

УДК 577.214.44

РЕГУЛЯЦИЯ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ У БАКТЕРИЙ

© 2011 г. С. А. Прошкин, А. С. Миронов*

Государственный научный центр “ГосНИИ генетика”, Москва 117545

Поступила в редакцию 19.08.2010 г.

Принята к печати 23.09.2010 г.

Элонгационный комплекс, включающий РНК-полимеразу, ДНК-матрицу и синтезируемую РНК, — центральный интермедиат в цикле транскрипции. Именно он служит главной мишенью для различных регуляторных факторов. В течение последних нескольких лет получено много структурных и биохимических данных, которые проливают свет на детали функционирования РНК-полимеразы. Недавно обнаружили функциональное взаимодействие между элонгационным комплексом РНК-полимеразы и транслирующей рибосомой. В представленном обзоре обсуждаются механизмы регуляции элонгации транскрипции у бактерий.

Ключевые слова: РНК-полимераза, элонгация транскрипции, прокариоты.

REGULATION OF BACTERIAL TRANSCRIPTION ELONGATION, by S. A. Proshkin, A. S. Mironov (State Research Center “GosNII genetika”, Moscow 117545; *e-mail: alexmir_98@yahoo.com). The elongation complex, which involves RNA polymerase, DNA template and nascent RNA, is a central intermediate in transcription cycle. It is elongation complex that represents the main target for the action of different regulatory factors. Over the past several years, many structural and biochemical data have been obtained that shed light upon the molecular details of RNA polymerase function. Cooperation between RNA polymerase elongation complex and translating ribosome was established recently. Here we discuss the mechanisms of the regulation of bacterial transcription elongation.

Keywords: RNA polymerase, transcription elongation, prokaryotes.

Транскрипция, осуществляемая РНК-полимеразой, — ключевой этап экспрессии генов и клеточной регуляции. Используя нуклеозидтрифосфаты (НТФ) в качестве субстрата, РНК-полимераза синтезирует РНК по матрице ДНК [1, 2]. Минимальный фермент (кóр) РНК-полимеразы, осуществляющий элонгацию транскрипции, у бактерий состоит из четырех субъединиц (β' , β , 2α и ω) массой около 0.4 МДа. Элонгационный комплекс служит конечной мишенью для различных регуляторных белковых факторов и сигналов, закодированных в ДНК и/или РНК [3]. Кроме того, взаимодействие РНК-полимеразы с компонентами других клеточных процессов (трансляции или репарации, например) позволяет координировать транскрипцию с отдельными этапами экспрессии генов.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЭЛОНГАЦИОННОГО КОМПЛЕКСА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Функциональные участки РНК-полимеразы

В ходе обширных биохимических и генетических исследований локализован активный центр РНК-полимеразы [4–6], а также участки связыва-

ния нуклеиновых кислот, необходимых для стабильности элонгационного комплекса [7–11]. Выяснилось, что три остатка аспарагиновой кислоты в консервативном у всех многосубъединичных РНК-полимераз мотиве **NADFDGD** самой большой субъединицы (β') хелатируют каталитический ион Mg^{2+} . Субъединицы β' и β формируют три сайта связывания: 1) сайт связывания дуплекса ДНК из ~10 п.н. перед активным центром, 2) сайт связывания гибридного участка РНК-ДНК длиной 8–9 п.н., образующегося в “транскрипционном пузырьке” из 12–15 п.н. расплавленной ДНК, и 3) сайт связывания одноцепочечного участка РНК, удаленного на ~8–14 н. от 3'-конца РНК [12] (рис. 1). Установление пространственной структуры кóра РНК-полимеразы [13] позволило предложить модель элонгационного комплекса, в котором нуклеиновые кислоты расположены в соответствии с данными, полученными с помощью фотоаффинных сшивок белка с ДНК и РНК [14]. В это же время определили пространственную структуру эукариотической РНК-полимеразы II и обнаружили ее поразительное структурное сходство с бактериальным ферментом как в общем плане строения, так и в относительном расположении функциональных элементов [15, 16].

Принятые сокращения: TL — триггерная петля; TH — триггерная спираль; VH — α -спиральный мостик.

* Эл. почта: alexmir_98@yahoo.com

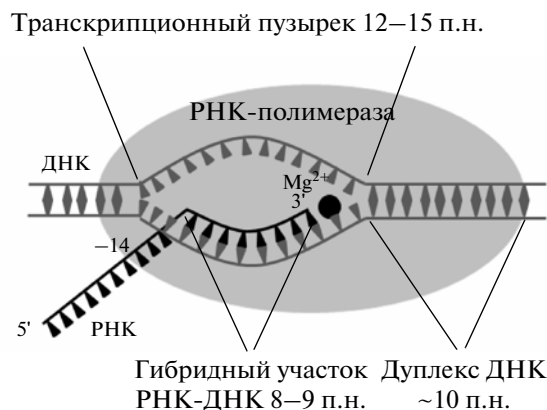


Рис. 1. Модель элонгационного комплекса РНК-полимеразы. Схематично показано расположение нуклеиновых кислот в составе комплекса, черный кружок символизирует активный центр фермента с каталитическим ионом магния.

Позже удалось определить пространственные структуры реконструированных элонгационных комплексов [17–21]. В них нуклеиновые кислоты представлены короткими цепочками ДНК и РНК, полученными химическим синтезом. В этих комплексах РНК частично комплементарна матрице ДНК в пределах неспаренной нуклеотидной последовательности (искусственного “транскрипционного пузырька”). Информация о молекулярных деталях пространственной организации элонгационного комплекса позволила выделить вероятные структурные элементы РНК-полимеразы, ответственные за стабильность, процессивность и отклик на регуляторные сигналы. Важную особенность РНК-полимеразы представляют подвижные домены, необходимые для катализа и перемещения фермента по матрице ДНК. При построении структурной модели РНК-полимеразы ее домены, а также функционально значимые полипептидные петли получили специальные наименования, основанные на их расположении или предполагаемой функции (рис. 2).

Выяснилось, что в элонгационном комплексе передний (по ходу движения РНК-полимеразы) дуплекс ДНК располагается в основном канале между субъединицами β' и β . Прямые контакты РНК-полимеразы с участком ДНК из ~10 п.н. образуют функциональный сайт связывания ДНК. Подвижный домен β' , названный “зажимом” (clamp), удерживает ДНК в канале [14, 17, 19].

Непосредственно перед активным центром, расположенном в конце основного канала, происходит, вероятно, плавление ДНК (позиция +2, считая от нуклеотидсвязывающего участка в положении +1) [17, 22]. Полипептидная петля субъединицы β , “петля вилки-2” (fork loop-2, аминокислотные остатки 413–451 в РНК-полимеразе *Thermus thermophilus*) стерически блокирует дальнейшее поступле-

ние спирали ДНК в активный центр, играя, по-видимому, главную роль в расплетании дуплекса ДНК и поддержании переднего края транскрипционного пузырька. В этом месте ДНК изгибается под углом $\sim 90^\circ$, а далее формируется гибридный участок РНК-ДНК длиной 8–9 п.н. [8, 17, 19, 20]. Гибрид РНК-ДНК полностью укрыт в канале, стенки которого образованы субъединицами β' и β . Доступ к активному центру через основную канал блокирован нуклеиновыми кислотами. Однако под активным центром располагается вторичный канал (secondary channel), который очевидно служит для поступления нуклеотидов к каталитическому участку и связыванию 3'-концевого одноцепочечного участка РНК при возвратном смещении фермента (см. ниже). Вторичный канал имеет вид воронки, постепенно сужаясь в направлении активного центра (рис. 2).

После синтеза 9 н. цепь РНК отделяется от ДНК. Петля β' -субъединицы, названная “крышкой” (lid, аминокислотные остатки 525–539), стерически препятствует образованию более протяженного гибрида РНК-ДНК, облегчая вытеснение РНК [20, 23–26]. Восстановление дуплекса ДНК на заднем крае транскрипционного пузырька также вносит вклад в отделение РНК [23, 26]. В стабилизацию гибридного участка вовлечены, вероятно, еще петля “руль” (rudder, аминокислотные остатки 582–602) β' -субъединицы [27] и “петля вилки-1” (fork loop-1, аминокислотные остатки 387–395) β -субъединицы. Три полипептидные петли “крышка”, “руль” и “петля вилки-1” образуют сеть межмолекулярных взаимодействий как между собой, так и с нуклеиновыми кислотами, формируя задний край транскрипционного пузырька [17]. Структурные элементы РНК-полимеразы у обоих концов гибридного участка РНК-ДНК обеспечивают поддержание постоянной его длины в ходе элонгации транскрипции.

Петля β' “крышка” (lid) и участок β “седловина” (saddle) формируют узкую пору, через которую проходит одноцепочечная РНК после отделения от гибрида РНК-ДНК [17, 19, 20]. Далее растущая цепь РНК попадает в более широкий канал между доменами β' “застежка” (zipper, аминокислотные остатки 26–47) и “цинковый палец” (аминокислотные остатки 51–83), с одной стороны, и доменом β “заслонка” (flap, аминокислотные остатки 703–830), с другой (рис. 2). Эти элементы РНК-полимеразы, по-видимому, вовлечены в узнавание сигналов терминирования и антитерминации, а также пауз, зависящих от шпильки в РНК [28–30].

Предполагается, что все три участка связывания нуклеиновых кислот аллостерически взаимодействуют с активным центром фермента, модулируя каталитические свойства РНК-полимеразы. Очевидно, что эти функциональные участки наряду с вторичным каналом могут служить мишенями для регуляторных факторов элонгации/терминации.

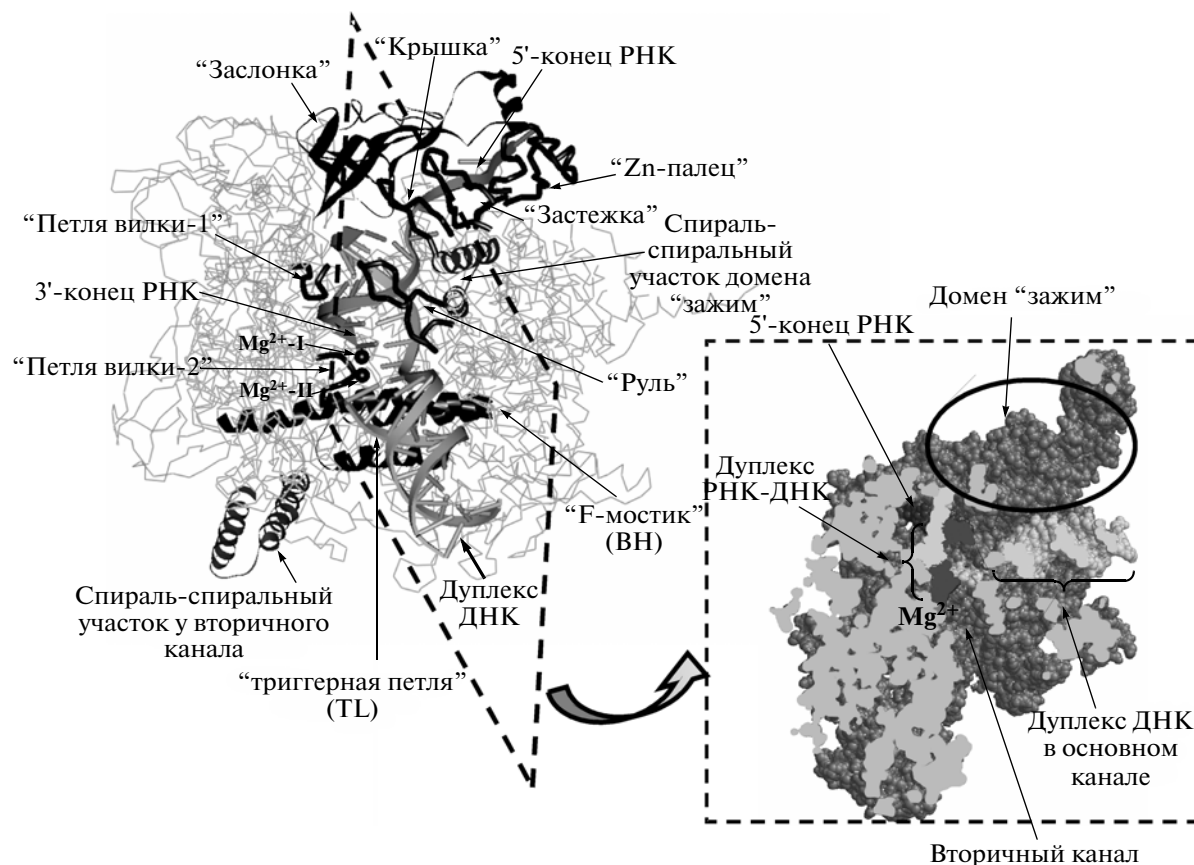


Рис. 2. Структура элонгационного комплекса РНК-полимеразы *Thermus thermophilus*. Выделены функциональные мобильные элементы белковой структуры, которые могут играть ключевую роль в цикле присоединения нуклеотидов, поддержании транскрипционного пузыря и во взаимодействии с РНК и дуплексом РНК-ДНК. Расположенные в активном центре фермента ионы магния показаны сферами. Также отмечены спираль-спиральные домены, взаимодействующие с элонгационными факторами (см. текст далее). Справа представлено сечение атомной модели элонгационного комплекса вдоль оси основного канала. Отмечено положение основного и вторичного каналов, а также дуплексов ДНК и РНК-ДНК. Рисунки подготовлены с помощью программ Accelrys DS-Visualizer и RasMol с использованием координат атомов элонгационного комплекса (номер депонирования 2O5J) из Банка белковых структур (Protein Data Bank) (см. также [17, 18]).

Каталитические активности

В ходе матричного синтеза РНК-полимераза катализирует нуклеофильную атаку 3'-гидроксила растущей цепи РНК на α -фосфат поступающего НТР, в результате чего происходит включение очередного нуклеотида в цепь РНК и высвобождение пирофосфата. Активный центр фермента содержит участок связывания 3'-конца РНК (*i*-сайт) и участок связывания поступающего НТР (*i* + 1-сайт). За образованием фосфодиэфирной связи следует транслокация вновь образованного 3'-конца РНК из *i* + 1-сайта в *i*-сайт, при этом *i* + 1-сайт освобождается для поступления нового НТР (посттранслокационное состояние). Вместе с этим происходит разъединение пары оснований в переднем дуплексе ДНК, образование пары оснований в заднем дуплексе и разъединение последней пары оснований в гибриде РНК-ДНК.

Кроме основной реакции синтеза РНК в том же самом активном центре при определенных услови-

ях могут протекать и реакции деградации РНК [31]. В случае смещения РНК-полимеразы назад на один нуклеотид против хода транскрипции, 3'-конец РНК снова оказывается в *i* + 1-сайте (претранслокационное состояние). В этом положении невозможно удлинение РНК, но возможна реакция пирофосфоролиза либо экзонуклеазное отщепление 3'-концевого нуклеотида. Кроме того, РНК-полимераза способна к возвратным смещениям (backtracking) сразу на несколько нуклеотидов (рис. 3). При этом 3'-конец РНК покидает активный центр фермента, а 3'-концевые нуклеотиды вытесняются из гибридного участка с ДНК. Одновременно происходит возвратное смещение транскрипционного пузыря, а длина гибрида РНК-ДНК остается постоянной. В таких ситуациях фермент сохраняет прочную связь с матрицей ДНК и РНК-продуктом, но теряет способность к синтезу РНК [8, 32, 33]. Небольшие смещения (на 2–3 н.), как правило, обратимы и приводят к паузам в транскрипции. Осцилирующая РНК-полимераза способна вернуться в

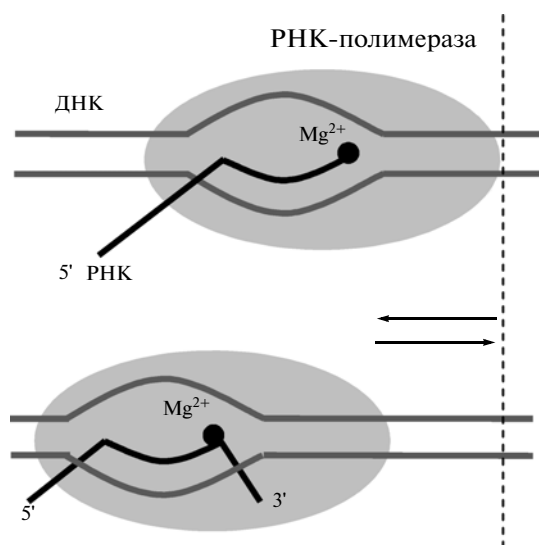


Рис. 3. Возвратное движение РНК-полимеразы в элонгации транскрипции. Схематично показана структура активного элонгационного комплекса (вверху) и комплекса, смещенного назад (внизу).

активное состояние, в котором 3'-конец РНК расположен в активном центре. При более далеком возвратном смещении (до 18 н.) происходит перманентная остановка транскрипции. Элонгационный комплекс инактивируется, образуя тупиковый комплекс (arrested). В таком комплексе 3'-конец РНК из активного центра проходит во вторичный канал РНК-полимеразы. Выступающий 3'-концевой фрагмент РНК может удаляться эндонуклеазным расщеплением фосфодиэфирной связи, против которой оказался активный центр. Реакции гидролиза значительно стимулируются факторами GreA или GreB [34]. В результате 3'-конец РНК снова занимает *i*-сайт, и фермент приобретает способность присоединять нуклеотиды. Эти ферментативные реакции играют большую роль в регуляции элонгации транскрипции и контроле точности синтеза РНК.

В активном центре РНК-полимеразы находятся два каталитических иона магния, расположенные на расстоянии 5–6 Å друг от друга [16, 18, 31, 35]. Один ион Mg^{2+I} постоянно связан с тремя остатками аспарагиновой кислоты β'-субъединицы (D739, D741 и D743). Его роль заключается в активации 3'-концевой ОН-группы РНК и координации α-фосфатной группы присоединяемого нуклеотида. Вторым ион Mg^{2+II} не связан постоянно, а поступает в активный центр вместе с субстратом NTP (при синтезе РНК) или с другими лигандами, такими как пиррофосфат (при фосфорилизе) или некоплементарными NTP (при экзонуклеазном расщеплении). Mg^{2+II} прямо связан с D739 β', а также через молекулы воды с D741 β' и E685, D686 β [18]. Во время синтеза РНК (или обратной реакции пиррофосфорилиза) Mg^{2+II} координирует α-, β- и γ-фосфаты NTP в пространственном расположении, нужном

для нуклеофильной атаки 3'-концевого гидроксила на α-фосфат. При эндонуклеазном расщеплении РНК два консервативных кислых аминокислотных остатка Gre-белков, по-видимому, непосредственно участвуют в координации Mg^{2+II} и атакующей молекулы воды для стабилизации пентавалентного переходного состояния фосфата [36–38].

Установление пространственных структур РНК-полимеразы, связанной с субстратом или его аналогом, позволило выявить каталитически активный сайт (*i* + 1) связывания поступающего NTP (insertion site), а также перекрывающиеся с ним дополнительные каталитически неактивные сайты связывания (preinsertion sites) [18]. Таким образом, связывание NTP в активном центре фермента происходит, вероятно, через ряд промежуточных состояний, позволяющих отбирать правильный субстрат перед его включением в растущую цепь РНК [18, 20, 21].

Активный центр РНК-полимеразы содержит два подвижных домена: F-мостик (α-спиральный мостик, ВН) и триггерную петлю (ТЛ) (рис. 2). Оба структурных элемента белка играют существенную роль в связывании NTP и транслокации. В установленных пространственных структурах РНК-полимеразы удалось зафиксировать несколько различных конформаций ТЛ. В отсутствие субстрата ТЛ находится преимущественно в "открытой", развернутой конформации. Однако при связывании в (*i* + 1)-сайте правильного NTP происходит ее сворачивание в две α-спирали [18]. В такой "закрытой" конформации ТЛ образует сеть контактов с функциональными мотивами NTP, обеспечивая его связывание по механизму индуцированного соответствия. Эти контакты определяют химическую природу субстрата и правильность образования пары с основанием ДНК в положении *i* + 1.

Цикл присоединения нуклеотидов

До загрузки субстрата в активный центр фермента элонгационный комплекс, вероятно, осциллирует между посттранслокационным состоянием (*i* + 1), готовым к синтезу РНК, и неактивными претранслокационным (*i*) и возвратным (backtracking) состояниями [39]. В активном состоянии (*i* + 1)-сайт открыт для связывания следующего субстрата, в то время как при возвратном смещении он занят РНК. Связывание NTP происходит, вероятно, в два этапа. Сначала нуклеотид попадает в каталитически неактивный сайт связывания, где устанавливается Уотсон–Криковское взаимодействие с комплементарным основанием нуклеотида матричной ДНК. В этом сайте фосфаты NTP и второй ион магния находятся слишком далеко от первого иона магния для протекания каталитической реакции [18, 20]. Здесь осуществляется первый этап отбора субстрата. Затем индуцируемое подходящим NTP сворачивание ТЛ в α-спиральную шпильку (триггерную спираль, ТН) приводит к изомеризации элонгационного комплекса в каталитически

активное состояние, в котором активный центр закрыт [18, 40]. NTP действует как храповик, который стабилизирует посттранслокационное состояние фермента. Возникновение сети взаимодействий NTP и белка фиксирует субстрат в активном центре фермента и ориентирует его должным образом для осуществления катализа. Здесь происходит второй, более строгий этап отбора субстрата. Последующая каталитическая реакция приводит к удлинению РНК и высвобождению пирофосфата. Возможно, что освобождение пирофосфата дестабилизирует закрытую конформацию активного центра, приводя к разворачиванию TL. Передвижение нуклеиновых кислот относительно фермента переводит элонгационный комплекс в посттранслокационное состояние, завершая цикл присоединения нуклеотидов.

Транслокация

Сравнение пространственных структур минимального фермента бактериальной РНК-полимеразы [13] и РНК-полимеразы II [16] дрожжей позволило предположить, что конформационная перестройка в средней части ВН способствует транслокации. Так, во впервые полученной структуре кора РНК-полимеразы *T. aquaticus* ВН согнут из-за разворачивания средней части α -спирали, в то время как в РНК-полимеразе II ВН имеет однородную α -спиральную конформацию. Передний край гибридного участка РНК-ДНК упирается в ВН, и возможное локальное движение ВН сопровождается перемещением нуклеиновых кислот в ходе транслокации. В определенной впоследствии структуре холофермента РНК-полимеразы *T. thermophilus* центральная часть ВН имеет выпетливание (flip out) из двух аминокислотных остатков (в отличие от частично развернутой спирали в первой установленной структуре кора) и контактирует с TL [35]. Функциональная связь ВН и TL, а также способность ВН менять свою конформацию показана в биохимических опытах [41, 42]. Так, мутации в TL влияют на конформацию ВН, транслокацию, точность синтеза и ответ на регуляторные сигналы и факторы [42]. Изменения в ВН при этом наблюдали с помощью фотоаффинных сшивок РНК с белком. Существование альтернативных конформаций ВН (прямая или с выпетливанием) подтверждено также в других структурах холофермента РНК-полимеразы [43].

Во всех известных на сегодняшний день структурах элонгационного комплекса РНК-полимеразы бактерий (*T. thermophilus*) ВН находится в виде однородной α -спирали (“прямая” конформация) [17, 18], поэтому нет достаточной структурной информации о конформационном переходе ВН в ходе элонгации. При этом, как отмечалось выше, удалось выявить структурную перестройку TL, вызванную связыванием подходящего NTP. Переход TL в α -спиральную конформацию “запирает” активный центр и может способствовать транслокации вперед, просто предотвращая возвратное смещение [18, 44].

В установленной недавно структуре связанного с α -аманитином элонгационного комплекса РНК-полимеразы II дрожжей фермент стабилизирован в новом конформационном состоянии [45]. В нем центральная часть ВН смещена на 2.5 Å по направлению к переднему краю гибрида РНК-ДНК, занимая положение +1 матричного нуклеотида. При этом основание ДНК, входящее в активный центр, располагается над ВН в “предматричном” (pretemplating) участке. Аминокислотный остаток L1081 (*Saccharomyces cerevisiae*) TL формирует “клин” к ВН, тем самым стабилизируя его смещенное положение. Возможно, такая конформация элонгационного комплекса представляет промежуточную стадию между пре- и посттранслокационным состоянием фермента. Соответствующий L1081 аминокислотный остаток TL в бактериальной РНК-полимеразе (M1238 у *T. thermophilus*) занимает сходное положение в структурах холофермента РНК-полимеразы *T. thermophilus* [35] и РНК-полимеразы *T. aquaticus*, связанной с антибиотиком [46]. В этих структурах ВН имеет выпетливание в участке, который смещен в транслокационном интермедиате РНК-полимеразы II дрожжей. Эти данные позволили предложить двухстадийный механизм транслокации у всех многосубъединичных РНК-полимераз через переходное состояние, стабилизированное TL, со смещением центральной части ВН [45, 47]. Однако реализуется ли такое конформационное состояние в ходе элонгации у бактерий еще предстоит выяснить.

Считается, что для транслокации нуклеиновых кислот не требуется ничего, кроме броуновского и собственного теплового движения. Связывание NTP, сопряженное с координированными конформационными изменениями в ВН и TL, приводит к пошаговому движению фермента вперед и включению очередного нуклеотида.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Неравномерность элонгации: паузы, терминация и антитерминация транскрипции

Продвижение РНК-полимеразы по матрице ДНК происходит неравномерно. В ходе элонгации этот фермент может делать временные остановки (паузы), прекращать движение (арест, перманентная остановка) или терминировать синтез РНК (с освобождением РНК и ДНК) в ответ на регуляторные воздействия со стороны белковых факторов и/или сигналов, закодированных в ДНК и РНК. Неравномерность процесса элонгации позволяет точно соотносить синтез РНК с ее последующим использованием.

Описаны два типа временных задержек в элонгации: (1) паузы, зависящие от шпилечных структур РНК; (2) паузы, вызванные возвратным смещением РНК-полимеразы (backtracking) [48]. В первом слу-

чае сигналом служит шпилька в РНК, образующаяся на расстоянии 10–12 н. от 3'-конца РНК, в окружении специфических нуклеотидных последовательностей [49]. Такого рода паузы обнаружены в лидерных участках некоторых метаболических оперонов [50, 51]. Предположили, что шпилька аллостерически передает сигнал к активному центру, взаимодействуя с доменом “заслонка” (flap) β -субъединицы РНК-полимеразы [52]. Смещение этого домена приводит, возможно, к изменению в окружении 3'-конца РНК и приостановке синтеза. Однако одной лишь шпильчатой структуры РНК обычно недостаточно для возникновения паузы. Действительно, например, стабильные терминаторные шпильки сами по себе не приостанавливают элонгацию [53], в то время как для паузы достаточно полиимидиновой последовательности. Вероятно, более распространен второй тип пауз с возвратным смещением РНК-полимеразы [54] (рис. 3). Для пауз такого рода не требуется какая-то специфическая структура РНК или последовательность нуклеотидов. Образование сдвинутых назад против хода транскрипции элонгационных комплексов определяется главным образом свободной энергией пар нуклеотидов в гибридном участке РНК-ДНК, дуплексе ДНК, фланкирующем транскрипционный пузырек, и в РНК непосредственно после выхода из фермента [8, 55]. По-видимому, существует общий неактивный интермедиат для обоих типов пауз, из которого элонгационный комплекс может либо сместиться назад, либо остаться в конформации, стабилизированной шпилькой [30, 42]. Образование такого интермедиата обусловлено, по-видимому, изменением конформации модуля ВН/ТЛ, что препятствует связыванию подходящего субстрата в ($i + 1$)-сайте и ингибирует перемещение вперед [18, 40, 42, 44, 45]. Формирование сходных неактивных комплексов обнаружено и в ходе терминации транскрипции как необходимая стадия перед диссоциацией элонгационного комплекса с высвобождением нуклеиновых кислот [29, 56].

Терминация транскрипции. Терминаторы разделяют опероны на независимые транскрипционные единицы, контролируют экспрессию генов в опероне и обеспечивают рециркуляцию РНК-полимераз для последующих циклов транскрипции. У бактерий известно два вида терминации транскрипции: фактор-независимая (intrinsic termination) и фактор-зависимая. Сигналом для терминации первого типа служит стабильная шпилька в РНК (обычно G/C-богатая), за которой следует полиуридиловая последовательность. Одной такой структуры достаточно для диссоциации элонгационного комплекса *in vitro*. В терминации второго типа принимают участие белковые факторы и отсутствует какая-то определенная специфическая последовательность в месте терминации. Обнаружены два бактериальных белка, осуществляющих терминацию – ρ и Mfd. На основании анализа нуклеотидной последовательности генома предсказано, что у *Escherichia coli* при-

мерно половина оперонов имеет фактор-независимые терминаторы. Для терминации транскрипции оставшейся части генов используется, по-видимому, фактор ρ . Другой фактор, Mfd, участвует в освобождении РНК-полимеразы, остановленной в местах повреждений ДНК, и будет рассмотрен нами отдельно. В последние годы стали известны многие детали механизмов терминации транскрипции.

В результате биохимического анализа фактор-независимой терминации установили основные стадии, ведущие к диссоциации элонгационного комплекса (рис. 4). Сначала РНК-полимераза делает паузу, обусловленную ее возвратным смещением из-за политимидинового участка [53]. Задержка в элонгации дает время, необходимое для начала формирования шпильчатой структуры в РНК. Сформировавшись, шпилька инактивирует элонгационный комплекс, вытесняет РНК из РНК-связывающего канала и расплетает заднюю часть гибридного участка РНК-ДНК [53, 57]. Чтобы объяснить, как простая последовательность фактор-независимого терминатора приводит к разрушению ключевых контактов РНК-полимеразы с РНК и ДНК, первоначально предложили “транслокационную” модель [58, 59]. В соответствии с ней для диссоциации нуклеиновых кислот на терминаторе необходимо перемещение РНК-полимеразы по ходу движения. Однако эта модель не объясняет, например, каким образом проходило бы перемещение фермента вперед без синтеза РНК. Позже, на основе анализа фотоаффинных сшивок РНК с РНК-полимеразой, предложили альтернативную “аллостерическую” модель терминации [29]. По-видимому, в ферменте происходят крупные конформационные перестройки, вызванные образующейся терминаторной шпилькой. Подвижные части РНК-связывающего канала (“застежка”, “цинковый палец” и “заслонка”) облегчают начальный этап сворачивания шпильки (нуклеация). Эти взаимодействия также могут аллостерически индуцировать сворачивание ТЛ фермента, вызывая временную остановку РНК-полимеразы в претранслокационном состоянии [44]. По мере своего формирования (более 4–5 п.н.) шпилька, вероятно, внедряется в основной канал с неизбежным плавлением гибрида РНК-ДНК. Рост стебля (основания) шпильки приводит к прямому контакту ее головки (петли и верхней части стебля) с ТЛ, вызывая изменение конформации ТЛ. Это взаимодействие возможно в результате либо оборачивания шпильки вокруг нематричной цепи ДНК, либо вытеснения шпилькой переднего дуплекса ДНК [29]. Сворачивание ТЛ в “закрытое” состояние, индуцированное шпилькой, может ингибировать связывание субстрата и “запирать” РНК-полимеразу в неактивном претранслокационном состоянии. Кроме того, движение ТЛ, составляющей основание ДНК-связывающего “зажима” (clamp) предположительно вызывает перемещение других структурных элементов (например, “вилка-2” субъединицы β) и приводит к

Терминация транскрипции

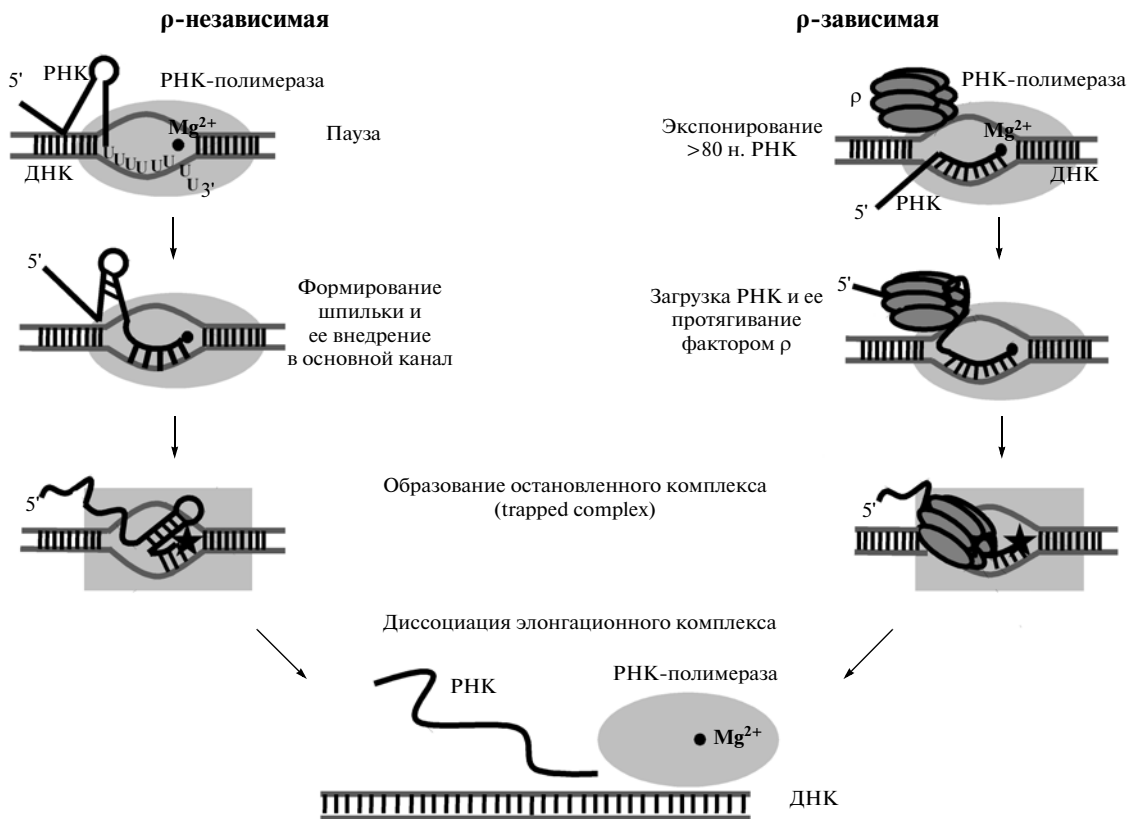


Рис. 4. Модель терминации транскрипции. Представлены возможные основные этапы ρ-независимой и ρ-зависимой терминации.

одновременному открыванию “зажима”. При этом разрываются все основные контакты нуклеиновых кислот с РНК-полимеразой. Сходная стратегия (быстрая инактивация и последующая диссоциация элонгационного комплекса), по-видимому, используется и в случае ρ-зависимой терминации [56].

Фактор ρ — гомогексамерный белковый комплекс с АТР-зависимой РНК/ДНК-хеликазной активностью. Согласно классическим моделям, ρ связывается с нетранслируемыми цитидин-богатыми участками РНК с неразвитой вторичной структурой (так называемые rut-сайты) и двигается по ней в 5' → 3'-направлении до тех пор, пока не достигнет РНК-полимеразы. Кинетика, т.е. скорость движения РНК-полимеразы, — важный параметр, определяющий сайты терминации, многие из которых совпадают с участками пауз в транскрипции.

Недавно *in vitro* обнаружили, что ρ может прямо связываться с РНК-полимеразой, т.е. для первичного взаимодействия с ρ в принципе не требуется цепь синтезируемой РНК [56]. Кроме того, в комплексе с РНК-полимеразой ρ меняет распределение пауз в транскрипции, что указывает на его роль в элонгации. Связавшись с РНК-полимеразой *in vitro*, один и тот же гексамер ρ участвует в элонгации и последующей терминации, не вытесняясь други-

ми молекулами ρ. Это позволило предположить, что ρ может быть ассоциирован с РНК-полимеразой с самого начала транскрипционного цикла. Как только РНК становится достаточно длинной и ρ имеет возможность захватить ее, он протаскивает РНК через себя, используя энергию гидролиза АТР [56]. В опытах с иммунопреципитацией хроматина обнаружено, что *in vivo* ρ локализуется вместе с элонгационным комплексом РНК-полимеразы сразу после инициации транскрипции [60].

С момента своего открытия [61] ρ был предметом многих биохимических и структурных исследований, в результате которых стали известны детали загрузки РНК в фактор ρ и механизма транслокации [62]. Однако каким образом ρ вызывает разрушение элонгационного комплекса долгое время не могли понять. Для описания механизма терминации предложено несколько моделей. Модель “наматывания на катушку” (spooling) предполагает вытягивание РНК из элонгационного комплекса с использованием АТРазной активности. Другой вариант — перемещение РНК-полимеразы вперед без синтеза РНК с укорочением гибрида РНК-ДНК (forward translocation). Однако совсем недавно появились доказательства в пользу альтернативной аллостерической модели терминации [56] (рис. 4).

Оказалось, что быстрая инактивация элонгационного комплекса — критический скорость-лимитирующий этап, определяющий положение места терминации. Нахождение контактов 3'-конца РНК с помощью фотоаффинных сшивок выявило его взаимодействие с разными частями ТЛ в случае инактивированного и активного элонгационного комплекса. Очевидно, ρ вызывает конформационные изменения в ТЛ, приводящие к инактивации комплекса и открыванию домена “зажим”. В результате, как и в случае фактор-независимой терминации, теряются основные контакты РНК-полимеразы с нуклеиновыми кислотами и происходит дестабилизация элонгационного комплекса. Вероятно, ρ внедряется в основной канал и расплетает гибридный участок РНК-ДНК, напоминая вхождение терминаторной шпильки. В пользу предположения о ключевой роли конформационного состояния ТЛ свидетельствуют данные о том, что мутации в этом домене влияют на эффективность терминации. Кроме того, тагетитоксин (антибиотик, связывающийся с ферментом вблизи активного центра и стабилизирующий “свернутую”, или “закрытую” конформацию ТЛ) подавляет терминацию. Мутация в другом домене (“крышка”, lid), вовлеченном в отделение РНК от ДНК на заднем конце гибридного участка РНК-ДНК, ингибирует терминацию. Возможно, что ρ может взаимодействовать с этим доменом и аллостерически передавать сигнал на активный центр. Структурно-функциональное сходство протекания фактор-независимой и ρ -зависимой терминации говорит в пользу единого аллостерического механизма терминации транскрипции с первоначальной инактивацией элонгационного комплекса и последующей его диссоциацией.

Для фактор-независимой или ρ -зависимой терминации транскрипции *in vitro* достаточно сигнала терминации, кодируемого нуклеиновыми кислотами, или одного фактора ρ соответственно. Однако *in vivo* в терминацию вовлечены дополнительные факторы, например общие факторы элонгации NusA и NusG, незаменимые у *E. coli*.

Активностью фактора ρ обусловлен давно известный эффект полярности, при котором нонсенс-мутация в одном гене препятствует транскрипции следующих за ним генов этого оперона. Диссоциация рибосом на стоп-кодоне позволяет ρ связать РНК и воздействовать на элонгационный комплекс РНК-полимеразы. Это же объясняет, почему ρ -зависимая терминация обычно происходит на конце гена, хотя потенциальные rut-сайты распределены по всей транскрибируемой последовательности. Неспособность ρ терминировать транскрипцию некодирующих РНК обусловлена, вероятно, действием специальной системы антитерминации, а также отчасти сложной структурой самой РНК. Таким образом, ρ может препятствовать накоплению РНК, не используемой трансляционным аппаратом клетки или не включаемой в РНК-белковые комплексы. Недавно обнаружили, что в *E. coli* фактор ρ участву-

ет в репрессии генов профагов и других инсерций чужеродных ДНК в бактериальный геном, приобретенных в результате горизонтального переноса [63]. Оказалось, что штамм MDS42 *E. coli* с уменьшенным на 14% геномом [64], из которого направленно удалены профаги, IS-элементы и кластеры К-островков, значительно более устойчив к ингибитору ρ бицикломицину, чем исходный штамм К-12. Хотя в штамме MDS42 фактор ρ по-прежнему остается жизненно важным белком, клетки этого штамма сохраняют жизнеспособность при повреждении его кофакторов NusA и NusG. Удаление профага *rac* из штамма дикого типа увеличивает устойчивость бактерий к бицикломицину и приводит к сохранению их жизнеспособности при повреждении гена *nusG*. Таким образом, ρ -зависимая терминация защищает клетки *E. coli* от токсического действия чужеродных генов [63]. Интересно отметить, что в клетках *Bacillus subtilis* содержание ρ невелико, оно составляет менее 5% от его количества в *E. coli*. В клетках *B. subtilis*, в отличие от кишечной палочки, факторы ρ и NusG не относятся к существенным белкам, тогда как NusA необходим для жизни клетки независимо от действия ρ [65].

Регуляция терминации транскрипции. Принятие решения о диссоциации элонгационного комплекса или продолжении транскрипции — важный этап контроля экспрессии генов. В бактериях можно условно выделить два механизма регуляции терминации транскрипции: аттенуацию и процессивную антитерминацию.

Аттенуация транскрипции, которая подразумевает преждевременную терминацию, широко используемая в бактериях стратегия регуляции экспрессии генов [66]. В ответ на специфический метаболический сигнал транскрипция либо терминируется в лидерной части соответствующего оперона, либо продолжается в область структурных генов. В случае регуляции ρ -независимой терминации транскрипции в РНК часто может возникать альтернативная терминаторной шпильке структура, названная антитерминатором. Антитерминатор включает участок РНК, входящий в состав терминаторной шпильки, так что эти две структуры взаимоисключаемы. Регулирование образования конкурирующих структур в РНК влияет на формирование терминаторной шпильки, т.е., в конечном итоге, на терминацию транскрипции. Есть примеры, когда в РНК может образоваться анти-антитерминаторная структура. В случае ее реализации блокируется образование антитерминатора, формируется терминаторная шпилька и происходит терминация. Формирование альтернативных структур в РНК может определяться транслирующей рибосомой, регуляторными белками, тРНК или низкомолекулярными лигандами. ρ -зависимая терминация регулируется доступностью синтезируемой РНК и/или РНК-полимеразы для фактора ρ , а также изменением чувствительности элонгационного комплекса к паузам.

У многих бактерий опероны, связанные с метаболизмом аминокислот, регулируются с помощью транслирующей рибосомы [67]. В лидерных РНК в этих случаях закодированы короткие пептиды, включающие несколько остатков той аминокислоты, биосинтез которой определяется опероном. Задержка рибосомы на кодонах аминокислот, которые необходимо синтезировать, приводит к формированию альтернативных шпильчатых структур РНК (рис. 5а). Классическим примером служит аттенуация триптофанового оперона у *E. coli*. При дефиците триптофана и, следовательно, соответствующих аминоацилированных тРНК^{Trp} рибосома останавливается на кодонах триптофана, что позволяет сформироваться антитерминаторной шпильке РНК. Поскольку в этом случае терминаторная шпилька не образуется, транскрипция продолжается в область структурных генов. Другой важный элемент здесь – образование перед антитерминатором шпильки, вызывающей паузу в транскрипции. Пауза позволяет синхронизировать транскрипцию лидерной части оперона и его трансляцию.

В аттенуации триптофанового оперона у *B. subtilis* используется другой механизм. Первичным регулятором транскрипции служит не рибосома, а РНК-связывающий белок TRAP (*trp* RNA-binding Attenuation Protein), который взаимодействует также с триптофаном [68]. После образования комплекса с триптофаном белок приобретает способность связываться с антитерминаторным участком лидерной РНК. В результате формируется терминаторная шпилька и происходит терминация транскрипции (рис. 5б). В отсутствие триптофана белок не связывается с РНК, в лидерном участке образуется антитерминаторная структура и транскрипция, напротив, продолжается. Другим примером РНК-связывающих белков служат факторы антитерминации транскрипции семейства Bgl, регулирующие экспрессию различных катаболитных оперонов у грамположительных и грамотрицательных бактерий [69]. BglG *E. coli* в виде димера также связывается с лидерной областью РНК, однако, в отличие от белка TRAP, BglG стабилизирует антитерминатор, предотвращая тем самым терминацию транскрипции (рис. 5в). Активность BglG контролируется другим регуляторным белком, BglF, который реагирует на концентрацию сахара.

Показано, что незаряженные (неацилированные) тРНК могут заменять сенсорные белки в качестве посредников в ходе аттенуации транскрипции [70]. Выяснилось, что ряд генов *B. subtilis*, контролируемых аминоацил-тРНК-синтетазы, и некоторые опероны биосинтеза аминокислот содержат в не-транслируемой лидерной области РНК так называемый Т-бокс (рис. 5г). Сквозная транскрипция терминирующей шпильки лидерной РНК происходит в том случае, если соотношение заряженной и незаряженной тРНК снижается, что сигнализирует о дефиците соответствующей аминокислоты. Экспериментально показано, что незаряженная тРНК

может связываться с двумя сайтами Т-бокса: проксимальным, который определяет специфичность связывания за счет кодон-антикодонного взаимодействия, и дистальным, обеспечивающим контакт свободного акцепторного домена тРНК с антитерминатором. В результате незаряженная тРНК фиксируется за счет этих двух основных контактов в лидерной области, стабилизируя антитерминатор и предотвращая формирование терминирующей шпильки. В случае заряженной тРНК такого связывания не происходит, что приводит к терминации транскрипции [71].

Сравнительно недавно был открыт новый тип регуляции экспрессии с помощью *cis*-действующих сенсорных РНК [72, 73]. Эти РНК, названные рибопереключателями (riboswitches), с высокой специфичностью распознают и связывают природные метаболиты. Располагаясь преимущественно в 5'-некодируемых областях, сенсорные РНК способны формировать альтернативные вторичные структуры в зависимости от присутствия специфического лиганда и включать или выключать процесс элонгации транскрипции мРНК или инициации трансляции этих мРНК [74] (рис. 5д,е). В структуре рибопереключателей можно выделить два функциональных модуля: аптамерный, отвечающий за распознавание и связывание метаболита, и экспрессионный, вовлеченный в регуляцию активности прилегающих генов. В состав экспрессионного модуля входит фактор-независимый терминатор транскрипции либо секвестор трансляции, т.е. шпильчатая структура, перекрывающая SD-последовательность и сайт инициации трансляции. Регуляция на уровне терминации транскрипции более характерна для генов, объединенных в опероны. В большинстве случаев сенсорные РНК представляют собой рецепторы конечных продуктов биосинтетических путей (или их производных), и накопление этих метаболитов служит сигналом к репрессии активности соответствующих генов. Так, например, связывание флавиномононуклеотида (FMN) с аптамерным доменом лидерной части *rib*-оперона *B. subtilis* стабилизирует такую конфигурацию сенсорной РНК (анти-антитерминатор), которая препятствует формированию антитерминатора и приводит к терминации транскрипции [72] (рис. 5д). У *E. coli*, вероятно, аналогичный комплекс блокирует образование антисеквестора и делает недоступным для рибосомы последовательность SD. Позитивная регуляция с участием сенсорных РНК характерна для генов, продукты которых вовлечены в деградацию или экспорт метаболитов из клетки. Примером может служить регуляция транскрипции гена *pbuE* *B. subtilis* аденином [75, 76]. Формирование аптамерной структуры в присутствии аденина исключает образование терминаторной шпильки, и экспрессия генов активируется (рис. 5е). В отсутствие метаболита в данном случае аптамерная структура не стабилизируется, вместо нее формируется терминатор транскрипции, блокирующий экспрессию

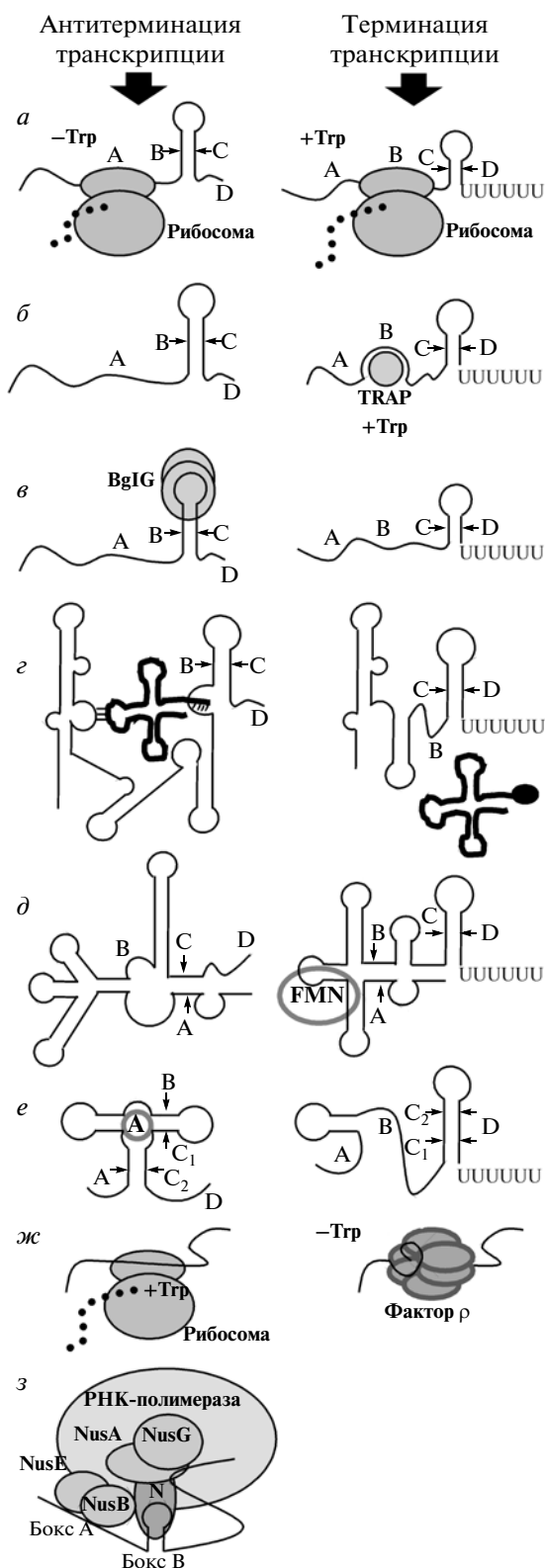


Рис. 5. Разнообразие молекулярных механизмов, регулирующих терминацию транскрипции. Схематично представлены альтернативные вторичные структуры РНК (A:B – анти-антитерминатор, C:D – терминатор, B:C – антитерминатор) при модулировании ρ -независимой терминации (a–e). Примеры аттенуации транскрипции с участием рибосомы (a), белков (б, в), тРНК (г) и сенсорных РНК, связывающих FMN (д) и аденин (е). Регулирование ρ -зависимой терминации: рибосома препятствует связыванию с РНК фактора ρ (ж). Модификация элонгационного комплекса РНК-полимеразы белком N фага λ приводит к процессивной антитерминации (з).

структурных генов. Показано, что сенсорные РНК принимают участие в регуляции ряда бактериальных оперонов, контролирующих биосинтез витаминов, аминокислот, нуклеотидов, а также транспорт ионов металлов [77]. К настоящему времени обнаружено уже около десятка разных рибопереключателей, контролирующих по крайней мере 3% бактериальных генов.

В качестве примера регулирования ρ -зависимой терминации можно привести аттенуацию транскрипции в *tna*-опероне *E. coli* [78]. Гены этого оперона участвуют в использовании триптофана как источника углерода и азота. В условиях недостатка триптофана рибосома, транслирующая лидерную область *tnaC*, покидает РНК на стоп-кодоне (рис. 5ж). Это позволяет фактору ρ связаться с РНК и терминировать транскрипцию, действуя на РНК-полимеразу в состоянии паузы. В присутствии избытка триптофана TnaC-пептидил-тРНК не расщепляется, и рибосома остается на стоп-кодоне. Остановленная рибосома препятствует связыванию с РНК фактора ρ , предотвращая терминацию, и способствует тем самым транскрипции структурных генов оперона.

При процессивной антитерминации сразу после начала транскрипции регуляторные факторы узнают специфические сигналы в РНК/ДНК и стабильно модифицируют РНК-полимеразу в устойчивую к терминаторам форму [79]. Кроме того, эта модификация фермента ингибирует паузы, задерживающие элонгацию транскрипции. В качестве примера можно привести антитерминацию транскрипции у фага λ (рис. 5з) и бактериальных оперонов рРНК. В состав таких комплексов входят факторы NusA, NusB, NusG, NusE (S10) и фаговый белок N или несколько других клеточных белков. У колифага НК022 для модификации элонгационного комплекса даже не требуются белковые факторы, а необходим специальный участок в РНК (*put*-сайт). Несмотря на то, что явление процессивной антитерминации известно давно и описаны необходимые компоненты комплекса антитерминации, детали модификации элонгационного комплекса остаются малоизученными. Поскольку антитерминаторы способны супрессировать как фактор-зависимую, так и фактор-независимую терминацию, можно предположить, что они воздействуют на интермедиаты элонгационного комплекса, общие для двух классов терминации.

Регуляторные белки

Факторы, действующие через вторичный канал. Основной и РНК-связывающий каналы в элонгационном комплексе заняты нуклеиновыми кислотами, однако прямой доступ к активному центру РНК-полимеразы из раствора (с поверхности фермента) возможен через вторичный канал. Описан ряд факторов (GreA/B, Gfh1, DksA, Rnk, TraR), использующих вторичный канал для контроля транскрипции [80–83].

Встречая различные затруднения по ходу транскрипции, РНК-полимераза испытывает возвратные смещения по матрице. При этом 3'-конец РНК покидает активный центр и, видимо, попадает во вторичный канал. Бактериальные факторы GreA и GreB супрессируют паузы и перманентные остановки (арест) *in vitro* и *in vivo*, стимулируя эндонуклеазную активность РНК-полимеразы [34, 84, 85]. После расщепления РНК вновь образованная 3'-ОН-группа оказывается в активном центре фермента, и РНК-полимераза снова получает шанс транскрибировать этот участок матрицы. Факторы GreA/B облегчают переход РНК-полимеразы от инициации к элонгации [86–88], а также способствуют повышению точности синтеза РНК [89]. В результате действия GreA в ходе гидролиза образуются ди- и тринуклеотиды, в то время как GreB способствует отщеплению 3'-концевых фрагментов РНК длиной до 10 н. в зависимости от степени смещения РНК-полимеразы назад [34]. Тип расщепления (GreA- или GreB-тип) определяется спиральным доменом фактора [90]. Основное различие в этом домене – размер положительно заряженного участка, который у GreB больше, чем у GreA. Очевидно, он необходим для правильной ориентации 3'-концевого участка РНК во вторичном канале. Если GreA только предотвращает перманентную остановку, то GreB способен реактивировать уже попавшие в это состояние комплексы [34]. У эукариот есть функциональный аналог Gre-белков – фактор TFIIS. Интересно отметить, что, несмотря на отсутствие гомологии между GreA/B и TFIIS и значительную разницу в пространственном строении этих факторов, бактериальная и эукариотическая РНК-полимераза используют одинаковую стратегию для расщепления РНК. Общепринятая модель предполагает проникновение спирально-спирального (coiled coil) домена Gre-белков или домена “цинковой ленты” (Zn-ribbon) TFIIS через вторичный канал к активному центру фермента [36–38, 91]. Как отмечено выше, два остатка аспарагиновой и глутаминовой кислот на вершине этих доменов участвуют в оптимальном для нуклеазной реакции размещении Mg^{2+} и молекулы воды. Вероятно, для облегчения гидролиза РНК факторы могут стабилизировать конформацию смещенного назад элонгационного комплекса, взаимодействуя с TL/ВН-модулем РНК-полимеразы и с 3'-концевым участком РНК [36]. Кроме того, связывание Gre-белков с РНК-полимеразой может аллостерически стабилизировать или дестабилизировать взаимодействия между передним дуплексом ДНК и доменом “зажим”, а также между гибридом РНК-ДНК и его связывающим участком, что влияет на стабильность элонгационного комплекса при инициации и элонгации транскрипции. Предложенные модели комплекса РНК-полимеразы с белками Gre-семейства расходятся, однако, в некоторых деталях положения контактов глобулярного домена фактора и РНК-полимеразы [36–38]. Недавно с высоким раз-

решением установили пространственную структуру GreB [92]. Межмолекулярные взаимодействия, обнаруженные в кристалле, позволили предположить возможность аналогичного взаимодействия между гидрофобной впадиной глобулярного домена фактора и гидрофобным участком на кончике спираль-спирального домена β' -субъединицы у широкой внешней стороны вторичного канала [92] (рис. 2).

Белок Gfh1 термофильных бактерий относится к семейству Gre-белков, однако он ингибирует все каталитические активности РНК-полимеразы [93, 94]. Пространственные структуры доменов Gfh1 и Gre-белков схожи, но различается их взаимная ориентация в установленных структурах факторов [82, 95, 96]. Показано, что конформация Gfh1 меняется в зависимости от значения pH [96]. При pH больше 7 домены Gfh1 находятся в “неактивной”, развернутой друг относительно друга ориентации, и фактор не связывается с РНК-полимеразой. Однако при более низких значениях pH конформация Gfh1 изменяется, и домены ориентируются, как у Gre-белков. В такой конформации Gfh1 связывается с РНК-полимеразой и ингибирует ее активность, конкурируя с нуклеотидами за координирование Mg^{2+} в активном центре [96]. Очевидно, геометрия размещения иона магния в активном центре Gfh1 и Gre-белков принципиально различна. Вероятно, Gfh1 не только стабилизирует Mg^{2+} в непродуктивном состоянии, но и блокирует подходящее размещение нуклеофила (молекулы воды или гидроксид-иона). В основе функционального различия между Gfh1 и Gre-белками лежат особенности локальной конформации полипептидной петли на вершине спираль-спирального домена, которая через вторичный канал поступает в активный центр фермента. Ингибирование также может быть следствием блокирования вторичного канала фактором Gfh1 и ограничения поступления субстратов и выхода продуктов abortивного синтеза РНК [96].

Хотя фактор DksA не гомологичен белкам Gre-семейства, их пространственные структуры очень похожи [81]. По-видимому, DksA связывается с РНК-полимеразой глобулярным доменом у внешнего отверстия вторичного канала и так же, как Gre-белки, укладывает в нем спираль-спиральный домен. Показано, что DksA усиливает эффект клеточного алармона гуанозинтетрафосфата (ppGpp) при “строгом ответе” (stringent response) [81, 97]. Для объяснения кооперативного эффекта DksA и ppGpp предложена модель, основанная на установленной структуре комплекса ppGpp и РНК-полимеразы *T. thermophilus* [98]. Предполагается, что DksA с помощью двух остатков аспарагиновой кислоты на кончике спираль-спирального домена координирует ион магния и стабилизирует комплекс РНК-полимеразы с ppGpp [81]. Однако проведенные генетические исследования ставят под вопрос соответствие обнаруженного в структуре РНК-полимеразы *T. thermophilus* сайта связывания ppGpp физиологически значимому сайту в ферменте *E. coli* [99]. Уста-

новлено, что в присутствии DksA снижается время жизни открытого промоторного комплекса [97]. По-видимому, избирательность действия ppGpp и DksA на рибосомные промоторы объясняется внутренними свойствами самих промоторов, которые образуют нестабильные открытые комплексы с малым временем жизни. Возможно, контакт DksA с модулем TL/ВН приводит к аллостерической передаче сигнала на аминокислотные остатки, контролирующие открытие/закрытие домена “зажим” и/или взаимодействующие с промоторной ДНК [100]. Хотя эта модель может объяснить негативное влияние фактора на рибосомных промоторах, непонятным остается механизм его синергизма с ppGpp, а также способ, при помощи которого DksA осуществляет позитивный контроль на генах, кодирующих ферменты синтеза аминокислот. Установлено, что DksA может предотвращать и перманентные остановки РНК-полимеразы в элонгации транскрипции [81]. Однако, в отличие от GreA, этот фактор не способен стимулировать гидролиз РНК. Аминокислотные замены двух инвариантных остатков аспарагиновой кислоты в спираль-спиральном домене привели к утрате эффекта DksA на инициацию транскрипции, но не повлияли на его связывание с РНК-полимеразой и предотвращение образования тупиковых комплексов [81]. Вероятно, располагаясь во вторичном канале, DksA блокирует попадание туда 3'-концевого участка РНК, подавляя возвратное смещение РНК-полимеразы. В этом заключается еще одно его отличие от Gre-белков, которые связывают выступающий 3'-концевой фрагмент РНК положительно заряженным участком их спираль-спирального домена. Недавно появились новые данные о функциональной значимости DksA в элонгации транскрипции [101]. Выяснилось, что у *E. coli* DksA способствует репликации ДНК, устраняя препятствия со стороны транскрипции. Этот эффект особенно выражен при аминокислотном голодании. Детальный механизм влияния DksA на элонгацию транскрипции еще предстоит выяснить. Примечательно, что одновременное разрушение *greA*, *greB* и *dksA* значительно замедляет репликацию даже в нормальных условиях роста, подчеркивая важность этих факторов в преодолении столкновений ферментов репликации и транскрипции [101].

Недавно описали еще два белка, по-видимому, регулирующих транскрипцию через вторичный канал. Фактор Rnk сходен с Gre-белками С-концевым глобулярным доменом, однако спираль-спиральный домен у него сильно укорочен [102]. Это подразумевает одинаковое связывание с РНК-полимеразой, но отличный механизм действия. Фактор TraR, кодируемый конъюгативной плазмидой F, имеет структурное сходство с DksA [103]. Однако полипептидная цепь TraR почти в 2 раза короче, чем у DksA. Предсказание вторичной структуры показало, что в N-концевой части находится только одна α -спираль, соответствующая части спираль-спи-

рального домена DksA. Возможно, TraR функционирует в виде димера [104]. TraR оказывает сходный с DksA эффект на транскрипцию, но не зависит от ppGpp. Молекулярные механизмы регуляции факторами Rnk и TraR остаются невыясненными.

Таким образом, все белки этой группы имеют два домена: глобулярный и вытянутый спираль-спиральный. Благодаря глобулярному домену факторы образуют стабильные и специфические комплексы с РНК-полимеразой, в то время как спираль-спиральный домен используется для проникновения белков через вторичный канал к активному центру фермента. Модулирование каталитических активностей РНК-полимеразы в ряде случаев происходит, вероятно, в результате изменения аффинности и геометрии связывания Mg^{2+} за счет кислых аминокислотных остатков, расположенных в петле спираль-спирального домена. Кроме того, возможно аллостерическое действие факторов благодаря контактам с функциональными модулями РНК-полимеразы, например с TL/ВН. Факторы связываются примерно в одном месте у выхода на поверхность вторичного канала и могут конкурировать друг с другом, осуществляя тонкую регуляцию уровня экспрессии генов.

Факторы, действующие аллостерически (NusA, NusG, RfaH). Открытые первоначально как бактериальные компоненты системы антитерминации фага λ , факторы транскрипции NusA и NusG играют важную роль в общем контроле скорости элонгации, а также эффективности терминации и анти-терминации транскрипции.

NusA – консервативный у бактерий белок, который в разных ситуациях может противоположным образом влиять на транскрипцию. Сам по себе фактор увеличивает паузы в транскрипции и усиливает фактор-независимую терминацию *in vitro*. Кроме того, NusA модулирует ρ -зависимую терминацию. Однако совместное действие NusA с другими белками Nus (NusG, NusB, NusE) или белками N и Q фага λ , наоборот, приводит к супрессии пауз в элонгации транскрипции и анти-терминации на фактор-независимых и фактор-зависимых терминациях. Биохимические основы этих эффектов еще не вполне понятны.

Структурные исследования NusA из *Mycobacterium tuberculosis* и *Thermotoga maritima* выявили мультидоменную организацию фактора [105–108]. N-концевой домен NusA, взаимодействующий с РНК-полимеразой, соединен подвижным полипептидным участком с тремя РНК-связывающими глобулярными доменами – S1, KH1 и KH2. Фактор *E. coli* также содержит два С-концевых домена AR1 и AR2, блокирующих связывание РНК с доменами S1 и KH. Автоингибирование устраняется взаимодействием AR1 и AR2 с С-концевым доменом α -субъединицы РНК-полимеразы [109].

N-концевым доменом NusA взаимодействует с участком РНК-полимеразы, расположенным около

канала, через который синтезируемая РНК выходит из фермента, в частности, с доменом “заслонка” (flap) [52, 110, 111] (рис. 2). Обнаружено, что N-концевого домена NusA достаточно для стимулирования фактор-независимой терминации и пауз, обусловленных шпилькой в РНК, при этом другие домены NusA помогают фактору связаться с элонгационным комплексом [111]. Вытесняя одноцепочечную РНК с поверхности РНК-полимеразы, NusA может способствовать образованию терминационной шпильки [112]. Не исключено также, что фактор прямо стабилизирует шпильку благодаря своим контактам с РНК. Облегчение формирования шпилек в РНК фактором NusA должно, очевидно, усилить в ряде случаев паузы в транскрипции, вызванные такой структурой РНК. С другой стороны, через модуль TL/ВН NusA может, вероятно, аллостерически влиять на активный центр РНК-полимеразы, стимулируя паузы [42]. В анти-терминационном комплексе образуется сеть контактов NusA с факторами, РНК-полимеразой и РНК. По-видимому, эти взаимодействия устраняют функции NusA, связанные с усилением пауз и терминации. Например, фактор NusA в комплексе с анти-терминатором Q бактериофага 82 экранирует участок РНК и затрудняет формирование в нем вторичных структур [113].

Другой фактор элонгации, NusG, широко распространен в бактериях и имеет гомологов у архей и эукариот. NusG *E. coli* супрессирует паузы в транскрипции, вызванные возвратным смещением РНК-полимеразы, и ускоряет элонгацию транскрипции *in vitro*. В терминации транскрипции этот фактор усиливает действие бактериального белка ρ и белка Nun фага HK022, однако в комплексе с другими факторами он участвует в анти-терминации транскрипции бактериального оперона pРНК и генов фага λ . Несмотря на высокую консервативность, у разных видов бактерий белки NusG могут иметь свои особенности и в функционировании, и в наборе белков-партнеров [114, 115]. Многие виды бактерий также содержат специализированные паралоги NusG, например RfaH у *E. coli*. Фактор RfaH супрессирует паузы и ρ -зависимую терминацию транскрипции в оперонах, содержащих *ops*-элемент длиной 12 н. [116].

Все белки семейства NusG имеют двухдоменную структуру с высококонсервативным N-концевым и варибельным С-концевым доменами [117, 118]. В N-концевом домене находится гидрофобная впадина, по-видимому, вовлеченная во взаимодействие со спираль-спиральным участком домена “зажим” РНК-полимеразы (рис. 2). Впадина заблокирована С-концевым доменом у RfaH, но открыта у NusG. RfaH специфически узнает нуклеотиды *ops*-элемента в нематричной цепи ДНК, экспонированной в транскрипционном пузырьке, что, вероятно, приводит к диссоциации доменов RfaH и открытию области взаимодействия с РНК-полимеразой. N-концевой домен NusG *E. coli* достаточен для супрессии

пауз в транскрипции *in vitro*, однако для усиления р-зависимой терминации или поддержания антитерминации необходим полный белок [117]. По-видимому, в белках семейства NusG С-концевой домен играет белок-специфичную роль, организуя сборку и функционирование регуляторных комплексов.

Анализ *in vitro* РНК-полимераз с мутациями в TL позволил предположить, что контроль элонгации факторами NusA и NusG осуществляется посредством регуляции функционального состояния модуля TL/ВН [42]. Например, NusG стабилизирует РНК-полимеразу в посттранслокационном (активном) состоянии, подобно мутации в TL, ускоряющей элонгацию. РНК-полимераза с такой мутацией теряет чувствительность к NusG, поскольку фактор не способен воздействовать на измененный модуль TL/ВН. NusA, напротив, снижает скорость элонгации и супрессирует перемещение вперед. Мутация в TL, замедляющая элонгацию, приводит к устойчивости РНК-полимеразы к действию NusA на паузы и транслокацию.

Факторы с АТРазной активностью (Mfd, RapA, ρ).

Белок Mfd – фактор, связывающий транскрипцию и репарацию у бактерий. Mfd узнает остановленные из-за повреждений в ДНК элонгационные комплексы РНК-полимераз, удаляет их с матрицы и рекрутирует к этим участкам белки эксцизионной репарации [119]. Этот фактор имеет структурное сходство с АТРазой суперсемейства II RecG и, очевидно, является АТР-зависимой транслоказой. Mfd состоит из нескольких компактно расположенных функциональных модулей, отвечающих за взаимодействие с комплексом репарации и РНК-полимеразой, а также за транслокацию [120, 121].

В РНК-полимеразе сайт связывания с Mfd локализован в пределах N-концевой области из 142 аминокислотных остатков (*E. coli*) субъединицы β [121, 122]. В структуре комплекса элонгации этот домен β находится рядом с задним концом транскрипционного пузырька. В соответствии с таким расположением Mfd для связывания необходимы ~25 н. дуплекса ДНК непосредственно за транскрипционным пузырьком [122].

In vitro обнаружено, что Mfd, используя энергию гидролиза АТР, способен реактивировать сместившиеся назад элонгационные комплексы [122]. Возобновление элонгации в этом случае возможно только при условии, что 3'-конец РНК снова окажется в активном центре РНК-полимеразы. Поскольку Mfd в отличие от GreA/В не стимулирует эндонуклеазное расщепление РНК, механизм его работы предположительно заключается в транслокации элонгационного комплекса вперед по ходу транскрипции [122]. Если транскрипция заблокирована из-за повреждений в ДНК или низкой концентрации нуклеотидов, то действие Mfd приводит к диссоциации элонгационного комплекса. Однако *in vitro* в отсутствие физических преград на матрице и при физиологических концентрациях нуклеоти-

дов элонгация транскрипции преобладает над Mfd-зависимым высвобождением РНК. Очевидно, мишенью Mfd служат лишь остановленные элонгационные комплексы, и он не действует на те, что движутся со скоростью, нормальной для элонгации в физиологических условиях. Детали механизма разрушения комплекса элонгации фактором Mfd не выяснены. По-видимому, для диссоциации непродуктивного элонгационного комплекса недостаточно простого смещения его вперед, а требуются дополнительные изменения конформации, вызванные взаимодействиями фактора с мобильными доменами РНК-полимеразы и/или с нуклеиновыми кислотами.

В клетке функции Mfd не ограничиваются репарацией, связанной с транскрипцией. Недавно показали, что Mfd способствует прохождению репликативной вилки после встречного столкновения реплисомы с РНК-полимеразой [123]. Возобновление репликации возможно только после вытеснения РНК-полимеразы с матрицы ДНК. Известно также несколько других примеров, когда экспрессия генов регулируется или нарушается препятствиями элонгации транскрипции [124–126]. Во всех этих случаях используется, вероятно, способность Mfd удалять остановленные элонгационные комплексы.

Другая АТРаза, взаимодействующая с РНК-полимеразой, – RapA (или HerA) [127, 128]. RapA принадлежит к белковому семейству SWI/SNF2, что указывает на возможную роль фактора в ремоделировании нуклеиновых кислот. RapA способен связывать нуклеиновые кислоты, а его АТРазная активность стимулируется РНК-полимеразой [127]. Количество RapA в клетке сопоставимо с σ^{70} , и RapA также легко очищается вместе с РНК-полимеразой.

RapA состоит из нескольких доменов, включающих четырехдоменный АТРазный модуль, типичный для ДНК-транслоказ [129]. Два N-концевых домена обладают структурным сходством с доменом Mfd, контактирующим с РНК-полимеразой. Сайт связывания с фактором на РНК-полимеразе локализован на субъединицах β' и α, однако детали этого контакта неизвестны [130]. Установлено, что RapA взаимодействует с минимальным ферментом (кором) РНК-полимеразы, причем σ^{70} легко вытесняет фактор из этого комплекса [129]. Примечательно, что Mfd тоже не влияет на содержащие σ^{70} промоторные комплексы РНК-полимеразы [122]. Действительно, структурные данные указывают на блокирование инициаторным фактором сайта связывания Mfd на РНК-полимеразе [121].

Работы *in vitro* показали, что RapA стимулирует множественную транскрипцию (multiround transcription) на суперскрученной ДНК при высокой концентрации соли [130]. Хотя RapA и не считается белком, существенным в оптимальных условиях, разрушение его гена приводит к нарушению роста клеток на агаризованных средах при повышенной

концентрации соли. Для объяснения стимулирующего эффекта RarA предположили, что он высвобождает неактивные элонгационные комплексы, способствуя рециркуляции РНК-полимераз в ходе транскрипции [130, 131]. Однако по-прежнему неизвестна точная топология элонгационных комплексов, на которые действует RarA, неясен и механизм реактивации таких комплексов. Интересно проверить, способен ли RarA подобно Mfd осуществлять АТР-зависимую транслокацию РНК-полимеразы.

Недавно проведенные структурные исследования выявили новые детали в рабочем цикле фактора терминации ρ [62]. Шесть субъединиц фактора организованы в кольцевую структуру. В N-концевых доменах субъединиц располагаются участки первичного связывания РНК, обращенные во внутреннюю часть этой гексамерной структуры [132]. Вероятно, с этими доменами взаимодействует *rut*-сайт РНК при загрузке РНК в фактор. Таким образом, РНК связывается по периферии внутренней стороны кольца из субъединиц ρ , при этом 3'-конец РНК ориентируется в направлении центрального отверстия. Длина одноцепочечной РНК, покрывающей N-концевые домены всех субъединиц, составляет 70–80 н., что соответствует размеру неструктурированной РНК, необходимой для ρ -зависимой терминации. В С-концевых доменах субъединиц находятся АТР-разные центры и вторичные участки связывания РНК, необходимые для транслокации и хеликазной активности фактора. Пока 3'-концевая часть РНК не попадет во вторичный сайт связывания, гексамерное кольцо ρ может существовать в разомкнутом виде, напоминая пружинную шайбу [132]. В такой конформации в одном месте кольца нет контакта между субъединицами, и РНК без свободного конца может попасть в центр кольцевой структуры фактора. Обнаружено, что структурные элементы ρ , участвующие в связывании и гидролизе АТР, прямо взаимодействуют с РНК во вторичном участке связывания [62]. Таким образом, связывание РНК непосредственно влияет на состояние АТР-разных центров и регулирует гидролиз АТР. По-видимому, в каждый момент времени гидролиз АТР происходит только в одном АТР-разном центре, который ассоциирован с РНК. Сопряженно с АТР-разной активностью РНК по кольцу переходит от одной субъединицы к другой, при этом РНК транслотируется через гексамер (что аналогично движению ρ по РНК) в 5' → 3'-направлении [62]. Относительные перемещения фактора и РНК необходимы для функции ρ и могут отражать акт освобождения РНК в ходе терминации транскрипции. Где и каким образом ρ взаимодействует с NusG и РНК-полимеразой, еще предстоит выяснить. Поскольку, в отличие от Mfd, фактор ρ действует на движущиеся элонгационные комплексы, ключевым этапом ρ -зависимой терминации считается быстрая инактивация РНК-полимеразы, необходимая для последующей диссоциации комплекса.

Тотальная регуляция скорости элонгации: взаимодействие макромолекул в ходе экспрессии генов

In vivo РНК-полимераза с высокой скоростью (20–80 н. в секунду) синтезирует длинные РНК из тысяч нуклеотидов [133]. Однако *in vitro* одиночная транскрипция (single round transcription) проходит с гораздо меньшей эффективностью, прерываясь многочисленными паузами и перманентными останковками. Такие задержки значительно уменьшают скорость элонгации и долю полноразмерных транскриптов. Высокая эффективность элонгации транскрипции *in vivo* еще более удивительна, если учесть, что в клетке с ДНК-матрицей связаны различные белки, представляющие собой потенциальные препятствия для продвижения РНК-полимеразы. Многие из таких белков частично или полностью блокируют одиночную транскрипцию *in vitro* [134, 135].

В большинстве случаев задержки в элонгации связаны, вероятно, с возвратными смещениями РНК-полимеразы. Реактивация элонгационных комплексов *in vitro* происходит либо спонтанно из-за обратимости небольших по амплитуде возвратных смещений [8, 32], либо с участием специальных факторов. Например, факторы GreA/B стимулируют эндонуклеазное расщепление РНК [34, 85], а белок Mfd сдвигает РНК-полимеразу вперед, используя гидролиз АТР [122]. В результате в обоих случаях 3'-конец РНК размещается в активном центре фермента и возобновляется синтез РНК. Примечательно, что ни один из этих факторов не входит в число необходимых для жизни клеток в физиологических условиях [119, 136]. Следовательно, можно предположить, что существуют более общие механизмы, лежащие в основе эффективной транскрипции *in vivo*.

На стадии элонгации по одной и той же матрице ДНК молекулы РНК-полимераз следуют друг за другом, а в случае высокоактивных генов (например, генов рРНК или стресс-индуцибельных генов) практически вплотную друг к другу. Обнаружено, что большинство задержек транскрипции *in vitro* можно избежать, если более одной РНК-полимеразы начинают синтез РНК с одного промотора (multi-round transcription) [137]. Удалось показать, что молекулы РНК-полимеразы способны подавлять возвратные смещения впереди идущих молекул [РНК-полимераз] в местах пауз и перманентных останков. Возвратные движения элонгационных комплексов, по-видимому, возможны практически в любых позициях на матрице, однако скорость и амплитуда этих осцилляций зависит от локальных нуклеотидных последовательностей. В определенных участках РНК-полимеразы задерживаются из-за высокой вероятности спонтанного возвратного смещения и относительно низкой вероятности движения вперед. Характер движения, определяемый свободной энергией пар нуклеотидов в ДНК, в гибридном участке РНК-ДНК и РНК может значительно меняться даже на соседних нук-

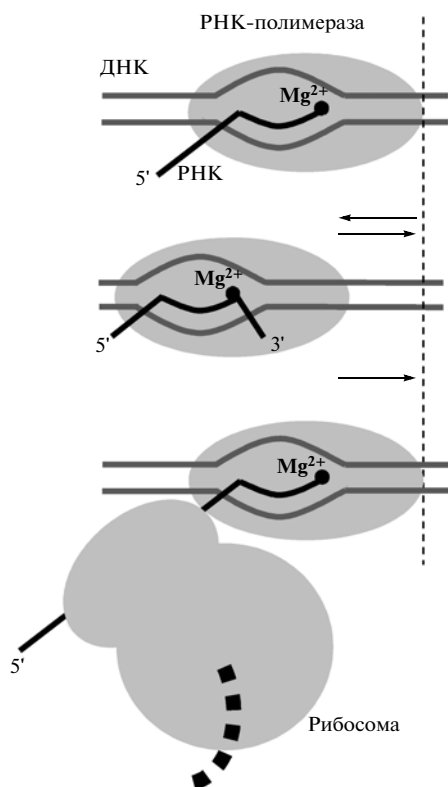


Рис. 6. Транслирующая рибосома препятствует возвратному смещению РНК-полимеразы.

леотидах. Это означает, что в то время как одна РНК-полимераза образует непродуктивный комплекс, следующая за ней молекула может находиться в активном состоянии, сдвигая равновесие первой молекулы также к активному состоянию.

Взаимодействие между комплексами элонгации облегчает также преодоление препятствий в виде связанных с матрицей белков *in vitro* и *in vivo* [138]. Анализ конформаций элонгационных комплексов показал, что при встрече с препятствием РНК-полимераза находится в непродуктивном состоянии, вызванным возвратным смещением комплекса. Для прохождения препятствия необходимо выполнение двух шагов: 1) реактивации элонгационного комплекса и 2) смещения и/или диссоциации белка-препятствия. Кооперация между РНК-полимеразой позволяет ускорить первый шаг без использования эндонуклеазного расщепления РНК путем смещения непродуктивного комплекса вперед по ходу транскрипции. Второй шаг, зависящий от природы контактов репрессора и ДНК, также может подвергаться влиянию первого шага из-за локальных изменений в структуре ДНК и/или стерических затруднений между белками. Тот же механизм, как выяснилось в опытах *in vitro*, может способствовать преодолению нуклеосом [139].

Кооперативный эффект между элонгационными комплексами позволяет связать эффективность

инициации и элонгации. Чем плотнее молекулы РНК-полимеразы располагаются на матрице, тем выше эффективность элонгации. Следовательно, этот механизм хорошо работает на высокоактивных генах, типа генов рибосомных и других стабильных РНК. Однако большинство белоккодирующих генов имеют относительно слабые промоторы, что снижает действие кооперативности между элонгационными комплексами. Недавно мы обнаружили, что рибосома, следующая за РНК-полимеразой по синтезируемой РНК, может оказывать аналогичный стимулирующий эффект на элонгацию транскрипции [140].

В клетках бактерий транскрипция и трансляция осуществляются согласованно в пространстве и во времени. Большинство мРНК начинают транслироваться, как только участок связывания рибосом появляется из РНК-связывающего канала РНК-полимеразы. Уже на первых классических микроэлектронных фотографиях было видно, что в ходе транскрипции полисомы следуют непосредственно за молекулами РНК-полимеразы [141]. Однако механизм координации транскрипции и трансляции оставался невыясненным. Давно известно, что в основе аттенуации транскрипции ряда метаболических оперонов и эффекта полярности лежит функциональное взаимодействие рибосомы и РНК-полимеразы [50, 142]. В этих случаях действие рибосомы на транскрипцию не прямое, а опосредовано вторичными структурами РНК или фактором ρ . Мы показали, что рибосомы непосредственно влияют на РНК-полимеразу [140]. Согласно опытам *in vivo*, скорость транскрипции контролируется скоростью трансляции. Ускорение или замедление рибосомы приводит к соответствующему изменению скорости РНК-полимеразы [140]. Каков молекулярный механизм синхронизации двух этапов экспрессии генов?

Хотя обе молекулярные машины действуют по принципу “броуновского храповика” [42, 143, 144], транслокация рибосомы практически необратима, в то время как РНК-полимераза осциллирует, смещаясь вперед-назад по матрице ДНК с одновременным движением РНК относительно фермента [8, 32, 39, 42]. Равновесие между продуктивным (посттранслокационным) и непродуктивными (претранслокационным, или сдвинутым назад) состояниями комплекса элонгации определяет скорость элонгации транскрипции [42]. Выяснилось, что лидирующая рибосома может препятствовать возвратному смещению РНК-полимеразы, повышая эффективность транскрипции [140] (рис. 6). Предотвращая образование непродуктивных элонгационных комплексов, рибосома также облегчает прохождение *in vivo* РНК-полимеразой различных препятствий на матрице ДНК [140]. Таким образом, немонотонность элонгации транскрипции играет важную роль в ее синхронизации с трансляцией. Рибосома контролирует РНК-полимеразу, позволяя подогнать синтез РНК к трансляционным потребностям клетки. Заметим, что образование тупи-

ковых (arrested) в транскрипции элонгационных комплексов может, по-видимому, оказаться губительным для ключевых процессов биосинтеза макромолекул (репликации, транскрипции или трансляции). Поэтому транслирующая рибосома может играть роль глобального фактора в реализации генетической информации.

Получены данные, которые указывают на возможность прямой физической связи между рибосомой и РНК-полимеразой [145]. С помощью спектроскопии ЯМР установлено, что С-концевой домен NusG связывается с белком S10 малой субчастицы рибосомы. Участок S10, взаимодействующий с NusG, экспонирован на поверхности 30S субчастицы. Поскольку N-концевой домен NusG связывается с РНК-полимеразой [117, 146], NusG может служить линкером между рибосомой и РНК-полимеразой. Кроме того, выяснилось, что фактор ρ конкурирует с белком S10 за связывание с С-концевым доменом NusG [145]. Следовательно, NusG может стимулировать действие ρ только в отсутствие рибосомы. Таким образом, сопровождение РНК-полимеразы рибосомой препятствует захвату РНК фактором ρ и взаимодействию ρ с NusG, что исключает преждевременную терминацию транскрипции.

При синтезе нетранслируемой рРНК РНК-полимераза модифицируется с помощью комплекса анти-терминации, который выполняет предположительно ту же роль, что и лидирующая рибосома в эффективной транскрипции белоккодирующих генов.

У эукариот кооперативный эффект в транскрипции также может не ограничиваться взаимодействием между РНК-полимеразой. Транскрипция в клеточном ядре протекает координировано с процессингом РНК [147]. Интригующим представляется вопрос о том, может ли процессингосома, собираемая на синтезируемой РНК и взаимодействующая с РНК-полимеразой II, играть сходную с прокариотической рибосомой роль в повышении эффективности элонгации транскрипции.

Эта работа частично поддержана фондом “Династия”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vassilyev D.G. 2009. Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 691–700.
- Nudler E. 2009. RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 335–361.
- Roberts J.W., Shankar S., Filter J.J. 2008. RNA polymerase elongation factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 211–233.
- Zaychikov E., Martin E., Denissova L., Kozlov M., Markovtsov V., Kashlev M., Heumann H., Nikiforov V., Goldfarb A., Mustaev A. 1996. Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science*. **273**, 107–109.
- Markovtsov V., Mustaev A., Goldfarb A. 1996. Protein-RNA interactions in the active center of transcription elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 3221–3226.
- Mustaev A., Kozlov M., Markovtsov V., Zaychikov E., Denissova L., Goldfarb A. 1997. Modular organization of the catalytic center of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 6641–6645.
- Nudler E., Avetissova E., Markovtsov V., Goldfarb A. 1996. Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex. *Science*. **273**, 211–217.
- Nudler E., Mustaev A., Lukhtanov E., Goldfarb A. 1997. The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell*. **89**, 33–41.
- Nudler E., Gusarov I., Avetissova E., Kozlov M., Goldfarb A. 1998. Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*. *Science*. **281**, 424–428.
- Sidorenkov I., Komissarova N., Kashlev M. 1998. Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol. Cell*. **2**, 55–64.
- Kireeva M.L., Komissarova N., Waugh D.S., Kashlev M. 2000. The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 6530–6536.
- Nudler E. 1999. Transcription elongation: structural basis and mechanisms. *J. Mol. Biol.* **288**, 1–12.
- Zhang G., Campbell E.A., Minakhin L., Richter C., Severinov K., Darst S.A. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*. **98**, 811–824.
- Korzheva N., Mustaev A., Kozlov M., Malhotra A., Nikiforov V., Goldfarb A., Darst S.A. 2000. A structural model of transcription elongation. *Science*. **289**, 619–625.
- Cramer P., Bushnell D.A., Fu J., Gnatt A.L., Maier-Davis B., Thompson N.E., Burgess R.R., Edwards A.M., David P.R., Kornberg R.D. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*. **288**, 640–649.
- Cramer P., Bushnell D.A., Kornberg R.D. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science*. **292**, 1863–1876.
- Vassilyev D.G., Vassilyeva M.N., Perederina A., Tahirov T.H., Artsimovitch I. 2007. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*. **448**, 157–162.
- Vassilyev D.G., Vassilyeva M.N., Zhang J., Palangat M., Artsimovitch I., Landick R. 2007. Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. *Nature*. **448**, 163–168.
- Gnatt A.L., Cramer P., Fu J., Bushnell D.A., Kornberg R.D. 2001. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*. **292**, 1876–1882.
- Kettenberger H., Armache K.J., Cramer P. 2004. Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS. *Mol. Cell*. **16**, 955–965.
- Westover K.D., Bushnell D.A., Kornberg R.D. 2004. Structural basis of transcription: nucleotide selection

- by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*. **119**, 481–489.
22. Kashkina E., Anikin M., Brueckner F., Lehmann E., Kochetkov S.N., McAllister W.T., Cramer P., Temiakov D. 2007. Multisubunit RNA polymerases melt only a single DNA base pair downstream of the active site. *J. Biol. Chem.* **282**, 21578–21582.
 23. Touloukhonov I., Landick R. 2006. The role of the lid element in transcription by *E. coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **361**, 644–658.
 24. Kent T., Kashkina E., Anikin M., Temiakov D. 2009. Maintenance of RNA-DNA hybrid length in bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **284**, 13497–13504.
 25. Westover K.D., Bushnell D.A., Kornberg R.D. 2004. Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science*. **303**, 1014–1016.
 26. Naryshkina T., Kuznedelov K., Severinov K. 2006. The role of the largest RNA polymerase subunit lid element in preventing the formation of extended RNA-DNA hybrid. *J. Mol. Biol.* **361**, 634–643.
 27. Kuznedelov K., Korzhova N., Mustaev A., Severinov K. 2002. Structure-based analysis of RNA polymerase function: the largest subunit's rudder contributes critically to elongation complex stability and is not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length. *EMBO J.* **21**, 1369–1378.
 28. King R.A., Markov D., Sen R., Severinov K., Weisberg R.A. 2004. A conserved zinc binding domain in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase modulates intrinsic transcription termination and antitermination but does not stabilize the elongation complex. *J. Mol. Biol.* **342**, 1143–1154.
 29. Epshtein V., Cardinale C.J., Ruckenstein A.E., Borukhov S., Nudler E. 2007. An allosteric path to transcription termination. *Mol. Cell*. **28**, 991–1001.
 30. Touloukhonov I., Landick R. 2003. The flap domain is required for pause RNA hairpin inhibition of catalysis by RNA polymerase and can modulate intrinsic termination. *Mol. Cell*. **12**, 1125–1136.
 31. Sosunov V., Sosunova E., Mustaev A., Bass I., Nikiforov V., Goldfarb A. 2003. Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *EMBO J.* **22**, 2234–2244.
 32. Komissarova N., Kashlev M. 1997. RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 15329–15338.
 33. Komissarova N., Kashlev M. 1997. Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 1755–1760.
 34. Borukhov S., Sagitov V., Goldfarb A. 1993. Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell*. **72**, 459–466.
 35. Vassylyev D.G., Sekine S., Laptenko O., Lee J., Vassylyeva M.N., Borukhov S., Yokoyama S. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*. **417**, 712–719.
 36. Laptenko O., Lee J., Lomakin I., Borukhov S. 2003. Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *EMBO J.* **22**, 6322–6334.
 37. Opalka N., Chlenov M., Chacon P., Rice W.J., Wriggers W., Darst S.A. 2003. Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. *Cell*. **114**, 335–345.
 38. Sosunova E., Sosunov V., Kozlov M., Nikiforov V., Goldfarb A., Mustaev A. 2003. Donation of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor Gre. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 15469–15474.
 39. Toulme F., Guerin M., Robichon N., Leng M., Rahmouni A.R. 1999. *In vivo* evidence for back and forth oscillations of the transcription elongation complex. *EMBO J.* **18**, 5052–5060.
 40. Wang D., Bushnell D.A., Westover K.D., Kaplan C.D., Kornberg R.D. 2006. Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*. **127**, 941–954.
 41. Epshtein V., Mustaev A., Markovtsov V., Bereshchenko O., Nikiforov V., Goldfarb A. 2002. Swing-gate model of nucleotide entry into the RNA polymerase active center. *Mol. Cell*. **10**, 623–634.
 42. Bar-Nahum G., Epshtein V., Ruckenstein A.E., Rafikov R., Mustaev A., Nudler E. 2005. A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell*. **120**, 183–193.
 43. Tuske S., Sarafianos S.G., Wang X., Hudson B., Sineva E., Mukhopadhyay J., Birktoft J.J., Leroy O., Ismail S., Clark A.D., Jr., Dharia C., Napoli A., Laptenko O., Lee J., Borukhov S., Ebricht R.H., Arnold E. 2005. Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation. *Cell*. **122**, 541–552.
 44. Touloukhonov I., Zhang J., Palangat M., Landick R. 2007. A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing. *Mol. Cell*. **27**, 406–419.
 45. Brueckner F., Cramer P. 2008. Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 811–818.
 46. Campbell E.A., Pavlova O., Zenkin N., Leon F., Irschik H., Jansen R., Severinov K., Darst S.A. 2005. Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *EMBO J.* **24**, 674–682.
 47. Brueckner F., Ortiz J., Cramer P. 2009. A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 294–299.
 48. Artsimovitch I., Landick R. 2000. Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 7090–7095.
 49. Chan C.L., Landick R. 1993. Dissection of the his leader pause site by base substitution reveals a multipartite signal that includes a pause RNA hairpin. *J. Mol. Biol.* **233**, 25–42.
 50. Yanofsky C. 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature*. **289**, 751–758.
 51. Henkin T.M., Yanofsky C. 2002. Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *BioEssays*. **24**, 700–707.

52. Touloukhonov I., Artsimovitch I., Landick R. 2001. Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins. *Science*. **292**, 730–733.
53. Gusarov I., Nudler E. 1999. The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell*. **3**, 495–504.
54. Depken M., Galburt E.A., Grill S.W. 2009. The origin of short transcriptional pauses. *Biophys. J.* **96**, 2189–2193.
55. Tadigotla V.R., D O.M., Sengupta A.M., Epshtein V., Ebright R.H., Nudler E., Ruckenstein A.E. 2006. Thermodynamic and kinetic modeling of transcriptional pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 4439–4444.
56. Epshtein V., Dutta D., Wade J., Nudler E. 2010. An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature*. **463**, 245–249.
57. Komissarova N., Becker J., Solter S., Kireeva M., Kashlev M. 2002. Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol. Cell*. **10**, 1151–1162.
58. Yarnell W.S., Roberts J.W. 1999. Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science*. **284**, 611–615.
59. Santangelo T.J., Roberts J.W. 2004. Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator. *Mol. Cell*. **14**, 117–126.
60. Mooney R.A., Davis S.E., Peters J.M., Rowland J.L., Ansari A.Z., Landick R. 2009. Regulator trafficking on bacterial transcription units *in vivo*. *Mol. Cell*. **33**, 97–108.
61. Roberts J.W. 1969. Termination factor for RNA synthesis. *Nature*. **224**, 1168–1174.
62. Skordalakes E., Berger J.M. 2006. Structural insights into RNA-dependent ring closure and ATPase activation by the Rho termination factor. *Cell*. **127**, 553–564.
63. Cardinale C.J., Washburn R.S., Tadigotla V.R., Brown L.M., Gottesman M.E., Nudler E. 2008. Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science*. **320**, 935–938.
64. Posfai G., Plunkett G., 3rd, Feher T., Frisch D., Keil G.M., Umenhoffer K., Kolisnychenko V., Stahl B., Sharma S.S., de Arruda M., Burland V., Harcum S.W., Blattner F.R. 2006. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*. **312**, 1044–1046.
65. Ingham C.J., Dennis J., Furneaux P.A. 1999. Autogenous regulation of transcription termination factor Rho and the requirement for Nus factors in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **31**, 651–663.
66. Merino E., Yanofsky C. 2005. Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria. *Trends Genet.* **21**, 260–264.
67. Landick R., Turnbough C.L.J., Yanofsky C. 1996. Transcription attenuation. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Ed. Neidhardt F.C. Washington: ASM Press, pp. 1263–1286.
68. Babitzke P., Stults J.T., Shire S.J., Yanofsky C. 1994. TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*, is a multisubunit complex that appears to recognize G/UAG repeats in the trpEDCFBA and trpG transcripts. *J. Biol. Chem.* **269**, 16597–16604.
69. Amster-Choder O., Wright A. 1992. Modulation of the dimerization of a transcriptional antiterminator protein by phosphorylation. *Science*. **257**, 1395–1398.
70. Grundy F.J., Henkin T.M. 1993. tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell*. **74**, 475–482.
71. Grundy F.J., Henkin T.M. 2004. Regulation of gene expression by effectors that bind to RNA. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 126–131.
72. Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Lopez L.E., Shatalin K., Kreneva R.A., Perumov D.A., Nudler E. 2002. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell*. **111**, 747–756.
73. Winkler W., Nahvi A., Breaker R.R. 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*. **419**, 952–956.
74. Nudler E., Mironov A.S. 2004. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 11–17.
75. Mandal M., Breaker R.R. 2004. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 29–35.
76. Лобанов К.В., Королькова Н.В., Еремина С.Ю., Эррайс Лопес Л., Прошкин С.А., Миронов А.С. 2007. Мутации, приводящие к изменению специфичности сенсорной РНК, кодируемой геном *pbuE Bacillus subtilis*. *Генетика*. **43**, 859–864.
77. Roth A., Breaker R.R. 2009. The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 305–334.
78. Gong F., Ito K., Nakamura Y., Yanofsky C. 2001. The mechanism of tryptophan induction of tryptophanase operon expression: tryptophan inhibits release factor-mediated cleavage of TnaC-peptidyl-tRNA(Pro). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 8997–9001.
79. Weisberg R.A., Gottesman M.E. 1999. Processive antitermination. *J. Bacteriol.* **181**, 359–367.
80. Stebbins C.E., Borukhov S., Orlova M., Polyakov A., Goldfarb A., Darst S.A. 1995. Crystal structure of the GreA transcript cleavage factor from *Escherichia coli*. *Nature*. **373**, 636–640.
81. Perederina A., Svetlov V., Vassilyeva M.N., Tahirov T.H., Yokoyama S., Artsimovitch I., Vassilyev D.G. 2004. Regulation through the secondary channel—structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*. **118**, 297–309.
82. Symersky J., Perederina A., Vassilyeva M.N., Svetlov V., Artsimovitch I., Vassilyev D.G. 2006. Regulation through the RNA polymerase secondary channel. Structural and functional variability of the coiled-coil transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**, 1309–1312.
83. Степанова Е.В., Шевелев А.Б., Борухов С.И., Северинов К.В. 2009. Физико-химические механизмы действия транскрипционных факторов, связывающихся с РНК-полимеразой, но не связывающихся с ДНК. *Биофизика*. **54**, 773–790.
84. Marr M.T., Roberts J.W. 2000. Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site. *Mol. Cell*. **6**, 1275–1285.
85. Toulme F., Mosrin-Huaman C., Sparkowski J., Das A., Leng M., Rahmouni A.R. 2000. GreA and GreB proteins revive backtracked RNA polymerase *in vivo* by promoting transcript trimming. *EMBO J.* **19**, 6853–6859.
86. Hsu L.M., Vo N.V., Chamberlin M.J. 1995. *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression *in vivo*

- and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 11588–11592.
87. Stepanova E., Lee J., Ozerova M., Semenova E., Datsenko K., Wanner B.L., Severinov K., Borukhov S. 2007. Analysis of promoter targets for *Escherichia coli* transcription elongation factor GreA *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* **189**, 8772–8785.
 88. Stepanova E., Wang M., Severinov K., Borukhov S. 2009. Early transcriptional arrest at *Escherichia coli* rplN and ompX promoters. *J. Biol. Chem.* **284**, 35702–35713.
 89. Erie D.A., Hajiseyedjavadi O., Young M.C., von Hippel P.H. 1993. Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. *Science*. **262**, 867–873.
 90. Koulich D., Orlova M., Malhotra A., Sali A., Darst S.A., Borukhov S. 1997. Domain organization of *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB. *J. Biol. Chem.* **272**, 7201–7210.
 91. Kettenberger H., Armache K.J., Cramer P. 2003. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell*. **114**, 347–357.
 92. Vassilyeva M.N., Svetlov V., Dearborn A.D., Klyuyev S., Artsimovitch I., Vassilyev D.G. 2007. The carboxy-terminal coiled-coil of the RNA polymerase beta'-subunit is the main binding site for Gre factors. *EMBO Rep.* **8**, 1038–1043.
 93. Hogan B.P., Hartsch T., Erie D.A. 2002. Transcript cleavage by *Thermus thermophilus* RNA polymerase. Effects of GreA and anti-GreA factors. *J. Biol. Chem.* **277**, 967–975.
 94. Laptenko O., Borukhov S. 2003. Biochemical assays of Gre factors of *Thermus thermophilus*. *Methods Enzymol.* **371**, 219–232.
 95. Lamour V., Hogan B.P., Erie D.A., Darst S.A. 2006. Crystal structure of *Thermus aquaticus* Gfh1, a Gre-factor paralog that inhibits rather than stimulates transcript cleavage. *J. Mol. Biol.* **356**, 179–188.
 96. Laptenko O., Kim S.S., Lee J., Starodubtseva M., Cava F., Berenguer J., Kong X.P., Borukhov S. 2006. pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *EMBO J.* **25**, 2131–2141.
 97. Paul B.J., Barker M.M., Ross W., Schneider D.A., Webb C., Foster J.W., Gourse R.L. 2004. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*. **118**, 311–322.
 98. Artsimovitch I., Patlan V., Sekine S., Vassilyeva M.N., Hosaka T., Ochi K., Yokoyama S., Vassilyev D.G. 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell*. **117**, 299–310.
 99. Ventas C.E., Gaal T., Berkmen M.B., Rutherford S.T., Haugen S.P., Vassilyev D.G., Ross W., Gourse R.L. 2008. Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *J. Mol. Biol.* **377**, 551–564.
 100. Rutherford S.T., Villers C.L., Lee J.H., Ross W., Gourse R.L. 2009. Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA. *Genes Dev.* **23**, 236–248.
 101. Tehranchi A.K., Blankschien M.D., Zhang Y., Halliday J.A., Srivatsan A., Peng J., Herman C., Wang J.D. 2010. The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell*. **141**, 595–605.
 102. Lamour V., Rutherford S.T., Kuznedelov K., Ramagopal U.A., Gourse R.L., Severinov K., Darst S.A. 2008. Crystal structure of *Escherichia coli* Rnk, a new RNA polymerase-interacting protein. *J. Mol. Biol.* **383**, 367–379.
 103. Blankschien M.D., Potrykus K., Grace E., Choudhary A., Vinella D., Cashel M., Herman C. 2009. TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS Genet.* **5**, e1000345.
 104. Pinto U.M., Winans S.C. 2009. Dimerization of the quorum-sensing transcription factor TraR enhances resistance to cytoplasmic proteolysis. *Mol. Microbiol.* **73**, 32–42.
 105. Gopal B., Haire L.F., Gamblin S.J., Dodson E.J., Lane A.N., Papavinasasundaram K.G., Colston M.J., Dodson G. 2001. Crystal structure of the transcription elongation/anti-termination factor NusA from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **314**, 1087–1095.
 106. Worbs M., Bourenkov G.P., Bartunik H.D., Huber R., Wahl M.C. 2001. An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol. Cell*. **7**, 1177–1189.
 107. Shin D.H., Nguyen H.H., Jancarik J., Yokota H., Kim R., Kim S.H. 2003. Crystal structure of NusA from *Thermotoga maritima* and functional implication of the N-terminal domain. *Biochemistry*. **42**, 13429–13437.
 108. Beuth B., Pennell S., Arnvig K.B., Martin S.R., Taylor I.A. 2005. Structure of a *Mycobacterium tuberculosis* NusA-RNA complex. *EMBO J.* **24**, 3576–3587.
 109. Mah T.F., Kuznedelov K., Mushegian A., Severinov K., Greenblatt J. 2000. The alpha subunit of *E. coli* RNA polymerase activates RNA binding by NusA. *Genes Dev.* **14**, 2664–2675.
 110. Yang X., Molimau S., Doherty G.P., Johnston E.B., Marles-Wright J., Rothnagel R., Hankamer B., Lewis R.J., Lewis P.J. 2009. The structure of bacterial RNA polymerase in complex with the essential transcription elongation factor NusA. *EMBO Rep.* **10**, 997–1002.
 111. Ha K.S., Touloukhonov I., Vassilyev D.G., Landick R. 2010. The NusA N-terminal domain is necessary and sufficient for enhancement of transcriptional pausing via interaction with the RNA exit channel of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **401**, 708–725.
 112. Gusarov I., Nudler E. 2001. Control of intrinsic transcription termination by N and NusA: the basic mechanisms. *Cell*. **107**, 437–449.
 113. Shankar S., Hatoum A., Roberts J.W. 2007. A transcription antiterminator constructs a NusA-dependent shield to the emerging transcript. *Mol. Cell*. **27**, 914–927.
 114. Yakhnin A.V., Yakhnin H., Babitzke P. 2008. Function of the *Bacillus subtilis* transcription elongation factor NusG in hairpin-dependent RNA polymerase pausing in the *trp* leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 16131–16136.

115. Sevostyanova A., Artsimovitch I. 2010. Functional analysis of *Thermus thermophilus* transcription factor NusG. *Nucl. Acids Res.* **38**, 7432–7445.
116. Artsimovitch I., Landick R. 2002. The transcriptional regulator RfaH stimulates RNA chain synthesis after recruitment to elongation complexes by the exposed nontemplate DNA strand. *Cell.* **109**, 193–203.
117. Mooney R.A., Schweimer K., Rosch P., Gottesman M., Landick R. 2009. Two structurally independent domains of *E. coli* NusG create regulatory plasticity via distinct interactions with RNA polymerase and regulators. *J. Mol. Biol.* **391**, 341–358.
118. Belogurov G.A., Vassilyeva M.N., Svetlov V., Klyuyev S., Grishin N.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I. 2007. Structural basis for converting a general transcription factor into an operon-specific virulence regulator. *Mol. Cell.* **26**, 117–129.
119. Selby C.P., Sancar A. 1993. Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science.* **260**, 53–58.
120. Selby C.P., Sancar A. 1995. Structure and function of transcription-repair coupling factor. I. Structural domains and binding properties. *J. Biol. Chem.* **270**, 4882–4889.
121. Deaconescu A.M., Chambers A.L., Smith A.J., Nickels B.E., Hochschild A., Savery N.J., Darst S.A. 2006. Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair. *Cell.* **124**, 507–520.
122. Park J.S., Marr M.T., Roberts J.W. 2002. *E. coli* transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell.* **109**, 757–767.
123. Pomerantz R.T., O'Donnell M. 2010. Direct restart of a replication fork stalled by a head-on RNA polymerase. *Science.* **327**, 590–592.
124. Zalieckas J.M., Wray L.V. Jr., Ferson A.E., Fisher S.H. 1998. Transcription-repair coupling factor is involved in carbon catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *hut* and *gnt* operons. *Mol. Microbiol.* **27**, 1031–1038.
125. Washburn R.S., Wang Y., Gottesman M.E. 2003. Role of *E. coli* transcription-repair coupling factor Mfd in Nun-mediated transcription termination. *J. Mol. Biol.* **329**, 655–662.
126. Trautinger B.W., Jaktaji R.P., Rusakova E., Lloyd R.G. 2005. RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription. *Mol. Cell.* **19**, 247–258.
127. Sukhodolets M.V., Jin D.J. 1998. RapA, a novel RNA polymerase-associated protein, is a bacterial homolog of SWI2/SNF2. *J. Biol. Chem.* **273**, 7018–7023.
128. Muzzin O., Campbell E.A., Xia L., Severinova E., Darst S.A., Severinov K. 1998. Disruption of *Escherichia coli* *hepA*, an RNA polymerase-associated protein, causes UV sensitivity. *J. Biol. Chem.* **273**, 15157–15161.
129. Shaw G., Gan J., Zhou Y.N., Zhi H., Subburaman P., Zhang R., Joachimiak A., Jin D.J., Ji X. 2008. Structure of RapA, a Swi2/Snf2 protein that recycles RNA polymerase during transcription. *Structure.* **16**, 1417–1427.
130. Sukhodolets M.V., Cabrera J.E., Zhi H., Jin D.J. 2001. RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription. *Genes Dev.* **15**, 3330–3341.
131. Yawn B., Zhang L., Mura C., Sukhodolets M.V. 2009. RapA, the SWI/SNF subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, promotes the release of nascent RNA from transcription complexes. *Biochemistry.* **48**, 7794–7806.
132. Skordalakes E., Berger J.M. 2003. Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell.* **114**, 135–146.
133. Vogel U., Jensen K.F. 1994. The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. *J. Bacteriol.* **176**, 2807–2813.
134. Pavco P.A., Steege D.A. 1990. Elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase is blocked *in vitro* by a site-specific DNA binding protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 9960–9969.
135. Izban M.G., Luse D.S. 1991. Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II *in vitro*: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.* **5**, 683–696.
136. Orlova M., Newlands J., Das A., Goldfarb A., Borukhov S. 1995. Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4596–4600.
137. Epshtein V., Nudler E. 2003. Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation. *Science.* **300**, 801–805.
138. Epshtein V., Toulme F., Rahmouni A.R., Borukhov S., Nudler E. 2003. Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *EMBO J.* **22**, 4719–4727.
139. Jin J., Bai L., Johnson D.S., Fulbright R.M., Kireeva M.L., Kashlev M., Wang M.D. 2010. Synergistic action of RNA polymerases in overcoming the nucleosomal barrier. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 745–752.
140. Proshkin S., Rahmouni A.R., Mironov A., Nudler E. 2010. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science.* **328**, 504–508.
141. Miller O.L., Jr., Hamkalo B.A., Thomas C.A., Jr. 1970. Visualization of bacterial genes in action. *Science.* **169**, 392–395.
142. Richardson J.P. 1991. Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell.* **64**, 1047–1049.
143. Спиринов А.С. 2002. РНК-полимераза как молекулярная машина. *Молекуляр. биология.* **36**, 208–215.
144. Spirin A.S. 2009. The ribosome as a conveying thermal ratchet machine. *J. Biol. Chem.* **284**, 21103–21119.
145. Burmann B.M., Schweimer K., Luo X., Wahl M.C., Stitt B.L., Gottesman M.E., Rosch P. 2010. A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science.* **328**, 501–504.
146. Belogurov G.A., Mooney R.A., Svetlov V., Landick R., Artsimovitch I. 2009. Functional specialization of transcription elongation factors. *EMBO J.* **28**, 112–122.
147. Moore M.J., Proudfoot N.J. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell.* **136**, 688–700.