экспрессировали и очищали по аналогичной методике и вводили флуоресцентную метку тетраметилродамин-5-малеимид [34].

Транскрипция *in vitro*. Матрицу для транскрипции, содержащую промотор T7A1cons (от –85 до +53 позиции относительно точки старта) или его вариант с заменой +2G, получали методом ПЦР с использованием полимеразы Pfu («Thermo Fisher Scientific», США) и очищали, используя набор GeneJET PCR purification kit («Thermo Fisher Scientific», США), как описано ранее [12, 36]. Кор-фермент и σ^{70} -субъединицу смешивали в транскрипционном буфере TB40 (40 mM Tris-HCl («Sigma-Aldrich», США), pH 7,9; 40 mM NaCl («Roth», Германия); 10 mM MgCl₂ («Sigma-Aldrich», США) до концентрации 50 nM и 250 nM соответственно; добавляли матрицу T7A1cons до концентрации 25 nM и инкубировали 10 мин при 37 °C. Далее к транскрипционным комплексам добавляли нуклеотидные субстраты. Для детекции abortивных и полноразмерных продуктов добавляли смесь затравки ApU до 100 мкМ, АТР и СТР до 25 мкМ, ГТР до 7 мкМ, а также 2,5 мкКи [α -³²P]ГТР (ИБХ РАН). Для получения 5'-меченых abortивных РНК-транскриптов добавляли смесь ГТР, СТР, УТР («GE Healthcare», США) до конечной кон-

центрации 25 мкМ и 2,5 мкКи $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ (ИБХ РАН). Транскрипцию останавливали через 10 мин добавлением равного объема стоп-раствора (8 М мочевины, 20 мМ ЭДТА («Sigma-Aldrich» США)). РНК-продукты анализировали в 23%-ном или 30%-ном денатурирующем ПААГ [8], детекцию проводили при помощи фосфоимиджера Typhoon 9500 («GE Healthcare», США).

Измерение стабильности промоторного комплекса и скорости ухода с промотора методом молекулярных маяков. Все эксперименты проводили в буфере ТВ40 в присутствии 0,01% (v/v) Tween 20 в кювете объемом 800 мкл при 37 °С. Возбуждение сигнала флуоресценции проводили при длине волны 550 нм (ширина щели монохроматора 10 нм), детекцию – при 580 нм (ширина щели монохроматора 10 нм), используя флуориметр QuantaMaster QM40 («Photon Technology International», США). В реакционную смесь добавляли меченую σ^{70} -субъединицу до концентрации 1 нМ. Далее вносили кор-фермент до конечной концентрации 4 нМ и про-

торную ДНК до 5 нМ и инкубировали смесь 5 мин. Для измерения стабильности промоторного комплекса добавляли гепарин до концентрации 100 мкг/мл, перемешивали смесь микропипеткой ~10–15 с и включали детектор [37]. При измерении скорости ухода после сборки РР_о в реакционную смесь добавляли 1000-кратный избыток немеченой σ^{70} -субъединицы и добавляли смесь всех NTP до конечной концентрации 100 мкМ. Данные по флуоресценции нормализовали по величине амплитуды сигнала и аппроксимировали уравнением кинетики первого порядка [25, 37].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние точечных мутаций в CRE-районе на транскрипцию с промотора T7A1cons. В работе было исследовано три мутантных варианта РНКП с заменами D446A, E546A и W183A в β -субъединице, которые, как было показано ра-

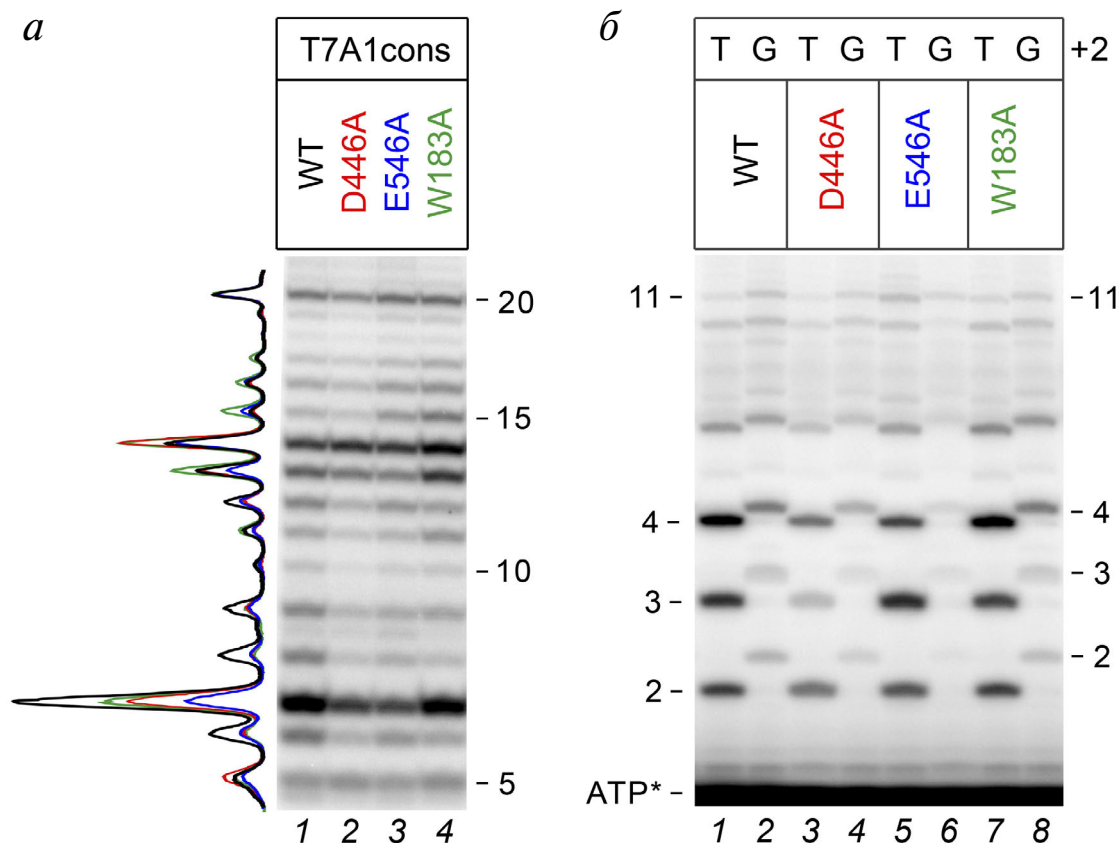


Рис. 2. Влияние замен в CRE-районе РНКП *E. coli* на синтез РНК в процессе инициации транскрипции. *а* – Электрофореграмма РНК-продуктов транскрипции с промотора T7A1cons, разделенных в 23%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Слева изображен профиль интенсивности сигнала, нормированный по интенсивности полноразмерного продукта размером в 20 нуклеотидов для каждой дорожки. *б* – Электрофореграмма РНК-продуктов, полученных при инициации транскрипции с промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, разделенных в 30%-ном ПААГ в денатурирующих условиях

нее, нарушают взаимодействия РНКП с остатками в +2 и +1 положениях промотора [2, 12]. Для изучения влияния CRE-района на стадию инициации мы остановили свой выбор на промоторе T7A1cons, который имеет консенсусный –10 элемент (последовательность ТАТААТ) и –35 элемент, близкий консенсусному (консенсус TTGACA) (рис. 1, б). Этот промотор высокоактивен в реакциях синтеза полноразмерных и abortивных РНК-продуктов *in vitro*, образует стабильные промоторные комплексы и является хорошей моделью для изучения механизмов ухода с промотора [3, 7, 8, 25, 38, 39]. Мы протестировали полученные мутантные полимеразы на данном промоторе, а также его варианте, содержащем остаток гуанина в +2 положении (замена +2Т на +2G, рис. 1, б).

В первом из проведенных тестов в реакцию добавляли нуклеотидные субстраты, достаточные для синтеза РНК длиной 20 нуклеотидов, при этом синтез более длинных продуктов был невозможен из-за отсутствия в смеси уридинового нуклеотида, который должен включаться в 21 положение. Было обнаружено, что в этих условиях все РНКП обладают близкой транскрипционной активностью и способны к переходу к элонгации и синтезу 20-нуклеотидной РНК (рис. 2, а). Все полимеразы также синтезируют большое количество abortивных продуктов длиной до 15 нуклеотидов, но у мутантных РНКП, особенно у фермента с заменой D446, наблюдается снижение относительного количества abortивных продуктов размером 6–14 нуклеотидов.

Для того чтобы более точно оценить влияние мутаций в РНКП и замены +2G в последовательности промотора на эффективность синтеза коротких abortивных продуктов, мы провели реакцию синтеза РНК с использованием [γ - 32 P]АТР, что позволило ввести радиоактивную метку строго в 5'-конец синтезируемой РНК. Было показано, что замена +2G приводит к заметному снижению количества синтезируемых коротких РНК длиной 2–4 нуклеотида, но слабее влияет на синтез более длинных продуктов (рис. 2, б). Подобное явление наблюдается как в случае РНКП дикого типа (WT, дорожки 1 и 2), так и в случае мутантных РНКП. В то же время в случае мутантных РНКП с заменами D446A и E546A происходит дополнительное снижение количества 2–4 нуклеотидных РНК для обоих вариантов промотора (дорожки 1, 3 и 5 для исходного промотора и 2, 4 и 6 для промотора с заменой +2G).

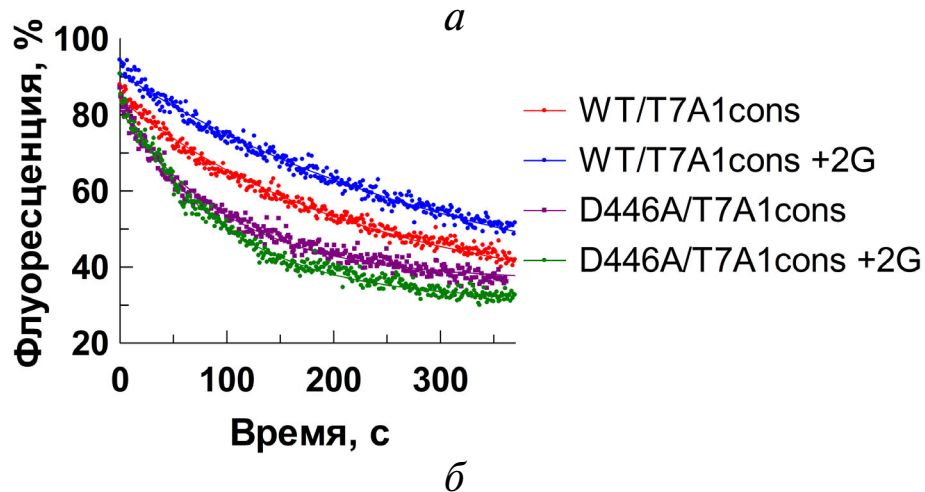
Соотношение эффективности abortивного и продуктивного синтеза РНК является важной характеристикой эффективности перехода от

инициации к элонгации транскрипции. Таким образом, наблюдаемые эффекты позволяют предположить, что замена +2G в промоторе, а также мутации в CRE-районе РНКП могут влиять на скорость ухода с промотора, изменяя контакты РНКП с промоторной ДНК.

Измерение стабильности промоторного комплекса методом молекулярных маяков. Использованный нами метод молекулярных маяков основан на изменениях флуоресценции меченой σ -субъединицы при связывании РНКП с промоторной ДНК. Флуорофор ковалентно присоединен к остатку цистеина в положении 211 σ^{70} -субъединицы, расположенному рядом с районом 2, взаимодействующим с –10 элементом промотора. При образовании промоторного комплекса происходят конформационные перестройки, в результате которых ароматические остатки района перестают гасить свечение флуорофора и происходит усиление флуоресценции. Это позволяет в режиме реального времени наблюдать за формированием и разрушением промоторного комплекса [33, 34, 40, 41].

Чтобы понять роль остатка +2G в стабилизации промоторного комплекса, мы измерили кинетику диссоциации промоторного комплекса в присутствии конкурента ДНК (гепарина) с использованием промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G. В процессе диссоциации комплекса происходит снижение флуоресценции за счет разрыва контактов σ -субъединицы с –10 элементом промотора (рис. 3, а). В соответствии с нашими ожиданиями, замена +2G приводит к достоверному увеличению стабильности промоторного комплекса (время полужизни $t_{1/2}$ возрастает от 158 до 209 с для РНКП WT; рис. 3, а и б).

Также мы протестировали РНКП с заменами аминокислотных остатков, контактирующих с +2G, которые способны нарушать эти взаимодействия [2, 6, 11, 12]. Было показано, что точечная замена D446A приводит к снижению стабильности промоторного комплекса по сравнению с РНКП WT ($t_{1/2} = 68$ и 158 с соответственно; рис. 3, б). Кроме того, эта замена делает РНКП неспособной распознавать замену +2G в промоторе ($t_{1/2}$ не возрастает). Замена E546A приводит к аналогичному, но более слабому эффекту. Замена W183A приводит к значительной дестабилизации промоторного комплекса (рис. 3, б). Таким образом, в соответствии с опубликованными структурными и биохимическими данными контакты остатка +2G в промоторе T7A1cons с CRE-карманом увеличивают стабильность промоторного комплекса, и имеющаяся экспериментальная модель хорошо подходит для изучения роли данных взаимодействий в процессе ухода с промотора.



б

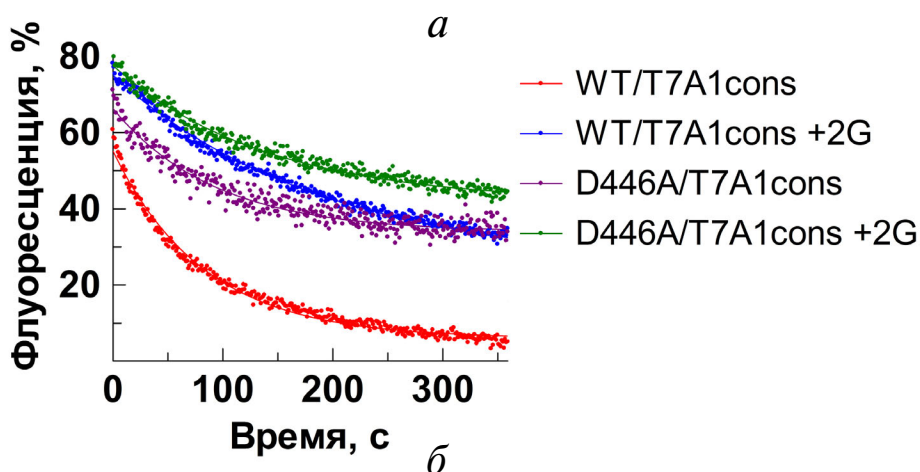
РНКП	Стабильность промоторного комплекса $t_{1/2}$, с		Отношение +2G/WT
	T7A1cons WT	T7A1cons+2G	
WT	157,9 ± 9,2	209,0 ± 19,1	1,32
D446A	67,8 ± 5,1	60,3 ± 8,1	0,89
E546A	121,0 ± 10,4	131,5 ± 14,0	0,92
W183A	49,1 ± 11,5	-	-

Рис. 3. Влияние остатка +2G на стабильность промоторного комплекса. Измерения проводили методом молекулярных маяков. *a* – Кинетики диссоциации промоторного комплекса в присутствии гепарина для промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G для РНКП WT и D446A. *б* – Значения времен полужизни промоторных комплексов ($t_{1/2}$) для РНКП WT и РНКП, содержащих мутации в CRE-районе, на исследуемых промоторах. Измерения с РНКП W183A на промоторе T7A1cons+2G не проводили

Измерение скорости и эффективности ухода РНКП с промотора методом молекулярных маяков. С использованием описанной выше модельной системы мы измерили скорость и эффективность ухода РНКП с промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G в процессе инициации транскрипции. При проведении экспериментов к сформированным промоторным комплексам добавляли нуклеотидные субстраты, а также избыток немеченой σ -субъединицы (чтобы избежать повторного формирования комплексов меченой РНКП с промотором). Это позволяло наблюдать за разрывом контактов РНКП с промотором при переходе к элонгации транскрипции в реальном времени. Процесс ухода с промотора протекает относительно быстро и описывается уравнением кинетики первого порядка (рис. 4, *a*). В качестве величины, описывающей скорость данного процесса, удобно использовать время, за которое половина активных комплексов переходят к элонгации ($t_{1/2}$). При этом не вся РНКП, которая образовала открытый промоторный комплекс, разрывает

контакты с промотором и уходит в элонгацию. Эта фракция транскрипционного комплекса существует длительное время и выглядит как плато на кривой флуоресценции. Так как разрыв контактов σ -субъединицы с -10 элементом промотора, который фиксируется по снижению флуоресценции, происходит лишь при переходе к элонгации транскрипции, данная фракция может соответствовать как каталитически неактивным комплексам, так и инициаторным комплексам, осуществляющим abortивный синтез РНК, но неспособным покинуть промотор. Для РНКП WT $t_{1/2}$ составляет ~ 60 с, а доля неактивного промоторного комплекса $\sim 8\%$ (рис. 4, *a* и *б*). Замена +2G в промоторе приводит к уменьшению скорости ухода с промотора более, чем в 2 раза ($t_{1/2}$ возрастает до 136 с), а доля неактивных комплексов возрастает в 3 раза (до 24%).

Чтобы понять, связаны ли наблюдаемые эффекты с контактами +2G с CRE-карманом, мы протестировали влияние замен D446A и E546A на процесс перехода к элонгации. Мутация



РНКП	Время ухода с промотора $t_{1/2}$, с		Отношение +2G/WT
	T7A1cons WT	T7A1cons+2G	
WT	59,9 ± 5,4	136,2 ± 7,2	2,3
D446A	58,5 ± 7,9	101,5 ± 7,3	1,7
E546A	47,5 ± 3,9	120,6 ± 4,5	2,5
W183A	82,5 ± 1,5	-	-

РНКП	Доля неактивного RPint, %		Отношение +2G/WT
	T7A1cons WT	T7A1cons+2G	
WT	7,8 ± 4	24,3 ± 1,3	3,1
D446A	37,4 ± 4,9	40,4 ± 1,8	1,1
E546A	11 ± 1	21,4 ± 5	1,9
W183A	8,9 ± 1,8	-	-

Рис. 4. Влияние остатка +2G на процесс ухода РНКП с промотора. *а* – Кинетики ухода с промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G, измеренные для РНКП WT и D446A. *б* – Значения времен ухода с промоторов ($t_{1/2}$) для РНКП WT и РНКП, содержащих мутации в CRE-районе. *в* – Значения доли неактивного инициаторного комплекса (RPint)

D446A не влияет на скорость ухода с промотора T7A1cons, но приводит к значительному возрастанию доли неактивных комплексов (~30%). На промоторе T7A1cons+2G в случае РНКП D446A время ухода с промотора увеличивается до 101,5 с, а доля неактивных комплексов доходит до 40%. Замена E546A незначительно увеличивает скорость ухода с промотора T7A1cons, но не влияет на долю неактивных комплексов. В случае замены W183A мы наблюдаем небольшое замедление скорости ухода с промотора.

Таким образом, полученные методом молекулярных маяков результаты указывают на то, что замена +2G сильно снижает скорость перехода к элонгации и увеличивает долю неактивных комплексов. Мутация D446A не влияет на

скорость, но также приводит к формированию большого количества неактивных комплексов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы впервые исследовали влияние контактов РНКП с CRE-участком промотора на стабильность промоторного комплекса и процесс перехода к элонгации, используя метод молекулярных маяков на двунитевом промоторе. Этот метод позволяет детектировать формирование и разрыв контактов σ -субъединицы с -10 элементом промотора в ходе инициации транскрипции. Мы показали, что присутствие остатка +2G в промоторе повышает ста-

бильность промоторного комплекса, что согласуется с опубликованными данными [2, 12]. При этом точечные мутации D446A и E546A, которые нарушают взаимодействия остатка +2G с CRE-карманом, делают промоторные комплексы нечувствительными к замене +2G в промоторе. Замена W183A приводит к значительному снижению времени жизни комплексов (примерно в 3 раза), что подтверждает имеющиеся данные о роли взаимодействий W183 с нематричной цепью промотора в стабилизации промоторного комплекса [12, 13]. В целом, проведенные эксперименты подтверждают наличие функциональных взаимодействий РНКП с CRE-участком промотора в использованной модельной системе.

Это позволило нам изучить роль CRE-кармана РНКП и взаимодействующего с ним участка ДНК в процессе ухода с промотора. Было показано, что полученные нами точечные мутации в РНКП либо не влияют на скорость ухода с промотора, либо оказывают относительно небольшой эффект (некоторое снижение скорости наблюдается только в случае замены W183A). При этом введение остатка +2G в промотор приводит к значительному замедлению скорости ухода с промотора и увеличению доли неактивных комплексов. Данный эффект мог бы объясняться взаимодействием +2G с CRE-карманом. Однако замена D446A способна лишь частично супрессировать эффект снижения скорости ухода с промотора T7A1cons+2G (ускорение на ~25% относительно РНКП WT), а замена E546A на этот процесс практически не влияет. Таким образом, контакты CRE-кармана с +2G почти не влияют на скорость ухода с промотора. Согласно структурным данным, полученным для RPint *E. coli* и *T. thermophilus* с короткими РНК-продуктами размером 4 и 6 нуклеотидов, в этих комплексах контакты +2G с CRE-карманом не видны [3, 4]. Это указывает на то, что описанные контакты разрываются раньше, чем контакты нематричной цепи ДНК с σ -субъединицей. Вероятно, этот факт может объяснять такой небольшой эффект замены D446A на скорость ухода с промотора.

Анализ abortивных продуктов РНК в опытах по транскрипции *in vitro* показывает, что эффективность abortивного синтеза слабо коррелирует со скоростью ухода РНКП с промотора. Так, количество коротких abortивных транскриптов, синтезируемых на промоторе T7A1cons+2G, значительно меньше, чем в случае исходного промотора. Вероятно, это объясняется тем, что наличие пары rG/dC в РНК-ДНК-гибриде (по сравнению с rU/dA в исходном промоторе) способствует более ста-

бильному удержанию коротких РНК в составе инициаторного комплекса [42]. В то же время скорость перехода к элонгации в случае этого промотора оказывается значительно ниже. Кроме того, на промоторе T7A1cons+2G происходит значительное увеличение доли неактивных комплексов в сравнении с исходным промотором. Это может объясняться замедленной транслокацией РНКП в таких промоторных комплексах, а также формированием неактивных интермедиатов транскрипции без диссоциации коротких РНК-продуктов. Действительно, исследования на единичных молекулах показали, что во время abortивного синтеза возможно формирование пауз транскрипции, а также кратковременный или длительный переход комплекса в смещенное неактивное состояние без диссоциации транскрипта [10, 32]. Наличие таких комплексов оказывает значительное влияние на скорость ухода с промотора [32]. Возможно, замена +2G приводит к увеличению доли таких комплексов, что можно было бы выявить в дальнейших исследованиях на уровне единичных молекул.

Замена D446A слабо влияет на скорость перехода к элонгации, хотя и снижает эффективность abortивного синтеза. Кроме того, замена D446A не компенсирует снижение скорости перехода к элонгации и долю неактивных комплексов на промоторе T7A1cons+2G. Это позволяет полагать, что наблюдаемые в случае этого промотора эффекты не связаны с контактами +2G с CRE-карманом. Более того, замена D446A значительно увеличивает долю неактивных комплексов в случае промотора T7A1cons, не содержащего остатка +2G. Можно предположить, что как специфические (при наличии +2G), так и неспецифические (при его отсутствии) контакты остатка D446 с нематричной цепью ДНК могут подавлять формирование неактивных комплексов в процессе инициации. При мутации данного остатка значительная часть комплексов остается в неактивном состоянии, но при этом активные комплексы уходят с промотора со скоростью, сопоставимой с РНКП дикого типа.

Можно было бы предположить, что нарушение контактов холофермента РНКП с промоторной ДНК должно приводить к ускорению скорости перехода к элонгации (облегчая разрыв контактов с промотором), однако это не так. Замена W183A замедляет уход с промотора, хотя и снижает стабильность промоторного комплекса. Возможно, остаток W183, контактируя с нематричной цепью ДНК, способствует транслокации РНКП во время начальных стадий синтеза РНК. В случае РНКП с заменой

D446A также происходит снижение стабильности промоторного комплекса, но нет влияния на скорость ухода с промотора. Таким образом, мы не наблюдаем однозначных соответствий между скоростью ухода с промотора и стабильностью промоторного комплекса.

Обобщая имеющиеся данные, можно сделать вывод, что наличие остатка +2G в начально транскрибируемой области промотора может влиять не только на стабильность промоторных комплексов, но и на процесс перехода к элонгации, изменяя эффективность абортного синтеза и скорость ухода РНКП с промотора. При этом интенсивность синтеза коротких РНК в процессе инициации не отражает скорость перехода от инициации к элонгации транскрипции. Мутации в CRE-районе РНКП способны увеличивать долю неактивных инициаторных комплексов (в случае замены D446A) или замедлять процесс перехода к элонгации (W183A),

причем эти эффекты не связаны с узнаванием гуанина в +2 положении промотора, а могут объясняться взаимодействиями этого района со следующими нуклеотидами нематричной цепи ДНК. Выявлению подробных механизмов данных процессов могут помочь дальнейшие исследования инициации транскрипции, прежде всего, на уровне единичных молекул.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01393).

Благодарности. Авторы благодарят И. Арцимович за предоставленные плазмиды.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

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. Zhang, Y., Feng, Y., Chatterjee, S., Tuske, S., Ho, M. X., Arnold, E., and Ebright, R. H. (2012) Structural basis of transcription initiation, *Science*, **338**, 1076-1080, doi: 10.1126/science.1227786.
3. Basu, R. S., Warner, B. A., Molodtsov, V., Pupov, D., Esyunina, D., Fernandez-Tornero, C., Kulbachinskiy, A., and Murakami, K. S. (2014) Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme, *J. Biol. Chem.*, **289**, 24549-24559, doi: 10.1074/jbc.M114.584037.
4. Zuo, Y., and Steitz, T. A. (2015) Crystal structures of the *E. coli* transcription initiation complexes with a complete bubble, *Mol. Cell*, **58**, 534-540, doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.010.
5. Mitchell, J. E., Zheng, D., Busby, S. J., and Minchin, S. D. (2003) Identification and analysis of "extended -10" promoters in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4689-4695, doi: 10.1093/nar/gkg694.
6. Vvedenskaya, I. O., Vahedian-Movahed, H., Zhang, Y., Taylor, D. M., Ebright, R. H., and Nickels, B. E. (2016) Interactions between RNA polymerase and the core recognition element are a determinant of transcription start site selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E2899-E2905, doi: 10.1073/pnas.1603271113.
7. Kulbachinskiy, A., and Mustaev, A. (2006) Region 3.2 of the sigma subunit contributes to the binding of the 3'-initiating nucleotide in the RNA polymerase active center and facilitates promoter clearance during initiation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 18273-18276, doi: 10.1074/jbc.C600060200.
8. 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.
9. Duchi, D., Bauer, D. L., Fernandez, L., Evans, G., Robb, N., Hwang, L. C., Gryte, K., Tomescu, A., Zawadzki, P., Morichaud, Z., Brodolin, K., and Kapanidis, A. N. (2016) RNA polymerase pausing during Initial transcription, *Mol. Cell*, **63**, 939-950, doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.011.
10. Dulin, D., Bauer, D. L. V., Malinen, A. M., Bakermans, J. J. W., Kaller, M., Morichaud, Z., Petushkov, I., Depken, M., Brodolin, K., Kulbachinskiy, A., and Kapanidis, A. N. (2018) Pausing controls branching between productive and non-productive pathways during initial transcription in bacteria, *Nat. Commun.*, **9**, 1478, doi: 10.1038/s41467-018-03902-9.
11. Vvedenskaya, I. O., Vahedian-Movahed, H., Bird, J. G., Knoblauch, J. G., Goldman, S. R., Zhang, Y., Ebright, R. H., and Nickels, B. E. (2014) Transcription. Interactions between RNA polymerase and the "core recognition element" counteract pausing, *Science*, **344**, 1285-1289, doi: 10.1126/science.1253458.
12. Petushkov, I., Pupov, D., Bass, I., and Kulbachinskiy, A. (2015) Mutations in the CRE pocket of bacterial RNA polymerase affect multiple steps of transcription, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5798-5809, doi: 10.1093/nar/gkv504.
13. Wiesler, S. C., Weinzierl, R. O., and Buck, M. (2013) An aromatic residue switch in enhancer-dependent bacterial RNA polymerase controls transcription intermediate complex activity, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5874-5886, doi: 10.1093/nar/gkt271.
14. Mekler, V., Kortkhonjia, E., Mukhopadhyay, J., Knight, J., Revyakin, A., Kapanidis, A. N., Niu, W., Ebright, Y. W., Levy, R., and Ebright, R. H. (2002) Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex, *Cell*, **108**, 599-614.
15. Straney, D. C., and Crothers, D. M. (1987) A stressed intermediate in the formation of stably initiated RNA chains at the *Escherichia coli lac* UV5 promoter, *J. Mol. Biol.*, **193**, 267-278, doi: 10.1016/0022-2836(87)90218-x.

16. Kapanidis, A. N., Margeat, E., Ho, S. O., Kortkhonjia, E., Weiss, S., and Ebricht, R. H. (2006) Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism, *Science*, **314**, 1144-1147, doi: 10.1126/science.1131399.
17. Revyakin, A., Liu, C., Ebricht, R. H., and Strick, T. R. (2006) Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching, *Science*, **314**, 1139-1143, doi: 10.1126/science.1131398.
18. Henderson, K. L., Felth, L. C., Molzahn, C. M., Shkel, I., Wang, S., Chhabra, M., Ruff, E. F., Bieter, L., Kraft, J. E., and Record, M. T., Jr. (2017) Mechanism of transcription initiation and promoter escape by *E. coli* RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E3032-E3040, doi: 10.1073/pnas.1618675114.
19. Winkelman, J. T., and Gourse, R. L. (2017) Open complex DNA scrunching: a key to transcription start site selection and promoter escape, *BioEssays*, **39**, doi: 10.1002/bies.201600193.
20. Carpousis, A. J., and Gralla, J. D. (1985) Interaction of RNA polymerase with *lacUV5* promoter DNA during mRNA initiation and elongation. Footprinting, methylation, and rifampicin-sensitivity changes accompanying transcription initiation, *J. Mol. Biol.*, **183**, 165-177, doi: 10.1016/0022-2836(85)90210-4.
21. Ko, J., and Heyduk, T. (2014) Kinetics of promoter escape by bacterial RNA polymerase: effects of promoter contacts and transcription bubble collapse, *Biochem. J.*, **463**, 135-144, doi: 10.1042/BJ20140179.
22. Samanta, S., and Martin, C. T. (2013) Insights into the mechanism of initial transcription in *Escherichia coli* RNA polymerase, *J. Biol. Chem.*, **288**, 31993-32003, doi: 10.1074/jbc.M113.497669.
23. Murakami, K. S., Masuda, S., and Darst, S. A. (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution, *Science*, **296**, 1280-1284, doi: 10.1126/science.1069594.
24. Li, L., Molodtsov, V., Lin, W., Ebricht, R. H., and Zhang, Y. (2020) RNA extension drives a stepwise displacement of an initiation-factor structural module in initial transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 5801-5809, doi: 10.1073/pnas.1920747117.
25. Petushkov, I., Esyunina, D., Mekler, V., Severinov, K., Pupov, D., and Kulbachinskiy, A. (2017) Interplay between sigma region 3.2 and secondary channel factors during promoter escape by bacterial RNA polymerase, *Biochem. J.*, **474**, 4053-4064, doi: 10.1042/BCJ20170436.
26. Kammerer, W., Deuschle, U., Gentz, R., and Bujard, H. (1986) Functional dissection of *Escherichia coli* promoters: information in the transcribed region is involved in late steps of the overall process, *EMBO J.*, **5**, 2995-3000.
27. Hsu, L. M., Cobb, I. M., Ozmore, J. R., Khoo, M., Nahm, G., Xia, L., Bao, Y., and Ahn, C. (2006) Initial transcribed sequence mutations specifically affect promoter escape properties, *Biochemistry*, **45**, 8841-8854, doi: 10.1021/bi060247u.
28. Hsu, L. M. (2002) Promoter clearance and escape in prokaryotes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, 191-207, doi: 10.1016/s0167-4781(02)00452-9.
29. Hsu, L. M. (2009) Monitoring abortive initiation, *Methods*, **47**, 25-36, doi: 10.1016/j.ymeth.2008.10.010.
30. Vo, N. V., Hsu, L. M., Kane, C. M., and Chamberlin, M. J. (2003) *In vitro* studies of transcript initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. 3. Influences of individual DNA elements within the promoter recognition region on abortive initiation and promoter escape, *Biochemistry*, **42**, 3798-3811, doi: 10.1021/bi026962v.
31. Heyduk, E., and Heyduk, T. (2018) DNA template sequence control of bacterial RNA polymerase escape from the promoter, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 4469-4486, doi: 10.1093/nar/gky172.
32. Lerner, E., Chung, S., Allen, B. L., Wang, S., Lee, J., Lu, S. W., Grimaud, L. W., Ingargiola, A., Michalet, X., Alhadid, Y., Borukhov, S., Strick, T. R., Taatjes, D. J., and Weiss, S. (2016) Backtracked and paused transcription initiation intermediate of *Escherichia coli* RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E6562-E6571, doi: 10.1073/pnas.1605038113.
33. Mekler, V., Pavlova, O., and Severinov, K. (2011) The interaction of *E. coli* RNA polymerase σ^{70} subunit with promoter elements in the context of free σ^{70} , RNA polymerase holoenzyme and the β' - σ^{70} complex., *J. Biol. Chem.*, **286**, 270-279, doi: 10.1074/jbc.M110.174102.
34. Mekler, V., and Severinov, K. (2015) Use of RNA polymerase molecular beacon assay to measure RNA polymerase interactions with model promoter fragments, *Methods Mol. Biol.*, **1276**, 199-210, doi: 10.1007/978-1-4939-2392-2_11.
35. 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.
36. Petushkov, I., Esyunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2017) σ^{38} -dependent promoter-proximal pausing by bacterial RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 3006-3016, doi: 10.1093/nar/gkw1213.
37. Pupov, D., Petushkov, I., Esyunina, D., Murakami, K. S., and Kulbachinskiy, A. (2018) Region 3.2 of the σ factor controls the stability of rRNA promoter complexes and potentiates their repression by DksA, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 11477-11487, doi: 10.1093/nar/gky919.
38. Pupov, D., Esyunina, D., Feklistov, A., and Kulbachinskiy, A. (2013) Single-strand promoter traps for bacterial RNA polymerase, *Biochem. J.*, **452**, 241-248, doi: 10.1042/BJ20130069.
39. Pupov, D., Miropolskaya, N., Sevostyanova, A., Bass, I., Artsimovitch, I., and Kulbachinskiy, A. (2010) Multiple roles of the RNA polymerase β' SW2 region in transcription initiation, promoter escape, and RNA elongation, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5784-5796, doi: 10.1093/nar/gkq355.
40. Mekler, V., Minakhin, L., Kuznedelov, K., Mukhamedyarov, D., and Severinov, K. (2012) RNA polymerase-promoter interactions determining different stability of the *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus* transcription initiation complexes, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11352-11362, doi: 10.1093/nar/gks973.
41. Mekler, V., Minakhin, L., and Severinov, K. (2011) A critical role of downstream RNA polymerase-promoter interactions in the formation of initiation complex, *J. Biol. Chem.*, **286**, 22600-22608, doi: 10.1074/jbc.M111.247080.
42. Sugimoto, N., Nakano, S., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M., and Sasaki, M. (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes, *Biochemistry*, **34**, 11211-11216, doi: 10.1021/bi00035a029.

**ROLE OF THE INTERACTIONS OF THE CRE REGION
OF *Escherichia coli* RNA POLYMERASE
WITH NONTEMPLATE DNA DURING PROMOTER ESCAPE***

I. V. Petushkov and A. V. Kulbachinskiy**

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

Received May 7, 2020

Revised June 9, 2020

Accepted June 10, 2020

RNA polymerase (RNAP) recognizes promoter DNA through many interactions that determine specificity of transcription initiation. In addition to the dedicated transcription initiation σ factor in bacteria, the core enzyme of RNAP can also participate in promoter recognition. In particular, guanine residue at the +2 position (+2G) of the nontemplate DNA strand is bound in the CRE pocket formed by the RNAP β subunit. Here, we analyzed the role of these contacts in the process of promoter escape by RNAP by studying point mutations in the β subunit of *Escherichia coli* RNAP that disrupted these interactions. We found that the presence of +2G in the promoter slowed down the rate of promoter escape and increased proportion of inactive complexes. Amino acid substitutions in the CRE pocket decreased the promoter complex stability and changed the pattern of short RNA products synthesized during initiation, but did not significantly affect the rate of transition to elongation, regardless of the presence of +2G. Thus, the contacts of the CRE pocket with +2G do not make a significant contribution to the kinetics of promoter escape by RNAP, while the observed changes in the efficiency of abortive synthesis are not directly related to the rate of promoter escape.

Keywords: RNA polymerase, CRE pocket, promoter escape