

Agnieszka Konopacka



**„Badanie roli domen podjednostki σ^{70} polimerazy
RNA *E. coli* w rozpoznawaniu promotora i inicjacji
transkrypcji.”**

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem dr hab. Władysława Werela, prof. nadzw.
w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku

Gdańsk 2013

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu
promotorowi prof. Władysławowi Werelowi
za pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy,
opiekę naukową i cierpliwość.
Szczególne podziękowania składam
moim rodzicom i mężowi Bartłomiejowi
bez których pomocy praca ta nie powstałaby oraz wszystkim
pracownikom Katedry i Zakładu Mikrobiologii
Farmaceutycznej za przyjazną atmosferę pracy i wsparcie.*

Spis treści:

1. Wstęp.....	5
1.1 Miejsce startu transkrypcji.....	7
1.2 Polimeraza RNA.....	11
1.3 Podjednostka sigma.....	17
2. Cel pracy.....	35
3. Materiały.....	37
3.1 Szczep bakteryjny.....	37
3.2 Plazmidy.....	37
3.3 Pożywki.....	37
3.4 Bufory stosowane do enzymów.....	38
3.5 Enzymy.....	39
3.6 Startery.....	39
3.7 Oligo1.....	40
3.8 Nukleotydy.....	40
3.9 Roztwory do lizy alkalicznej.....	41
3.10 Roztwory do wytrącania DNA.....	41
3.11 Roztwór wykorzystywany do przygotowania komórek kompetentnych.....	42
3.12 Roztwory wykorzystywane do indukcji, izolacji i oczyszczania fragmentów σ^{70}	42
3.13 Roztwory i materiały do ilościowego oznaczania stężenia białka (mikrometoda).....	45
3.14 Izotopy do znakowania DNA.....	46
3.15 Bufory do tworzenia kompleksów białko-DNA.....	46
3.16 Mieszanina do transkrypcji in vitro.....	46
3.17 Roztwory do autoradiografii.....	47
3.18 Elektroforeza agarozowa DNA.....	47
3.19 Elektroforeza poliakrylamidowa.....	48
3.20 Złoża chromatograficzne agarozu Ni-NTA (QIAGEN).....	52
3.21 Odczynniki.....	52
3.22 Aparatura.....	55
4. Metody.....	56
4.1 Otrzymanie fragmentów DNA metodą PCR.....	56
4.2 Izolacja plazmidu metodą lizy alkalicznej.....	57
4.3 Oczyszczanie i wytrącanie DNA.....	58
4.4 Cięcie plazmidowego DNA oraz fragmentów DNA otrzymanych w reakcji PCR enzymami restrykcyjnymi.....	58
4.5 Defosforylacja plazmidowego DNA.....	59
4.6 Ligacja.....	59
4.7 Przygotowanie komórek kompetentnych.....	60
4.8 Transformacja.....	60
4.9 Analiza otrzymanych transformantów.....	60
4.10 Elektroforeza na żelu agarozowym.....	60
4.11 Elektroforeza w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym.....	61
4.12 Hodowla bakterii <i>E. coli</i> BL 21 i nadprodukcja fragmentu podjednostki σ^{70}	61

4.13 Izolacja i oczyszczanie fragmentów podjednostek σ^{70}	62
4.14 Oznaczanie stężenia białka w roztworze – Mikrometoda.....	64
4.15 Renaturacja białek.....	64
4.16 Zateżnianie białka za pomocą zestawu MICROCON® - Centrifugal Filter Devices (Millipore).....	65
4.17 Elektroforeza białek w warunkach denaturujących.....	65
4.18 Barwienie białek w żelach poliakrylamidowych.....	65
4.19 Znakowanie starterów za pomocą [γ - 32 P] ATP.....	66
4.20 Badanie oddziaływań zmodyfikowanej podjednostki σ^{70} z rdzeniem polimerazy RNA i promotorowym DNA – reakcja tworzenia kompleksów.....	67
4.21 Badanie oddziaływań zmodyfikowanej podjednostki σ^{70} z DNA - test kompetycyjny z wykorzystaniem filtrów nitrocelulozowych.....	68
4.22 Transkrypcja <i>in vitro</i>	68
4.23 Autoradiografia.....	68
5. Wyniki.....	70
5.1 Konstrukcja i klonowanie fragmentów podjednostki σ^{70}	71
5.1.1 Klonowanie fragmentów DNA kodujących białka FR1 i FR2.....	73
5.1.2 Klonowanie fragmentów DNA kodujących białka FR3, FR4 i FR5.....	77
5.2 Indukcja, ekspresja i oczyszczanie białek będącymi fragmentami podj. σ^{70}	80
5.3 Badanie aktywności fragmentów σ^{70}	94
5.3.1 Test kompetycyjny z wykorzystaniem filtrów membranowych dla białka FR3... 96	
5.3.2 Badanie oddziaływań fragmentów podjednostki σ^{70} z rdzeniem polimerazy RNA i promotorowym DNA – reakcja tworzenia kompleksów binarnych.....	100
5.3.3 Transkrypcja <i>in vitro</i>	111
6. Dyskusja.....	119
7. Streszczenie.....	132
8. Dodatek.....	134
9. Bibliografia.....	135

1. Wstęp

Nośnikiem informacji genetycznej we wszystkich żywych organizmach jest DNA i to ono decyduje jakie rodzaje białek syntetyzowane są w komórce. DNA nie uczestniczy bezpośrednio w syntezie białka, funkcję tę pełnią różne rodzaje RNA (kwas rybonukleinowy). Pośrednikiem w przenoszeniu informacji dla biosyntezy białka jest cząsteczka mRNA (ang. *messenger* RNA), powstająca na matrycy DNA w procesie transkrypcji. Dopiero informacja zawarta w tym kwasie nukleinowym przekładana jest na sekwencję aminokwasową białka w procesie translacji, w którym uczestniczą kolejne rodzaje RNA: transportowy (tRNA) i rybosomalny RNA (rRNA).

DNA bakterii koduje kilka tysięcy różnych białek, które są niezbędne do normalnego funkcjonowania komórki albo adaptacji do zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego. Białka te nie są potrzebne w komórce w tym samym czasie i w takiej samej ilości. Dlatego niezbędna jest wieloaspektowa regulacja ekspresji genów umożliwiająca komórce produkcję odpowiednich białek i pozwalająca jej na szybką adaptację do zmieniających się warunków bytowania. Między innymi dzięki tej regulacji synteza cząsteczek RNA może być włączona lub wyłączona w precyzyjny, zharmonizowany sposób. Najważniejszym i limitującym wszystkie kolejne etapy ekspresji genów jest inicjacja transkrypcji.

Proces transkrypcji polega na sekwencyjnym dodawaniu substratów trójfosforanów 5' rybonukleozydów (NTP) do wolnej grupy 3'OH rosnącego łańcucha RNA zgodnie z zasadą komplementarności w oparciu o matrycę DNA. Aby uzyskać specyficzny pełnowartościowy produkt w procesie transkrypcji musi się ona rozpocząć ze ściśle określonych miejsc wewnątrz matrycy DNA. Miejsca te nazywane są promotorami i są wyznaczone przez konserwowane sekwencje DNA.

Transkrypcja katalizowana jest przez enzym polimerazę RNA zależną od DNA (RNAP). Rdzeń polimerazy o masie molekularnej około 400 kDa składa się z pięciu podjednostek: 2α , β , β' i ω . Jego struktura i funkcja jest ewolucyjnie konserwowana od bakterii do człowieka. Rdzeń RNAP zawiera katalityczne centrum enzymu, nie jest jednak

zdolny do wydajnego i specyficznego zainicjowania procesu transkrypcji. W tym celu musi połączyć się z jedną z licznych podjednostek inicjacyjnych z rodziny sigma, połączenie to jest odwracalne. Dopiero utworzony w ten sposób holoenzym ($2\alpha\beta\beta'\sigma$) staje się inicjacyjnie kompetentny i specyficznie łączy się z sekwencją promotora. Oznacza to, że czynniki sigma są istotnym elementem regulacji ekspresji genów /223/.

Związanie się holoenzymu z sekwencją promotora skutkuje uformowaniem „kompleksu zamkniętego” z DNA w formie podwójnej helisy, który następnie jest przekształcany w „kompleks otwarty”. Na tym etapie ma miejsce rozdzielenie komplementarnych nici DNA wewnątrz sekwencji związanej przez enzym. Kompleks otwarty w obecności substratów zdolny jest do tworzenia pierwszego i kolejnych wiązań fosfodiesterowych powstającego łańcucha RNA. W większości przypadków holoenzym pozostaje w promotorze w kompleksie inicjacyjnym, powtarzając rundy tak zwanej transkrypcji abortywnej polegającej na tworzeniu i uwalnianiu krótkich transkryptów. Proces ten trwa do momentu zerwania przez holoenzym początkowych kontaktów z DNA i opuszczenia promotora (ang. *promotor escape*). Tworzy się wówczas pozbawiony podjednostki sigma kompleks elongacyjny. Rdzeń polimerazy i nowo powstający mRNA tworzy kompleks potrójny przesuwający się wzdłuż matrycy, wraz z lokalnie rozplecionym regionem DNA. Transkrypcja kończy się gdy RNAP dotrze do wewnętrznego sygnału terminacji, a w nowo powstającym RNA utworzy się struktura szpilki do włosów, co spowoduje rozpad kompleksu elongacyjnego. Terminacja może nastąpić również w wyniku współdziałania z akcesorowym białkiem Rho – terminacja Rho zależna. Rdzeń RNAP i RNA zostają uwolnione z kompleksu, a DNA przyjmuje formę dwuniciową. Uwolniony rdzeń polimerazy może ponownie połączyć się z podjednostką sigma i rozpocząć kolejną rundę transkrypcji /219, 223/.

Ostatnio coraz większe znaczenie dla efektywności transkrypcji przypisuje się przejściu od fazy inicjacji do fazy elongacji /222/. Wprawdzie pierwsze fazy inicjacji transkrypcji polegające na zlokalizowaniu promotora, związaniu polimerazy ze specyficznymi sekwencjami promotorowymi i utworzeniu kompleksu zamkniętego, a następnie izomeryzacja do kompleksu otwartego warunkują zajście wszystkich następnych faz transkrypcji to jednak, samo powstanie kompleksu inicjacyjnego nie oznacza, że transkrypcja będzie produktywna. Współczynnik TR (ang. „*Traveling ratio*”), opisujący w czasie transkrypcji efektywność wiązania enzymu do sekwencji kodujących w stosunku do

wiązania polimerazy przez sekwencje promotorowe, dla szybko rosnących bakterii *E. coli*, wynosi średnio 0.43 /174, 222/. W przypadku około 23% sekwencji wiążących polimerazę RNA, nie obserwuje się powstającego transkryptu. Może to świadczyć o tym, że taki promotor jest nieaktywny – nie jest zdolny do przejścia z fazy inicjacji do elongacji.

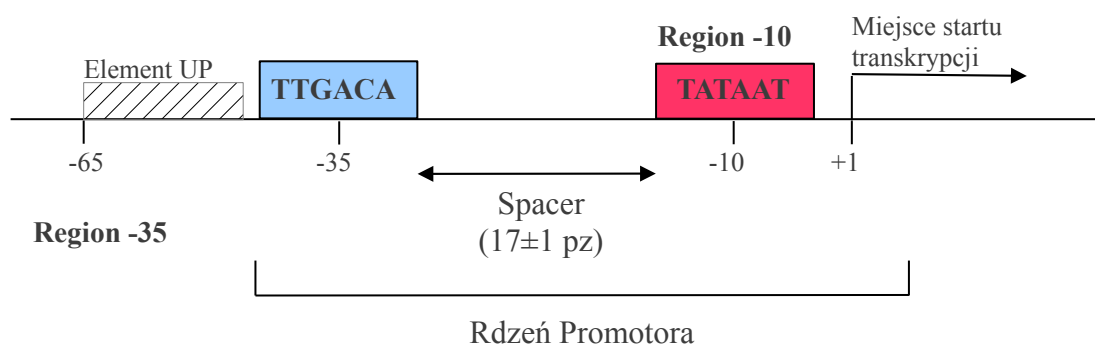
Pomimo ogromnego postępu jakiego dokonano w ostatnich latach w kwestii wyjaśniania mechanizmu transkrypcji, wiele aspektów tego procesu pozostaje nie wyjaśnionych. Nie jest na przykład jasne w jaki sposób rdzeń polimerazy jest uwalniany z kompleksu elongacyjnego, który zawiera trzy komponenty białko-polimerazę RNA, DNA i RNA (ang. *ternary complex*). Możliwe jest, że najpierw z kompleksu uwalniany jest RNA a następnie od DNA oddysocjowuje rdzeń. Możliwa jest jednak również wersja, wg której z kompleksu elongacyjnego uwalnia się rdzeń związany z produktem, a następnie RNA uwalnia się z kompleksu z rdzeniem. W pierwszym przypadku potrzebna byłaby dodatkowa aktywność akcesorowego białka RapA (HepA) /160, 194/, w drugim natomiast funkcję destabilizującą kompleks rdzeń-RNA mogłaby pełnić podjednostka δ polimerazy /112, 133/, a nawet podjednostka σ /1/. RapA, dzięki obecności dwóch N-terminalnych domen, wykazuje znaczące podobieństwo do domeny wiążącej polimerazę RNA w białku Mfd, które jest translokazą DNA ułatwiającą dysocjację kompleksu elongacyjnego przez wiązanie się z N-terminalnym segmentem podjednostki β polimerazy RNA /167, 175, 182, 205/.

1.1 Miejsce startu transkrypcji

Transkrypcja genów rozpoczyna się od specyficznej sekwencji DNA – promotora, który jest miejscem zorientowanego i stabilnego wiązania polimerazy RNA, co zapewnia miejscowo-specyficzne zainicjowanie syntezy łańcucha mRNA /53/.

Porównując znane bakteryjne i fagowe miejsca startu transkrypcji stwierdzono, że standardowy promotor zawiera trzy silnie konserwowane ewolucyjnie elementy strukturalne tworzące **rdzeń promotora**:

- 1) Region składający się z sześciu par zasad o sekwencji nici niematrixowej **5'-TATAAT-3'**, zlokalizowany jest około 10 pz powyżej (ang. *upstream*) miejsca startu transkrypcji +1. Sekwencję tę określa się również jako element -10 promotora lub heksamer -10. Inna przyjęta nazwa to Prinbow box /85, 130, 172, 173, 197, 208/.
- 2) Drugi region z konserwowaną sześci nukleotydową sekwencją zlokalizowany jest około 35 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. Sekwencja nici niematrixowej tego heksameru to **5'-TTGACA-3'**. Określa się go również jako: sekwencję -35, element -35 /85, 130, 197, 208/.
- 3) **Sekwencja oddzielająca** oba heksamery **-10 i -35** (ang. *spacer region*). Preferowana odległość pomiędzy sekwencjami konserwowanymi to 17 pz ± 2 /84, 130, 200/. Standardowy konsensusowy promotor *E. coli* przedstawiono na rycinie 1:



Ryc. 1 Struktura konsensusowego promotora *E. coli*. Przedstawiono rdzeń promotora i elementy flankujące. Rdzeń promotora obejmuje: region -10, region -35, odcinek oddzielający (ang. *spacer*) o długości 17 ± 2 pz oraz miejsce startu transkrypcji. Na lewo od heksameru -35 zaznaczony jest element UP (ang. *upstream promoter element*)

Dla większości analizowanych promotorów pierwszym nukleotydem transkryptu, w 93% przypadków, jest zasada purynowa A (47%) lub G. Region pomiędzy heksamerem -10 a miejscem startu transkrypcji to zazwyczaj 6 ± 2 pz /84, 85, 130/. W pewnych promotorach obecnych jest kilka miejsc startu transkrypcji co może świadczyć o pewnej elastyczności polimerazy RNA w wyborze miejsca rozpoczęcia transkrypcji /223/.

U prokariotów zarówno powinowactwo polimerazy RNA do DNA jak i tempo izomeryzacji kompleksów zamkniętych w kompleksy otwarte odporne na działanie kompetitora zależy od sekwencji promotora. Te dwa parametry określają **siłę promotora** /100/. O efektywności transkrypcji decyduje również szybkość z jaką polimeraza może opuścić promotor (ang. *promoter escape*), która również zależy od sekwencji promotorowej /101/.

Na podstawie korelacji pomiędzy siłą promotora i przewidywaną łatwością topnienia DNA zaproponowano, że region -10 odgrywa główną rolę w formowaniu kompleksu otwartego /57, 172, 208/. Sugerowano również, że region -35 jest niezbędny do rozpoznania promotora i początkowego wiązania przez polimerazę RNA, a region -10 odpowiada za wiązanie i topnienie DNA /66/.

Hawley i McClure wykazali, że 75% wszystkich mutacji upośledzających funkcjonowanie promotora zachodzi w silnie konserwowanych zasadach regionów -10 i -35. Mutacje, które obniżały wydajność inicjacji transkrypcji zmniejszały również homologię w sekwencjach konsensusowych /84/. Substytucje, które mogą spowodować lepsze dopasowanie do sekwencji konsensusowej przeważnie poprawiają funkcje promotora /84, 115/. Xu J. B i McCabe wykazali, że w trzech pozycjach -7, -9 i -11 heksamery -10 polimeraza RNA wydajnie wiąże tylko zasady konserwowane nici niematrixowej /233/. W pozostałych trzech pozycjach (-8, -10 i -12) wybierane zasady różniły się od konsensusowych. W tych pozycjach polimeraza RNA wybierała tylko pomiędzy dwoma z możliwych czterech zasad. Sugerowało to, że dwie nie wybierane zasady w każdej z tych pozycji nie były niezbędne do wydajnego formowania kompleksu otwartego.

Podstawienie zasad w regionie -35 promotora wpływało na powinowactwo polimerazy RNA do promotorowego DNA. Istnieją również obserwacje sugerujące, że region -35 wpływa na tempo formowania kompleksu otwartego /84, 208/. W tym przypadku można przyjąć prostą zasadę, że jeżeli polimeraza nie pasuje dobrze do promotora, etap izomeryzacji kompleksu zamkniętego w otwarty nie może postępować skutecznie. Największy wpływ na powinowactwo polimerazy RNA do promotorowego DNA miało podstawienie zasady w pozycji -32 /115/. Jest to pozycja z którą, jak wykazali Siegiele i wsp. /198/, oddziałuje region 4.2 podjednostki sigma.

Wykazano ponadto, że podstawienie zasady w pozycji -34A na konsensusową zasadę G znacznie zwiększało siłę promotora *lac* UV5. Taki promotor w badaniach Kobayashi i wsp. okazał się najsilniejszym promotorem. Z drugiej strony obecność A lub C w pozycji -34 generowała najsłabsze promotory pochodne. Pozycja -34 promotora może pełnić istotną rolę zarówno w wiązaniu polimerazy, jak formowaniu kompleksu otwartego /Kobayashi 1990/. Harlay i Reynolds wykazali, że trymer TTG jest najbardziej konserwowaną sekwencją regionu -35 /85/. Z tą pozycją promotora, jak wykazali Gardella i wsp. analizując mutanty σ^{70} , oddziałuje region 4.2 tego białka /62/.

Sekwencja poszczególnych promotorów nie jest optymalna dla wszystkich etapów inicjacji, a aktywność promotorów jest kinetycznym kompromisem pomiędzy tymi wszystkimi etapami determinowanymi przez sekwencje promotora /233/. Sekwencja naturalnie występujących promotorów wyewoluowała tak, aby mogły one np. silnie wiązać polimerazę RNA wydajnie konkurując o nieliczny enzym, albo szybko tworzyć kompleks otwarty równoważąc wpływ represorów.

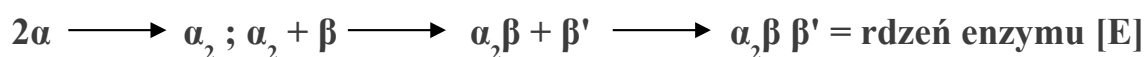
Optymalną długość regionu oddzielającego heksamery w promotorze ustalono na podstawie badań delecji i insercji zasad pomiędzy regionami -10 i -35. We wszystkich przypadkach promotor był silniejszy jeśli długość sekwencji oddzielającej była zbliżona do 17 pz /84/. Nukleotydy wewnątrz tej sekwencji promotora (ang. „*spacer*”), nie są bezpośrednio wiązane przez polimerazę RNA, ale odpowiadają za ustawienie dwóch heksamerów w odpowiedniej odległości i odpowiedniej orientacji przestrzennej, co umożliwia optymalny kontakt z enzymem. Pewnego typu substytucje zasad w obrębie odcinka oddzielającego oba heksamery, które generują powstanie segmentów DNA z odstępstwem od kanonicznej struktury DNA w formie B mogły jednak wpływać na siłę i funkcjonowanie promotora /2, 85, 116, 136, 137, 138, 200/.

Specjalną grupę promotorów stanowią tak zwane **rozszerzone promotory -10**, zawierające **region -16 TG**. Region -16, a szczególnie G w pozycji -15, jest umiarkowanie konserwowany u *Bacillus subtilis* i innych bakterii G(+) i słabo konserwowany u *E. coli*. Jest to dodatkowy region promotora rozpoznawany przez holoenzym polimerazy RNA połączony z podjednostką σ^A *B. subtilis* i $E\sigma^{70}$ *E. coli*. Sekwencja 5'-TTG-3' znajdująca się bezpośrednio powyżej regionu -10 jest istotna w przypadku niektórych słabych promotorów pozbawionych konserwowanego regionu -35 lub gdy ta sekwencja (-35) odznacza się słabą homologią /177, 178, 221/.

W miarę postępu badań sekwencji promotorowych okazało się, że na aktywność promotora wpływają również sekwencje znajdujące się poza obrębem rdzenia promotora /4/. W wielu promotorach powyżej sekwencji konsensusowych (około -20 pz powyżej regionu -35) znajduje się sekwencja bogata w pary AT (ang. *AT rich sequence*) określana jako element UP /54/. Obecność elementu UP może zwiększyć wydajność promotora nawet 30-krotnie w porównaniu z promotorami pozbawionymi tego elementu /178/. W doświadczeniach ze zmutowaną polimerazą RNA wykazano, że w oddziaływaniu z tym elementem zaangażowana jest C-terminalna domena podjednostki α /22, 69, 177, 178/.

1.2 Polimeraza RNA.

Polimeraza RNA (RNAP), jako enzym katalizujący syntezę RNA na matrycy DNA, została opisana po raz pierwszy w 1959 roku. Jedną z najlepiej poznanych i opisanych polimeraz RNA jest polimeraza *Escherichia coli*. W komórce tej bakterii w optymalnej logarytmicznej fazie wzrostu znajduje się w przybliżeniu 3000 cząsteczek enzymu, z tego tylko około 1 % stanowi frakcja wolnej polimerazy /223/. Na różnych etapach inicjacji, elongacji oraz terminacji z polimerazą mogą oddziaływać liczne dodatkowe białka. Niektóre z nich oddziałują z rosnącym transkrypcyjnym, a inne bezpośrednio z polimerazą, ale nie są uznawane jako konstytutywne składniki enzymu, tworzą one oddzielną klasę białek określanych jako czynniki transkrypcyjne. Składanie podjednostek rdzenia zachodzi sekwencyjnie według poniższego schematu /99, 102/:



Igarashi i wsp. /98/ wykazali, że istotną rolę w formowaniu aktywnego holoenzymu odgrywa **podjednostka α** – produkt genu *rpoA*, białko o masie 36,5 kDa zbudowane 329 aminokwasów. Szczególną rolę w tym procesie przypisuje się konserwowanym N-terminalnym segmentom aminokwasowym (30-75 i 175-210), których

homologi obecne są również w RNAP eukariotycznych, archealnych i plastydowych (RPB3 i RPB11 polimerazy RNA II) /169, 206/. Świadczy to o tym, że istnieje strukturalne i funkcjonalne podobieństwo polimeraz prokariotów i organizmów eukariotycznych. Heyduk i wsp. /95/ stwierdzili, stosując metodę footprintingu z wykorzystaniem rodników hydroksylowych, że dla procesu formowania holoenzymu istotne są kontakty aminokwasów 30 – 75 podjednostki α z podjednostką β i aminokwasów 175-210 z podjednostką β' . Nie można było uzyskać dowodów na bezpośredni kontakt podjednostki alfa z podjednostką σ /95/. Wiązanie podjednostki α do podjednostek β i β' podczas składania rdzenia zachodzi w sposób asymetryczny, jedna podjednostka α kontaktuje się z β , a druga z β' /98/.

Dzięki badaniom z wykorzystaniem ograniczonej proteolizy i jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) pokazano, że podjednostka ta składa się z dwóch niezależnych strukturalnie domen **α CTD** i **α NTD**, połączonych giętkim łącznikiem /9, 104/. N-terminalna domena podjednostki α (α NTD) jest niezbędna do procesu formowania rdzenia polimerazy RNA.

Drugą istotną rolą podjednostki α jest bezpośrednie wiązanie elementu UP promotorów i oddziaływanie z białkowymi aktywatorami. Za te oddziaływania odpowiedzialna jest głównie domena C-terminalna (**α CTD**) /9, 22, 104, 178/.

Podjednostki β i β' tworzą rdzeń katalityczny enzymu. **Podjednostka β** , produkt genu *rpoB*, jest białkiem o masie 150.6 kDa i zawiera 1342 aminokwasy. Wykazuje dużą homologię z drugą największą podjednostką wszystkich eukariotycznych polimeraz. Konserwowane regiony podjednostki beta zostały zgrupowane w dziewięć domen A-I /205/. W obrębie podjednostki β zmapowano również cztery miejsca kontaktu z rifampicyną, antybiotykiem hamującym tworzenie wiązań fosfodiesterowych pomiędzy pierwszymi nukleotydami rosnącego łańcucha RNA. Świadczy to o tym, że miejsce wiązania antybiotyku jest blisko centrum katalitycznego enzymu /105/. Na podstawie badań kroslinkowania (ang. *crosslinking*) ustalono, że rifampicina wiąże się w odległości 15 Å od początkowego 5' nukleotydu mRNA i około 2 Å od nukleotydów w pozycjach -2 i -3 matrycy. W ten sposób zidentyfikowano trzy obszary podjednostki β zlokalizowane blisko końca 5' transkryptu (Lys¹⁰⁶⁵ w segmencie H, His¹²³⁷ w segmencie I, Asp⁵¹⁶ i Arg⁵⁴⁰ w segmencie D) /157/.

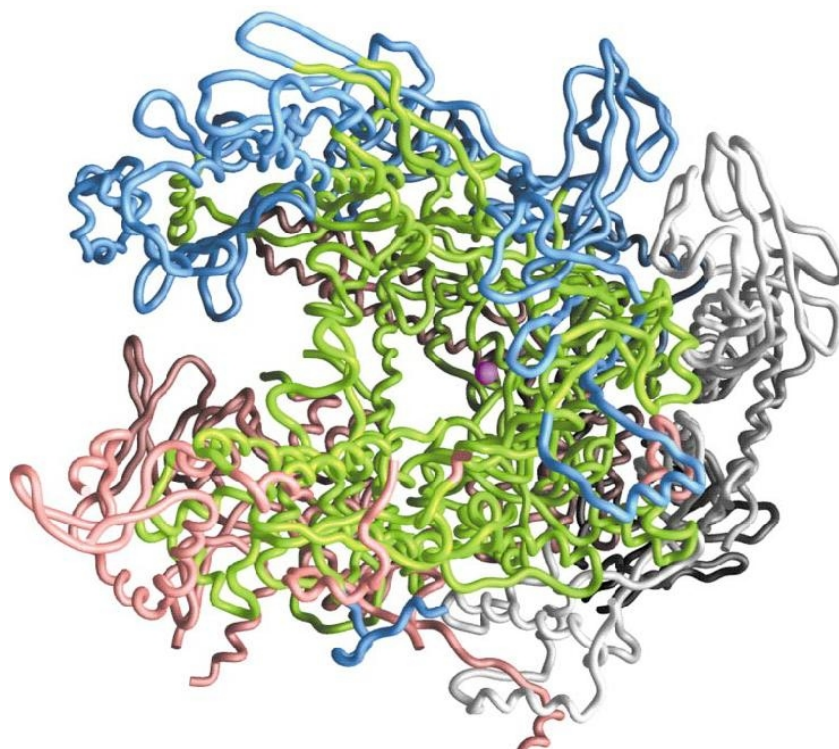
Podjednostka β jest również celem dla innych antybiotyków: streptolydigin /35/, lipiarmycyny /122/ i mikrocyyny J25 (MCCJ25) /8/. W tworzeniu kontaktów z podjednostkami α i β' zaangażowane są segmenty H i I podjednostki β /204/. Podjednostka β uczestniczy również w procesie pauzowania i terminacji – regiony C, D, F i I /127/. Uważa się również, że bierze ona bezpośredni udział w odpowiedzi ścisłej z udziałem guanozynotetrafosforanu (ppGpp) /5, 141, 213/.

Największą podjednostką polimerazy jest podjednostka β' (gen *rpoC*), zawiera 1407 aminokwasów i osiąga masę 155.2 kDa. W budowie tego białka wyodrębniono osiem konserwowanych segmentów A-H. W obrębie podjednostki zlokalizowano dwa regiony zaangażowane w wiązanie DNA. Jeden w N-terminalnym regionie (segment A) β' zawiera motyw palca cynkowego (ang. *Cys₄finger*). Drugi wewnątrz konserwowanego segmentu C jest regionem homologicznym ze szczeliną wiążącą DNA występującą w polimerazie I DNA *E. coli* /223/. Miejsca oddziaływania z antybiotykiem streptolydiginą zmapowano w segmencie F podjednostki β' . Antybiotyk ten hamuje elongację mRNA /190/.

W podjednostce beta' ($\beta'D$) znajduje się silnie konserwowany motyw NADFDGD zawierający trzy reszty kwasu asparaginowego tworzące centrum katalityczne enzymu. W doświadczeniach z tworzeniem wiązań krzyżowych uzyskano kowalencyjne połączenie końca 3' powstającego transkryptu z segmentem G tej podjednostki (Met⁹³²-Trp¹⁰²⁰) /13/. Podjednostka β' również bierze udział w procesie terminacji (segmenty C-H). Dodatkowo domena palca cynkowego w obrębie C-terminalnej części β' uczestniczy w antyterminacji /225/.

Wysoko oczyszczone preparaty polimerazy RNA *E. coli* zawierały małą podjednostkę ω , białko o masie 10105 Da. Analizy z wykorzystaniem wiązań krzyżowych pozwoliły stwierdzić, że białko to jest w bliskim kontakcie lub bezpośrednio połączone z podjednostką β' . Oznaczało to, że podjednostka ta jest integralną częścią rdzenia /145, 152/. Przypuszcza się, że białko to jest gwarantem prawidłowego połączenia podjednostki β' z formą przejściową rdzenia $\alpha_2\beta$. Funkcję tę ustalono w kontekście temperaturowrażliwego mutantu β' defektywnego w składaniu rdzenia, ponieważ gen *rpo Z* (kodujący podjednostkę ω) nie jest niezbędny dla przeżycia *E. coli* w standardowych warunkach laboratoryjnych. Podjednostka omega jest homologiem podjednostki RPB6 eukariotycznej polimerazy II /150/.

Ustalenie struktury zbudowanych z wielu podjednostek polimeraz RNA stanowi jedno z największych wyzwań biologii molekularnej. Od lat podejmowano próby uzyskania kryształów polimerazy RNA *E. coli*, które nadawałyby się do analiz rentgeno – strukturalnych. Próby te były jednak nieskuteczne ponieważ molekuly polimerazy RNA *E. coli* obdarzone są powierzchniowym ładunkiem ujemnym co uniemożliwiało tworzenie trójwymiarowych kryształów enzymu. Ostatnia dekada pozwoliła dokonać istotnego przełomu w ustaleniu struktury aparatu transkrypcyjnego. Opracowano szereg nowych technik badawczych, które pozwalają na stworzenie spójnego modelu kompleksu transkrypcyjnego. Pierwsze modele niskiej rozdzielczości otrzymano na drodze analizy obrazów uzyskanych za pomocą mikroskopu elektronowego dla dwuwymiarowych kryształów barwionych negatywowo octanem uranylu /37, 38/. Kryształy te uzyskiwano metodą wiązania cząsteczek polimerazy do monowarstwy dodatnio naładowanych lipidów. Podobną technikę zastosowano do eukariotycznej polimerazy II /36/. Już na tym etapie można było stwierdzić znaczące strukturalne podobieństwo prokariotycznej i eukariotycznej polimerazy RNA. Zastosowanie krio-elektromikroskopii zamrożonych, uwodnionych helikalnych kryształów pozwoliło znacznie zwiększyć zdolność rozdzielczą do poziomu 16 Å /38/. Istotny przełom stanowiło ustalenie struktury krystalograficznej fragmentów podjednostek polimerazy, w tym struktury N-terminalnej domeny podjednostki α (α NTD) z rozdzielczością 2,5 Å /242/. Kombinacja uzyskanych danych rentgeno-strukturalnych i wyników krio-elektromikroskopii pozwoliła ostatecznie na zlokalizowanie położenia fragmentów podjednostek na modelach polimerazy RNA niskiej rozdzielczości /38/. Skojarzenie tych analiz z wynikami innych technik badawczych (kroslinkowanie, footprinting, FRET i innych) umożliwiło stworzenie spójnych modeli polimerazy RNA. Modele te pozwalają stwierdzić, że polimeraza RNA *Thermus aquaticus* przypomina kształtem szczypce kraba utworzone odpowiednio przez podjednostki β i β' (Ryc. 2).

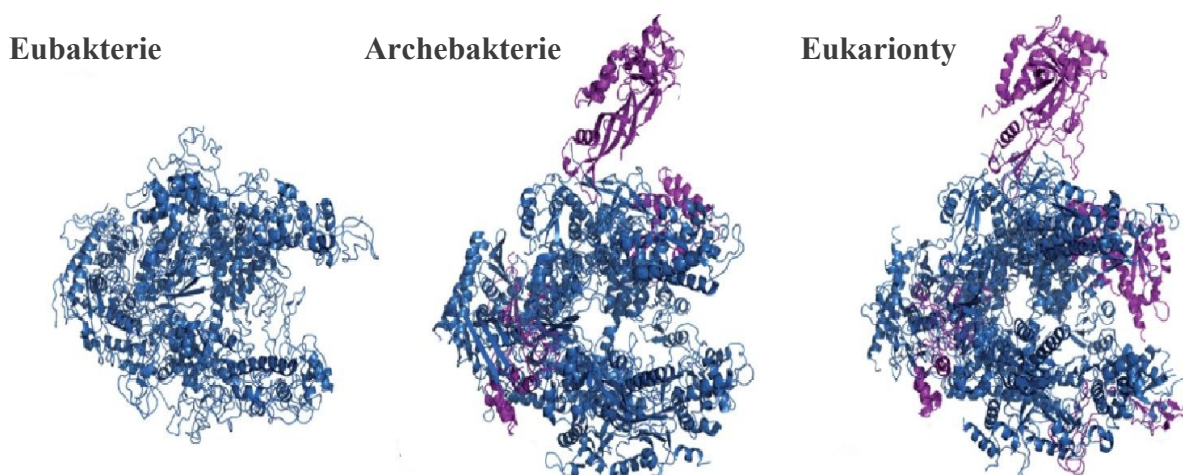


Ryc. 2 Schemat budowy rdzenia polimerazy RNA *Thermus aquaticus*. Kolorem zielonym przedstawiono najsilniej konserwowane fragmenty podjednostek β i β' . Słabiej konserwowane fragmenty podjednostki β przedstawiono kolorem niebieskim a β' różowym. Kolorem białym przedstawiono podjednostki $\alpha 1$ i $\alpha 2$ oraz ω spinające obie części szczypec utworzonych przez podjednostki β i β' . W ścianie kanału utworzonego przez podjednostki β i β' znajduje się jon magnezu (kolor fioletowy) zlokalizowany w centrum aktywnym enzymu /35/.

Na rysunku kolorem zielonym zaznaczono najsilniej konserwowane fragmenty białka zlokalizowane wokół centrum aktywnego. Najbardziej zmienne fragmenty enzymu zlokalizowane są peryferyjnie. Obie podjednostki α ulokowane są niesymetrycznie, $\alpha 1$ kontaktuje się z podjednostką β , natomiast $\alpha 2$ z β' . Podjednostki α wraz z podjednostką ω spinają obie części szczypec. Między podjednostkami β i β' tworzy się szczelina, która zdolna byłaby zaakceptować matrycowy DNA. Na rysunku 2 widać również, że jedna z domen podjednostki β' F (ang. *bridge helix*) wnika do środka kanału między podjednostki β , β' i współdziałając z β' G wydziela z niego drugi kanał (ang. *secondary channel*) o średnicy 10-12 Å. Tą drogą mogłyby dyfundować substraty trójfosforany nukleozydów do centrum katalitycznego. Obecnie dysponujemy obrazami krystalograficznymi rdzenia

polimerazy RNA *Thermus aquaticus* z rozdzielczością 3,3 Å /243/, holoenzymu polimerazy RNA z rozdzielczością 4 Å /156/, holoenzymu polimerazy RNA *Thermus aquaticus* z fragmentem promotorowej matrycy widełkowej 6,5 Å /155/, holoenzymu *Thermus thermophilus* 2,6 Å /217/ oraz kompleksu elongacyjnego polimerazy RNA II z drożdży w rozdzielczości 3,3 Å /71/.

Porównanie uzyskanych modeli pozwala stwierdzić, że istnieje strukturalne podobieństwo wszystkich polimeraz RNA, zarówno eubakterii, archebakterii jak i eukariontów (Ryc. 3). Podobieństwo to jest większe na poziomie struktury niż na poziomie sekwencji aminokwasowej. Świadczy to o silniejszej presji ewolucyjnej na zachowanie struktury i funkcji aparatu transkrypcyjnego.



Ryc. 3 Porównanie struktury polimeraz eubakterii, archebakterii i eukariontów. Funkcje niektórych fragmentów podjednostek bakterii właściwych przejmują dodatkowe podjednostki archebakterii i eukariontów. Najbardziej konserwowane regiony polimeraz RNA zaznaczono kolorem niebieskim /227/.

Najistotniejsza różnica sprowadza się do zwiększenia liczby podjednostek tworzących enzym. U eukariontów część funkcji podjednostek polimerazy RNA przyjmują ponadto dodatkowe czynniki transkrypcyjne (ang. *basal transcription factors*) /79, 187/.

1.3 Podjednostka sigma.

Podjednostkę sigma polimerazy RNA *Escherichia coli* opisali po raz pierwszy w 1969 roku Burgess i wsp. jako selektywny czynnik kierujący rdzeń polimerazy RNA do miejsca promotorowego w DNA, poprawiający dokładność transkrypcji i zwiększający znacznie jej wydajność /21/. Już wtedy sugerowano, że białko to rozpoznaje sekwencje promotora i być może ułatwia wyeksponowanie ukrytych domen rdzenia polimerazy odpowiedzialnych za wiązanie DNA.

Podjednostka sigma dzięki multidomenowej budowie może brać aktywny udział w rozpoznawaniu sekwencji promotorowych. Wprawdzie sama nie wykazuje zdolności wiązania dwuniciowego DNA, ponieważ jedna z mobilnych domen przesłania obecne w białku miejsce wiązania jednego z heksametrów /47/, to jednak w kompleksie z rdzeniem polimerazy RNA jest zdolna do rozpoznawania sekwencji promotorowej. Powszechnie akceptuje się pogląd, że to właśnie podjednostka sigma jest odpowiedzialna za specyficzne wiązanie promotora, a rdzeń polimerazy sam nie jest zdolny do specyficznego rozpoznawania promotorowego DNA. Sugerowano, że związanie podjednostki sigma przez rdzeń indukuje zmiany konformacyjne podjednostki odsłaniając domenę wiążącą heksamer -35. Po zakończeniu inicjacji transkrypcji i przejściu do fazy elongacji funkcja podjednostki sigma w rozpoznawaniu promotora staje się zbędna, podjednostka oddysocjowuje pozostawiając wysoce procesywny rdzeń syntetyzujący RNA. Sama natomiast może związać się z nowym kompleksem rdzenia by zapoczątkować nowy akt inicjacji transkrypcji. Ta sekwencja wydarzeń nosi nazwę „cyklu σ ” /151, 215/. Ma ona istotne znaczenie dla skuteczności szybkiej reakcji komórki prokariotycznej na bodźce środowiskowe, ponieważ usunięcie podjednostki sigma z kompleksu z polimerazą pozwala na związanie rdzenia z inną podjednostką sigma przeprogramując tym samym polimerazę RNA na rozpoznawanie innych promotorów, ekspresję informacji z nowej puli genów oraz udział innych mechanizmów regulacyjnych. W normalnych warunkach wzrostu dominującą podjednostką sigma jest u *E. coli* σ^{70} odpowiedzialna za wykorzystanie podstawowych genów zapewniających funkcjonowanie komórki. Alternatywne podjednostki sigma odpowiedzialne są za wykorzystanie genów niezbędnych do przeżycia w warunkach szoku termicznego (σ^{32}), wiązania azotu (σ^{54}), procesie sporulacji,

w warunkach stresu czy też w fazie stacjonarnej (σ^S) /70, 117, 201, 231/. Na to, które podjednostki sigma będą mogły związać rdzeń polimerazy oraz jak wygląda dostępna pula tych podjednostek wpływ ma nie tylko szybkość syntezy, modyfikacji czy też szybkość degradacji białka, lecz również oddziaływanie podjednostek sigma z czynnikami antysigma (ang. *antisigma factors*) /27, 88, 107, 126/. W komórce bakteryjnej dostępność rdzenia jest czynnikiem limitującym. Ocenia się, że z całej ilości polimerazy RNA w komórce (stężenie ok. 10-20 μM) tylko ok. 1% polimerazy występuje w stanie niezwiązanym w kompleks z DNA. Czynniki antysigma, obniżając efektywne stężenie którejs z podjednostek sigma, mogą więc całkowicie wykluczyć funkcjonowanie pewnych promotorów. Z kolei inne czynniki, takie jak np. Crl *Escherichia coli* są pozytywnie działającymi faktorem, które ułatwiają wiązanie σ^S z rdzeniem polimerazy RNA /52/. Silnym argumentem na rzecz odwracalnego wiązania sigmy w holoenzym, a następnie oddysocjowywania jej z kompleksu elongacyjnego są różnice powinowactwa podjednostki σ^{70} do rdzenia ($K_D \sim 10^{-10}$ M) i kompleksu elongacyjnego ($K_D \sim 10^{-6}$ M) /67, 151/. W tym drugim przypadku wartość ta jest na tyle duża, że inne czynniki transkrypcyjne mogą skutecznie współzawodniczyć z podjednostką sigma o enzym w kompleksie elongacyjnym (np. NusA $K_D \sim 10^{-8}$ M).

Odkrycie kolejnych, alternatywnych podjednostek sigma /134/, rozpoznających odmienne sekwencje promotorowe i analiza wpływu mutacji tych podjednostek na rozpoznawanie promotorów skłaniały do wniosku, że rdzeń enzymu w ogóle nie rozpoznaje sekwencji promotorowej. Dalsze badania funkcji podjednostki sigma ujawniły jej szczególną rolę w procesie inicjacji transkrypcji. Kiedy podjednostka sigma połączy się z rdzeniem to nie tylko umożliwia specyficzne rozpoznanie sekwencji promotora i zlokalizowanie polimerazy w miejscu startu transkrypcji, ale również promuje duże zmiany konformacyjne w całym enzymie, umożliwiając jego konwersję z potencjalnie transkrypcyjnie kompetentnej formy do formy inicjacyjnej. Dodatkowo ułatwia rozdzielenie nici DNA podczas formowania kompleksu otwartego, stabilizuje rozdzielone nici i najprawdopodobniej również wpływa na wczesne etapy syntezy RNA /91, 164, 181, 189/. Część aktywatorów i represorów wpływających na inicjację transkrypcji działa na polimerazę za pośrednictwem podjednostki sigma /129, 132, 141/.

W oparciu o podobieństwa w sekwencji, strukturze i funkcjonowaniu bakteryjne czynniki sigma można podzielić na dwie odrębne rodziny: σ^{70} i σ^{54} . Większość czynników sigma eubakterii należy do rodziny σ^{70} , której nazwa pochodzi od

podstawowego czynnika sigma *E. coli* o masie 70 kDa /131/. Wszystkie eubakterie zawierają jeden lub więcej czynników należących do tej rodziny, która dzieli się na trzy grupy. Pierwszą grupę stanowią podstawowe czynniki sigma, odpowiedzialne za transkrypcję genów (ang. „*house keeping genes*”), których produkty są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórki w fazie eksponencjalnego wzrostu w warunkach standardowych. Czynniki te wykazują co najmniej 51% podobieństwa sekwencji aminokwasowej. Do drugiej grupy należą czynniki, których sekwencja aminokwasowa jest bardzo podobna do podstawowych czynników sigma, ale nie są one tak istotne dla funkcjonowania komórki (ang. *nonessential*). Są one odpowiedzialne za ekspresję genów w stacjonarnej fazie wzrostu. Do trzeciej grupy zaliczamy alternatywne czynniki sigma istotne w warunkach stresu (np. podwyższonej temperatury) lub gwałtownie zmieniających się warunków pokarmowych. Czynniki alternatywne pod względem sekwencji aminokwasowej znacznie różnią się od podstawowych czynników z tej rodziny /87, 131, 231/.

Rodzina σ^{54} *E. coli*, nazwana tak od podjednostki sigma o masie 54 kDa odpowiedzialnej za gospodarkę azotową, obejmuje tylko jedną grupę czynników wymaganych w pewnych warunkach bytowania. Czynniki te nie są niezbędne dla wzrostu komórki. Białka te nie wykazują podobieństw w sekwencji aminokwasowej z podstawowymi czynnikami sigma /148/.

Podjednostki należące do poszczególnych grup rozpoznają tylko specyficzne dla nich klasy promotorów różniące się sekwencją konsensusową /223/.

Porównanie sekwencji białek z rodziny σ^{70} umożliwiło wyodrębnienie czterech silnie konserwowanych regionów aminokwasowych (domen) połączonych giętkimi łącznikami, których sekwencja nie jest tak konserwowana. Łączniki te zapewniają białku dużą elastyczność i łatwość zmian konformacji /89/. W miarę postępu badań nad strukturą i funkcją podjednostek sigma regiony te zostały dalej podzielone na podregiony (1.1-1.2, 2.1-2.5, 3.1-3.2 i 4.1-4.2) (Ryc. 4C), które pełnią istotną rolę na różnych etapach inicjacji transkrypcji /12/.

Analizując delecje punktowe w podjednostce sigma ustalono, że głównym regionem odpowiedzialnym za wiązanie się podjednostki sigma z rdzeniem jest region 2.1 (reszty 361- 390) określane jako CB (ang. *core binding domain*) /128/. Rolę tego regionu w tworzeniu kontaktu z rdzeniem potwierdzono w przypadku σ^E *Bacillus subtilis* /196/. Dalsze

badania genetyczne ujawniły wiele dodatkowych regionów podjednostki sigma biorących udział w kontakcie z rdzeniem polimerazy. Zmapowano liczne mutacje punktowe w wielu konserwowanych regionach σ^{32} – 2.2, 3.1 i 4.2, wpływające na oddziaływanie z rdzeniem /109, 110/. Owens i wsp. ustalili, że ze strony rdzenia oddziaływanie z regionem 2.2 podjednostki sigma zachodzi za pośrednictwem super zwiniętej (CC) domeny podjednostki β' (reszty 260-309) /236/. Jeżeli w tym regionie β' wystąpi mutacja A302D, całkowicie zostaje zablokowane oddziaływanie holoenzymu z DNA. Wydaje się więc, że jest to kluczowe oddziaływanie gwarantujące wydajną zmianę konformacji w podjednostce sigma umożliwiającą aminokwasom regionu 2.3-2.4 wiązanie z DNA /19/.

Badania biochemiczne i genetyczne prowadzone przez Grubera i wsp., których celem było znalezienie powierzchni kontaktu pomiędzy rdzeniem polimerazy RNA a podjednostką sigma doprowadziły do wniosku, że w kontakt ten zaangażowane są wyłącznie podjednostki β i β' /77/. Nie stwierdzono oddziaływań podjednostki sigma z podjednostkami α i ω . W pierwszej kolejności oddziaływania zachodzą na tzw. „początkowej powierzchni styku” (ang. *initial interface*): reszty aminokwasowe 900-909 (domena Flap) podjednostki β oddziałują z regionem 1.1 podjednostki sigma (I53), fragment β – aa 949-1342 z regionem 3.1 podjednostki sigma (P504), a region superzwinięty β' (A302) z regionem 2.2 (Q406, E407) podjednostki sigma /77/.

W trakcie tych początkowych kontaktów, w podjednostce sigma zachodzą istotne zmiany konformacyjne, które dzięki odsunięciu regionu 1.1 prowadzą do wyeksponowania domen 2.4 i 4.2 odpowiedzialnych za wiązanie promotorowego DNA. W wyniku tych zmian tworzy się tzw. „struktura otwarta” holoenzymu gotowa na związanie DNA (ang. *holoenzyme interface*). Regiony β (1-237, 235-651) oddziałują z regionem 3.1-4.2 σ (E555), region β (949-1342), podobnie jak region podjednostki β' zawierający strukturę palca cynkowego, również oddziałuje z tym samym regionem podjednostki sigma (L598).

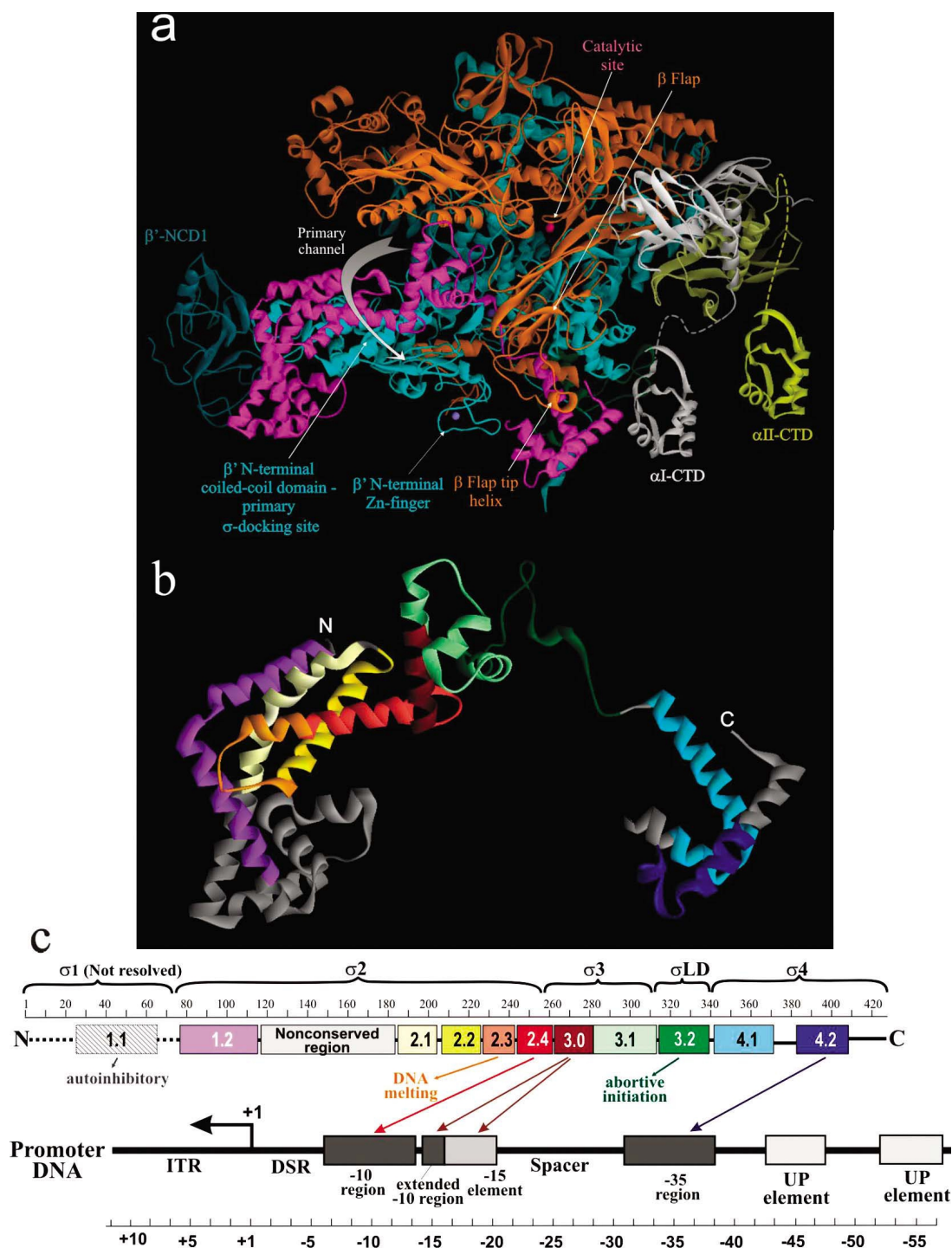
1.3.1 Udział podjednostki σ w kolejnych etapach inicjacji transkrypcji.

Wczesne fazy poprzedzające inicjację transkrypcji odbywają się bez bezpośredniego udziału podjednostki σ . Na tym etapie polimeraza RNA poszukuje sekwencji promotorowych skanując DNA by znaleźć anomalie strukturalne samego DNA lub kompleksy białkowe w miejscach wiązania aktywatorów transkrypcji. W tej fazie oddziaływania enzymu z DNA mają charakter elektrostatycznych oddziaływań niespecyficznych [219, 220]. W przypadku promotora A1 faga T7 pierwszy kontakt z promotorowym DNA rozpoczyna się od związania elementu UP przez C-terminalne domeny (α -CTD) podjednostek α polimerazy RNA [185]. Związanie enzymu z promotorem i utworzenie najpierw kompleksu zamkniętego RP_C , a następnie w wyniku izomeryzacji do kompleksu otwartego RP_O odbywają się z bezpośrednim udziałem podjednostki σ polimerazy RNA. Metodą footprintingu z wykorzystaniem rodników hydroksylowych wykazano, że w kompleksie zamkniętym polimeraza RNA wiąże się z sekwencjami -35 i -10 promotora dając powtarzający się obraz protekcji DNA w rejonie od -60 do -4 DNA [183]. Świadczy to o tym, że polimeraza zlokalizowana jest po jednej stronie podwójnej helisy DNA. W kompleksie otwartym protekcja DNA rozszerza się i obejmuje miejsce startu transkrypcji aż do pozycji +20 [183]. Region -14 do +20 jest całkowicie chroniony przez polimerazę przed działaniem rodników hydroksylowych. W obrębie -56 do +11 utrzymuje się częściowa, periodyczna protekcja DNA. W kompleksie otwartym DNA jest rozplecione w regionie pętli transkrypcyjnej (-12 - +2). Świadczy o tym między innymi reaktywność zasad nukleinowych w jednoniciowym DNA z odczynnikami modyfikującym te zasady [240]. Przejście RP_C w RP_O związane jest z drastycznymi zmianami konformacji zarówno DNA jak i enzymu i odbywa się poprzez dyskretne stadia pośrednie (ang. *intermediated complexes*) [145, 146, 183]. Kompleks otwarty w obecności substratów zdolny jest do syntezy RNA, najpierw w cyklicznych aktach transkrypcji abortywnej, a następnie produktywnej transkrypcji, w czasie której powstaje wysoce procesywny kompleks elongacyjny i właściwy produkt transkrypcji. W większości przypadków na etapie transformacji kompleksu otwartego w elongacyjny, gdy produkt transkrypcji osiąga długość 9-12 nukleotydów, podjednostka σ uwalnia się z kompleksu [80, 118, 149, 202]. Dobrze udokumentowane jest jednak również istnienie kompleksów elongacyjnych zawierających podjednostkę σ [6, 153].

1.3.2 Rozpoznanie promotorowego DNA- kompleks zamknięty (RPC) i otwarty (RPO)

Stosunkowo wcześniej zauważono, że podjednostka sigma polimerazy RNA jest niezbędna do rozpoznawania sekwencji promotorowej /74/. Pełni ona rolę czynnika transkrypcyjnego niezbędnego do procesu inicjacji transkrypcji. Odkrycie modularnej struktury podjednostki sigma, silnie konserwowanej w całej rodzinie σ^{70} , pozwalało przypuszczać, że różne domeny podjednostki σ mogą brać udział w rozpoznawaniu różnych elementów strukturalnych promotorowego DNA /74, 82, 83, 131/. Za pomocą analiz odpowiednich mutantów w podjednostce sigma oraz analiz biochemicznych, w tym peptydowych fragmentów fuzyjnych z GST wykazano, że z czterech silnie konserwowanych domen regiony 2.4 i 4.2 zawierają determinanty wiążące odpowiednio region -10 i -35 promotora /12, 49, 159/.

Pokazano również, że N-terminalny fragment domeny 1.1 podjednostki σ^{70} hamuje wiązanie izolowanej podjednostki do DNA /47/. Usunięcie z N-końca podjednostki σ kilkudziesięciu aminokwasów umożliwia wiązanie przez takie skrócone białka fragmentów DNA zawierających promotorowe DNA. Natomiast fragmenty zawierające ok. 100 aminokwasów z N-terminalnej domniemanej inhibitorowej domeny 1.1 hamują w konformacji trans wiązanie do promotorowego DNA fragmentów fuzyjnych zawierających domeny 2.4 i 4.0 podjednostki σ , najprawdopodobniej poprzez oddziaływanie z domeną 4 /47/. Wyniki te sugerowały, że wolna podjednostka σ występuje w formie „nieaktywnej”, niezdolnej do rozpoznawania sekwencji promotorowej. Po związaniu z rdzeniem podjednostka σ przechodzi istotne zmiany konformacyjne, odsłonięta zostaje domena 4 podjednostki i holoenzym jest zdolny do specyficznego rozpoznania sekwencji promotorowej. Interesujące jest również to, że niewielkie białko fagowe AsiA faga T4 może całkowicie przemodelować strukturę fragmentu podjednostki sigma (przejście motywu H-T-H w pseudohelise) zmieniając specyficzność polimerazy RNA /96, 126/. Sugeruje to, że inna lecz równie drastyczna zmiana konformacyjna podjednostki sigma jest niezbędna do rozpoznawania promotorów faga T4 (*middle promoters*) za pośrednictwem aktywatora MotA i AsiA.



Ryc. 4 Struktura i funkcjonalna organizacja podjednostki σ . **a)** Struktura krystaliczna holoenzymu polimerazy RNA *Thermus thermophilus*. Podjednostkę sigma zaznaczono kolorem czerwonym.

b) Schemat ułożenia podjednostki σ w holoenzymie *T. thermophilus*. Kolorowe regiony na modelu wstążkowym odpowiadają ewolucyjnie konserwowanym regionom podjednostki sigma przedstawionym na diagramie c. **c)** Funkcjonalna charakterystyka podjednostki sigma. Schemat górny – diagram liniowy przedstawiający domeny i regiony konserwowane, schemat dolny – regiony promotorowego DNA z zaznaczonymi oddziaływaniami z odpowiednimi domenami wiążącymi DNA podjednostki sigma [12/.

W celu analizy mechanizmu rozpoznawania sekwencji promotora, wyselekcjonowano warianty podjednostki sigma, które kompensowały słaby promotor z mutacjami punktowymi w sekwencjach konserwowanych. Dzięki temu zidentyfikowano dwa odrębne regiony 2 i 4 odpowiedzialne za rozpoznanie odpowiednio elementu -10 i -35 promotora /62, 198/. W tym samym czasie Zuber i Losick zlokalizowali mutację w alternatywnej podjednostce σ^H *Bacillus subtilis*, która również wpływała na rozpoznanie sekwencji -10 promotora /245/. Mutacje σ^H i σ^{70} zlokalizowane zostały w analogicznych regionach, co sugerowało, że podjednostki z rodziny σ^{70} rozpoznają sekwencję promotora w podobny sposób.

Reszty odpowiedzialne za bezpośrednie wiązanie się z zasadami heksamery -35 zlokalizowano w motywie HTH (ang. *helix-turn-helix*) regionu 4.2 podjednostki sigma. Mutacje R584 i R588, w dwóch pozycjach motywu HTH, wpływały na rozpoznanie dwóch zasad w regionie -35 promotora /62, 198/. Bliski kontakt reszt cysteiny tego regionu z sekwencją -35 promotora potwierdziły doświadczenia kroslinkowania wykonane przez Owensa i wsp. Użyli oni kompleksów Fe-EDTA związanych kowalencyjnie z resztą cysteiny [FeBABE: Fe(S)-1-p-bromoacetoamidobenzyl) EDTA], którą w wyniku substytucji wprowadzono do motywu HTH regionu 4.2 /165/. Eichenberger i wsp. wykazali ponadto, wykorzystując technikę footprintingu laserem UV, że krzyżowe wiązania pomiędzy motywem HTH regionu 4.2 podjednostki sigma, a zasadami heksamery -35 powstają w pierwszych etapach inicjacji transkrypcji /51/. Kontakt obu reagujących składników jest zachowany przez cały proces formowania kompleksu otwartego /152, 183/.

Oddziaływanie sigmy z regionem -10 promotora jest znacznie bardziej skomplikowane, ponieważ w tym regionie zachodzi rozdzielanie nici DNA w procesie formowania kompleksu otwartego. Podjednostka sigma zaangażowana jest w sekwencyjno-specyficzne oddziaływanie zarówno z dwu jak i z jednoniciowym DNA oraz dodatkowo w niespecyficzne oddziaływania, które wspomagają rozdzielanie nici DNA.

Mutacje podjednostki sigma specyficznie znoszące efekt delekcji pierwszych dwóch zasad w elemencie -10 promotora zlokalizowano w obrębie α helisy regionu 2.4. Otrzymano trzy mutacje wpływające na rozpoznanie pierwszej zasady w heksamerze -10, w tym dwie dla σ^{70} - TI440, QH437 i jedną RA100 dla σ^H /62, 198, 245/. Na rozpoznanie drugiej zasady elementu -10 wpływała mutacja RA 96 σ^H /34/.

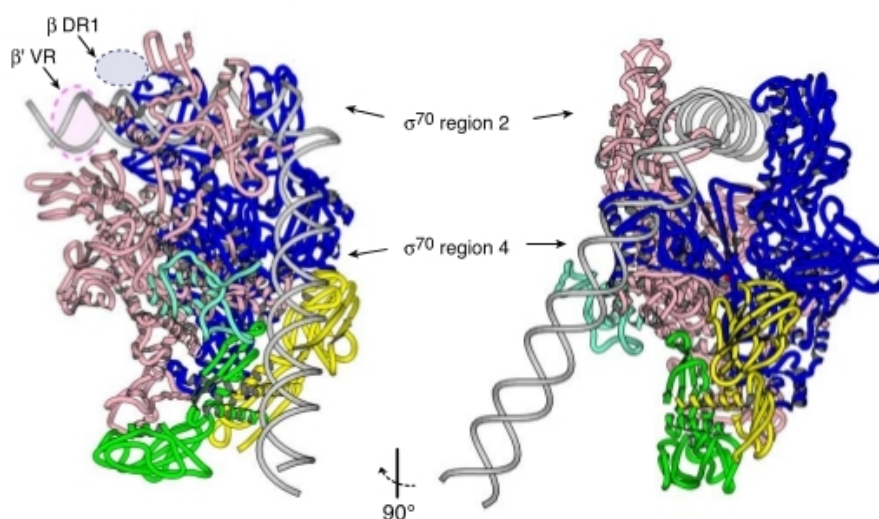
Przy użyciu testu kompetycyjnego Dombroski i wsp. pokazali, że fragmenty podjednostki sigma, jako białka fuzyjne z GST zawierające region 2.4, bezpośrednio rozpoznają trzy konserwowane zasady w pozycjach -12, -11 i -10 regionu -10 promotora /45, 48/. W doświadczeniach tych nie stwierdzono wiązania jednoniciowego DNA przez wolną podjednostkę σ^{70} *E. coli*, nawet pozbawioną regionu 1.1. Może to świadczyć o tym, że oddziaływania te zachodzą jedynie w kontekście holoenzymu. Callaci i Hayduk w swoich doświadczeniach z σ^A *Thermus aquaticus* wykazali, że wiązanie jednoniciowego DNA przez holoenzym za pośrednictwem podjednostki sigma wrasta 200 krotnie w porównaniu z izolowaną, wolną podjednostką /23/.

Z kolei Marr i wsp. wykazali, że to holoenzym specyficznie rozpoznaje jednoniciowy oligonukleotyd zawierający sekwencje nici niematrixowej i dzieje się to za pośrednictwem podjednostki sigma, ponieważ mutacja Q437H w regionie 2.4 podjednostki σ znacząco wpływała na to oddziaływanie /144/. Wcześniej wykazano również, że podjednostka σ tworzy kowalencyjne wiązanie z zasadami nukleotydowymi w pozycjach -7 i -3 nici niematrixowej /17/. Roberts i Roberts stwierdzili, że zmiana zasad konsensusowych w pozycjach -12, -11 albo -7 nici niematrixowej znacząco wpływała na tempo formowania kompleksu otwartego /176/. Z drugiej strony, na rozpoznanie jednoniciowej matrycy miało wpływ tylko błędnie wstawione G w pozycji -12 i -11. Inne zasady niekonsensusowe w nici niematrixowej nie miały żadnego (-12) albo tylko mały (-11) wpływ na formowanie kompleksu otwartego. Kiedy testowano mutacje w dwuniciowym promotorowym DNA podjednostka sigma pozbawiona domeny 1.1 nie rozpoznawała zasad niekonsensusowych w pozycji -12 i -11 /45/. Wyniki te sugerują, że region 2.4 podjednostki sigma rozpoznaje zarówno pojedynczą jak i podwójne nici DNA, ale zasady rozpoznania tych nici wydają się odmienne.

Wykorzystując dane o strukturze holoenzymu, techniki footprintingu i analizy genetyczne można zaproponować spójny model powstawania i struktury najpierw kompleksu zamkniętego, w którym holoenzym związany jest z dwuniciowym promotorowym DNA, a następnie izomeryzacji i powstawania kompleksu otwartego. W pierwszej fazie polimeraza RNA wędrując wzdłuż DNA (jednowymiarowa dyfuzja) napotyka dystorsję DNA w postaci załamania związanego z sekwencjami poliA elementu UP promotora. Kinetyczne eksperymenty z wykorzystaniem szybkich technik

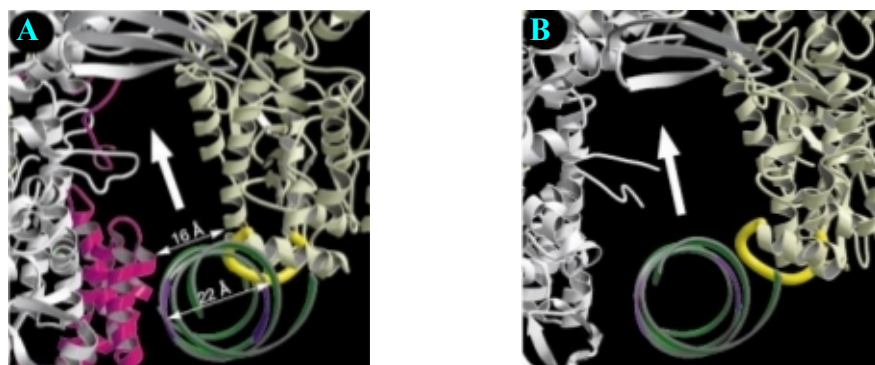
footprintingu w czasie rzeczywistym rodnikami hydroksylowymi generowanymi przez promieniowanie X otrzymane za pomocą synchrotronu pozwoliły stwierdzić, że pierwotne kontakty enzymu z DNA w regionie -80 - -50 stopniowo, poprzez stadia pośrednie, prowadzą do powstania kompleksu zamkniętego z dolną granicą protekcji -5 /185/.

W odpowiedniej sekwencji muszą temu towarzyszyć oddziaływania DNA z α -CTD, σ_4 , σ_3 , i σ_2 podjednostki sigma. Kolejną fazę stanowi rozciągnięcie protekcji na region aż do +20, co musi być związane z załamaniem DNA ($\sim 90^\circ$) w pozycji -12/-11 /41, 179/. Powstaje w ten sposób kompleks pośredni I_1 , w którym komplementarne zasady pętli transkrypcyjnej pozostają sparowane (Ryc. 5), a pozycja +1 DNA znajduje się ok. 50 Å od centrum aktywnego.



Ryc. 5 Model kompleksu przejściowego I_1 polimerazy RNA *T. aquaticus* z promotorem λP_R . Prezentowany model nie zawiera podjednostki σ . Prawdopodobnie pozycje regionów 2 i 4 podjednostki sigma wskazują strzałki. Dwuniciowy DNA umieszczony jest między szczękami utworzonymi przez podjednostki β (kolor niebieski) i β' (kolor różowy), które w dolnej części modelu spięte są N-terminalnymi domenami podjednostek α (kolor zielony i żółty). Podjednostkę ω przedstawiono kolorem jasnoniebieski a jon magnezu w centrum katalitycznym kolorem czerwonym. Owalne koła przedstawiają schematycznie rozwinięte i mobilne domeny β' VR (ang. *variable region*) i DR1 β (ang. *dispensable region*) występujące u *E. coli*, nieobecne w *T. aquaticus* /179/.

Załamaniem DNA by umieścić go w szczelinie między szczękami utworzonymi przez β i β' z domenami DR1 podjednostki β i VR β' mogłoby dojść do skutku dzięki oddziaływaniu z domeną 2 podjednostki σ . W modelu tym I_1 zawiera dwuniciowy DNA, rozstrzygnięto tym samym kontrowersje odnośnie momentu rozplatania DNA. Dopuszcza się bowiem, że dwuniciowy DNA mógłby być umieszczony w kanale głównym holoenzymu, jednak średnica kanału wydaje się być za mała by zaakceptować dwuniciowy DNA w formie B. Z obrazów dyfrakcyjnych uzyskanych dla *Thermus thermophilus* wynika, że średnica wejścia do kanału głównego w przypadku holoenzymu wynosi $\sim 16 \text{ \AA}$ (Ryc. 6) /217/.



Ryc. 6 Schemat kanału głównego w obrębie holoenzymu (a) i w rdzenia (b) polimerazy RNA *Thermus aquaticus*. a) W holoenzymie wejście do kanału głównego dla dsDNA jest blokowane przez α -spirale podjednostki sigma (aa 74-92, region 1.2 – kolor różowy) i fragment motywu HLH (helix-loop-helix) podjednostki β (aa 232-259 kolor szaro-żółty), kolorem zielonym zaznaczono DNA /217/.

Skłaniało by to więc do przypuszczeń, że DNA powinien najpierw ulec topnieniu w regionie -10, a następnie być umieszczony w kanale głównym. Równoznaczne by to jednak było ze zmianą poglądów na mechanizm tworzenia kompleksu otwartego i proces izomeryzacji $RP_C \rightarrow RP_O$. Należałoby bowiem założyć, że najpierw zachodzi topnienie DNA w heksamerze -10 pod wpływem podjednostki sigma, a dopiero później rozszerzenie protekcji w kierunku transkrypcji. Kompleks pośredni I_1 powinien w takim przypadku zawierać jednoniciowy DNA i wykazywać zwiększoną reaktywność zasad w stosunku do $KMnO_4$. Ostatecznie wykazano jednak, że region polimerazy zawierający domenę Clamp wykazuje nadzwyczajną giętkość strukturalną i najprawdopodobniej

wielkość szczeliny między domenami β' Clamp i β Loobe może wzrastać do 25 Å /38, 154/. Możliwe jest zatem powstanie kompleksu pośredniego z DNA zlokalizowanym w szczelinie głównej bez uprzedniej separacji nici DNA.

Analizy kinetyczne kompleksów polimerazy RNA z promotorem λP_R pozwalają stwierdzić, że przejście kompleksu pośredniego I_1 w kompleks pośredni I_2 związane jest z jednoczesnym otwieraniem DNA w regionie -11 - +2. DNA kompleksu I_1 zlokalizowane jest w szczelinie dla DNA, ponieważ protekcja DNA, która rozwija się w przeciągu 100 ms obejmuje region aż do +20, jak w docelowym kompleksie otwartym. W tym czasie DNA wykazuje ciągle małą reaktywność w stosunku do $KMnO_4$. Obraz charakterystyczny dla rozpleczonego DNA powstaje w znacznie dłuższym czasie (dziesiątki sekund). Ponadto znacznie słabsza zależność otwierania DNA w kompleksie od stężenia soli w porównaniu z wolnym DNA w roztworze, sugeruje, że DNA w I_2 w znacznie mniejszym stopniu poddany jest działaniu środowiska. Izomeryzacji $RPc \rightarrow RPo$ przez stadia pośrednie $I_1, I_2 \dots$ towarzyszą istotne zmiany konformacji polimerazy RNA. Mobilne regiony podjednostek β i β' (Lobe, Protrusion i Clamp) przemieszczają się tworząc strukturę obejmującą dwuniciowy „downstream” DNA.

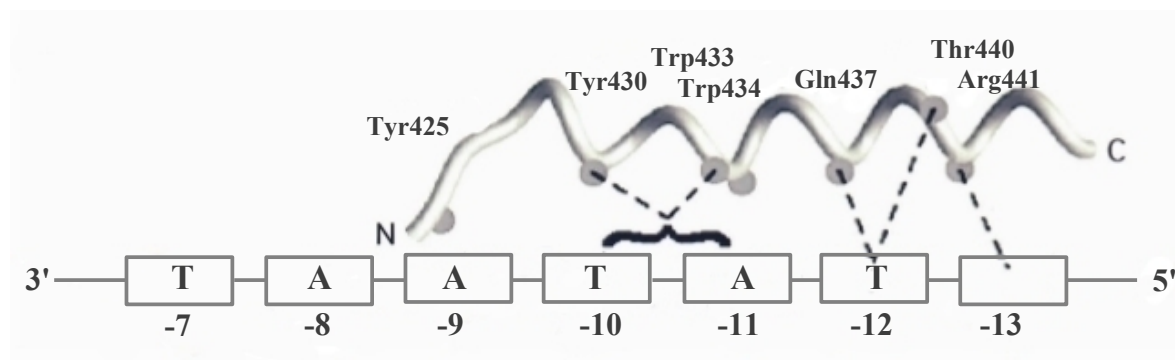
Udział podjednostki sigma w tworzeniu holoenzymu, kompleksu zamkniętego, a następnie w izomeryzacji i powstawaniu RPo wymaga drastycznych zmian konformacji białka. Pomiar odległości między konserwowanymi domenami 2.4 i 4 podjednostki σ wykonane metodą LRET (ang. *luminescence resonance energy transfer*) wskazują, że odległość ta wynosi 35 Å w wolnej podjednostce σ i wzrasta do 50 Å w kompleksie z rdzeniem /192/ W eksperymentach użyto podjednostek σ zawierających unikalne reszty cysteiny w pozycjach 442 i 596 regionów 2 i 4 wiążących donor i akceptor. Świadczy to o zwartej budowie wolnej podjednostki σ utrzymywanej przez oddziaływania domen $\sigma 4$ i $\sigma 1.1$, i rozciągnięciu jej o ok. 43% w kompleksie z rdzeniem. Jest to bezpośredni dowód na duże zmiany strukturalne podjednostki σ w czasie tworzenia holoenzymu.

Domena $\sigma 4$, która ma rozpoznać region -35 promotora, w takiej zwartej konformacji nie może pełnić swojej funkcji. Związanie sigmy z rdzeniem i rozległe kontakty z podjednostkami β i β' stabilizują podjednostkę sigma w optymalnej konformacji do rozpoznawania sekwencji promotorowych. Domeny $\sigma 4$ i $\sigma 2.3-2.4$ muszą rozpoznać heksamery -35 i -10, których względna orientacja w przestrzeni (rzutowana na

powierzchnię walca) wynosi 68° , a odległość zakładając konformację B DNA około 76 \AA /155, 237/. Kluczową rolę w tworzeniu kompleksu otwartego i rozpleczonego DNA w regionie startu transkrypcji pełnią domeny 2.3-2.4 podjednostki sigma, a największą rolę ze strony promotora pełni -11A nici niematrycowej /166/. Komplementarna tymina jest ostatnią zasadą w promotorze λ PR wykazującą w RPo zwiększoną reaktywność w stosunku do KMnO_4 . W przypadku promotora A1 faga T7 również para -12 AT znajduje się w obrębie jednoniciowego DNA /240/. -11A jest najsilniej konserwowaną zasadą, a jej substytucja 2 aminopuryną (2-AP) wywiera najsilniejszy efekt na transkrypcję w porównaniu z substytucją pozostałych zasad tego heksameru. Sugeruje się, że po związaniu regionu -10 przez zasadowe aminokwasy K414 i K418 domeny σ^2 , -11A odgrywa kluczową rolę w inicjowaniu procesu rozplatania DNA. W domenie 2 podjednostki sigma *E. coli* znajduje się szereg silnie konserwowanych aminokwasów aromatycznych: Y421, Y425, F427, T429, Y430, Y425, W433 i W434 /214/.

Wiadomo, że białka wiążące jednoniciowe DNA albo RNA często oddziałują z zasadami nukleotydów kwasów nukleinowych poprzez ułożone w „stos” reszty aromatyczne. Założono więc, że region 2.3 może być bezpośrednio zaangażowany w rozplatanie nici DNA /89/. Wprowadzenie w tym regionie do podjednostki σ^A *Bacillus subtilis* alaniny zamiast konserwowanego aminokwasu wpływało ujemnie na rozplatanie nici promotora /111/. Podobny fenotyp wykazywała σ^E *B. subtilis* z mutacją w analogicznej pozycji /108/.

Struktura krystaliczna o rozdzielczości $2,6 \text{ \AA}$ fragmentu podjednostki σ^{70} opisana przez Malhotrę i wsp. pozwala przypuszczać w jaki sposób region 2.3 może ułatwiać rozplatanie nici DNA w regionie -10 promotora. Struktura krystalograficzna fragmentu podjednostki sigma (aa 114 – 446) pokazuje, że aminokwasy regionów 2.3 i 2.4 tworzą strukturalnie ciągłą spiralę. Spirala regionu 2.3 jest idealnie ułożona względem promotora, a aminokwasy obu regionów uczestniczące w topnieniu DNA znajdują się na tej samej powierzchni spirali (Ryc. 7) /142/.



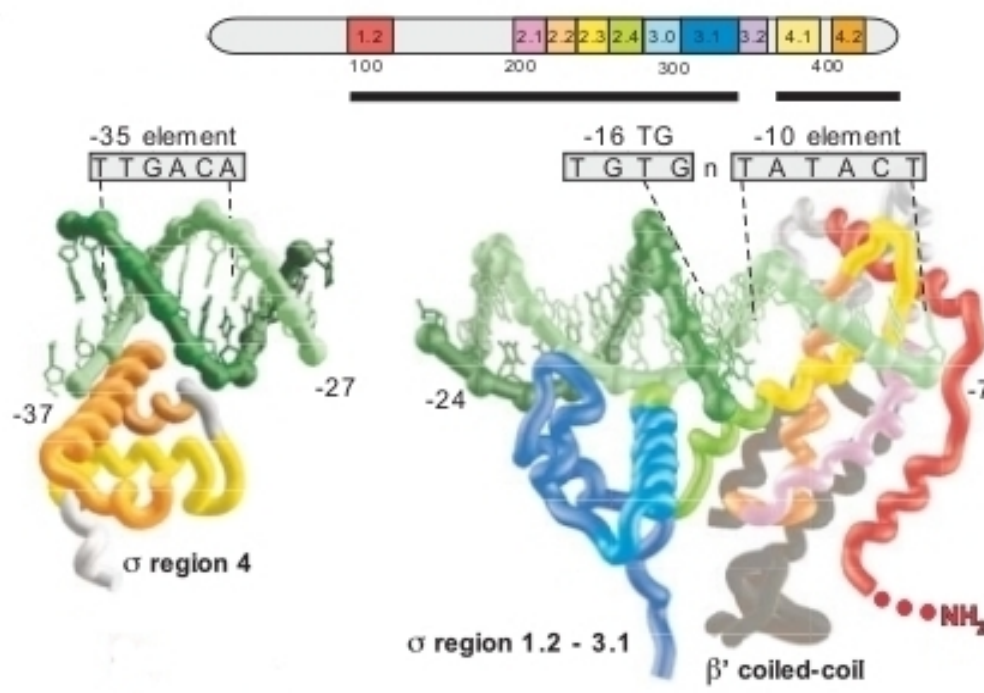
Ryc. 7 Prawdopodobne ułożenie α helisy fragmentu podjednostki sigma σ^{70} z regionami 2.3 i 2.4 względem nici niematrixowej DNA. Zaznaczono atomy węgla w pozycji α reszt aminokwasowych istotnych w rozpoznaniu i topnieniu elementu -10 promotora (region 2.3 – Tyr425, Tyr430, Trp433, Trp434; region 2.4 Gln 437, Thr440, Arg441) /142/.

Należy zatem uznać, że podjednostka sigma jest zdolna do wiązania i otwierania dwuniciowego DNA. Wprawdzie postuluje się, i są na to pewne dowody eksperymentalne, że w otwieraniu DNA ma znaczący wkład proces „oddychania DNA” (ang. *DNA breathing*), jednak wydaje się, że w procesie otwierania DNA bierze aktywny udział polimeraza RNA (podjednostka sigma). Najprawdopodobniej tyrozyna w pozycji 430 jest aminokwasem oddziałującym z -11A nici niematrixowej. Rotacja (ang. *flipping*) adeniny -11 na zewnątrz helisy DNA umożliwia jej oddziaływanie z Y430. Prawdopodobnie również T429 i W433 wnoszą wkład w ten proces. Rozplecenie DNA rozszerza się w kierunku startu transkrypcji, a aromatyczne aminokwasy stabilizują jednoniciowy DNA w regionie otwartej pętli transkrypcyjnej. Za takim mechanizmem otwierania DNA i stabilizacji kompleksu otwartego przemawia fakt słabej reaktywności tymin w pozycjach -10 i -7 (również -4 i -3) otwartego DNA. Jest to najprawdopodobniej wynik oddziaływań tych zasad z aromatycznymi aminokwasami.

W obecności substratów polimeraza DNA przechodzi do produktywnej fazy transkrypcji syntetyzując produkt DNA, najpierw w postaci produktów abortywnych, a następnie finalnego produktu transkrypcji.

W holoenzymie trzy domeny podjednostki σ^A *Thermus aquaticus* (σ^2 : 1.2-2.4, σ^3 : 3.0-3.1 i σ^4 : 4.1) zlokalizowane są na powierzchni enzymu /27/. Podjednostka sigma ma „rozciągniętą” konformację, w której łącznik (*linker*) ($\sigma^{3.2}$ – 33 aa) rozdziela domenę

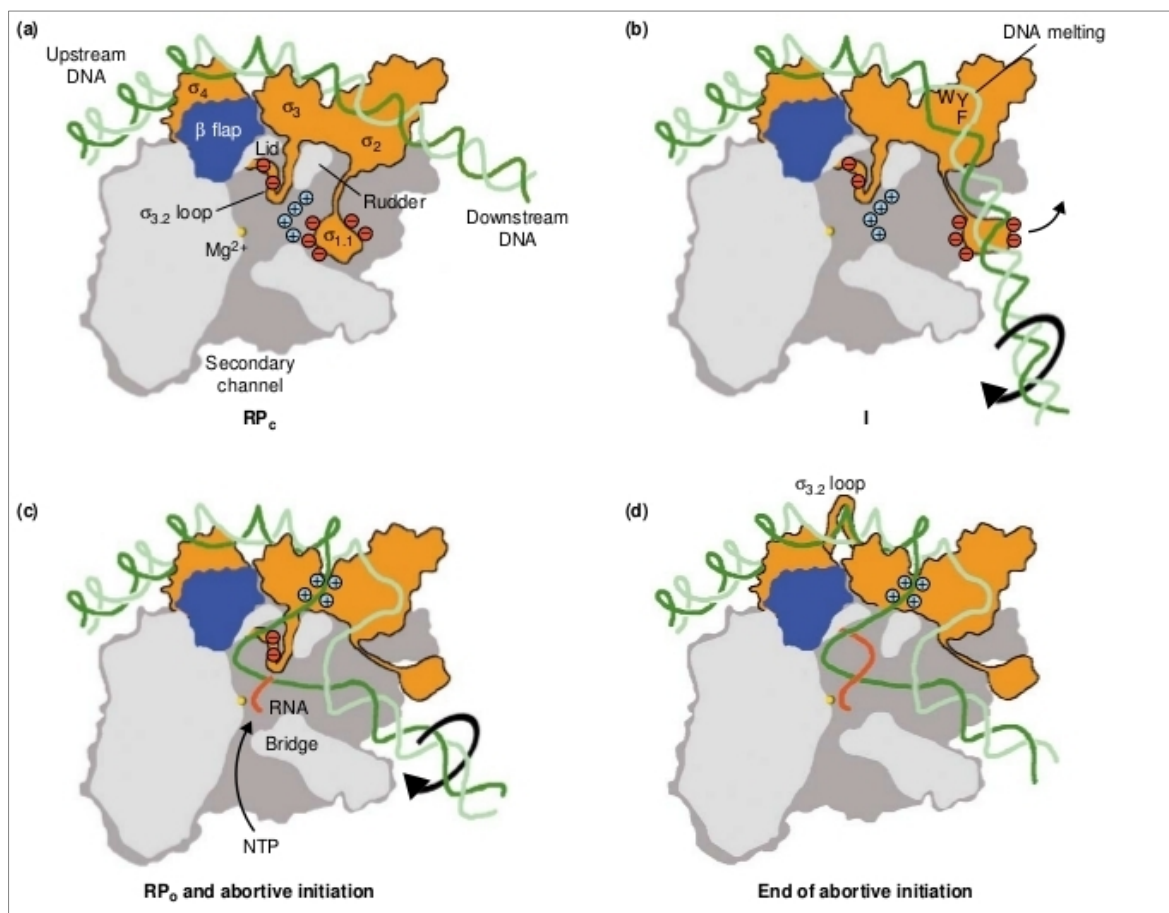
$\sigma 3$ i $\sigma 4$ na odległości 45 Å /156/. Łącznik ten wnika do wnętrza enzymu i przechodzi przez część kanału głównego, a następnie kanał dla produktu (ang. *exit channel*). Taki przebieg łańcucha polipeptydowego narzuca przestrzeń utworzona przez domeny Lid podjednostki β' i wewnętrzną część domeny Flap podjednostki β . Najbardziej do centrum aktywnego zbliża się fragment podjednostki σ (ang. *disordered loop*, aa 337-345), która - jak wynika z analiz kroslinkowania - znajduje się w odległości około 5 Å od reszty fosforanowej w pozycji γ pierwszego nukleotydu tworzącego transkrypt /184/. Położenie domeny $\sigma 4$, gdy łańcuch polipeptydowy wydostaje się na powierzchnię rdzenia stabilizowane jest przez α helisę domeny Flap podjednostki β (aa 764 – 778) /65, 125/. Ekspozowana na powierzchni enzymu domena $\sigma 4$ poprzez motyw HTH (ang. *helix-turn-helix*) wiąże heksamer -35 (Ryc. 8).



Ryc. 8 Schemat oddziaływania podjednostki σ^A *T. aquaticus* z promotorowym DNA. W górnej części rysunku przedstawiono konserwowane regiony podjednostki sigma oznaczone różnymi kolorami (1.2-4.2). Czarna kreska poniżej przedstawia skryzalizowane segmenty podjednostki. Sposób oddziaływania regionu 4, zawierającego motyw HTH, skryzalizowanego z heksamerem -35 promotora (Campell 2001), przedstawiono z lewej części rysunku. Prawa część rysunku przedstawia oddziaływanie regionów 1.2-3.1 podjednostki sigma z heksamerem -10 i segmentem -16 rozszerzonego promotora (*extended promoter*). Pokazano sposób w jaki domena CC β' (kolor szary) oddziałuje i stabilizuje region 2.4 podjednostki sigma (Murakami 2002). Nici niematrycową DNA przedstawiono w kolorze jasnozielonym, matrycową ciemnozielonym. Sekwencje elementów promotora wyodrębniono w szarych prostokątach powyżej nici DNA. Regiony podjednostki sigma przedstawiono tymi samymi kolorami jak w modelu liniowym. /Model sporządzono w oparciu o strukturę krystaliczną kompleksu holoenzym-RF DNA (*fork-junction*) uzyskaną przez Murakamię i wsp. /65/.

Najbardziej strukturalnie stabilną, pozbawioną możliwości przemieszczania się część rdzenia polimerazy tworzą domeny NTD podjednostek α , ω oraz część β i β' . Z kolei cztery inne moduły enzymu wykazują znaczną mobilność. Są to: domena Clamp podjednostki β' i trzy domeny w podjednostce β Lobe, Protrusion oraz domena Flap przykrywająca wyjście kanału dla RNA. Ruchliwe domeny Clamp oraz Lobe i Protrusion mogą wpływać na szerokość kanału głównego. W strukturze holoenzymu jest on o około 10 Å węższy niż w rdzeniu (Ryc 6) /38/.

Domena 1.1 w przypadku podjednostki σ^A *T. aquaticus* zawiera znaczą część (1/3) reszt aminokwasowych obdarzonych ładunkiem ujemnym z obliczonym PI = 3,95. Wewnętrzna część kanału głównego, w przeciwieństwie do powierzchni enzymu, która jest naładowana ujemnie (PI rdzenia równe ~5), obdarzona jest ładunkiem dodatnim. Najprawdopodobniej więc w holoenzymie łańcuch polipeptydowy domeny 1.1 podjednostki σ wnika do kanału głównego (Ryc. 9 a). Wskazują na to wyniki footprintingu białka rodnikami hydroksylowymi oraz analizy FRET, które świadczą o protekcji tej domeny w obrębie holoenzymu i lokalizacji w obrębie kanału zawierającego centrum aktywne /147, 158/. Domena 1.1 zarówno w wolnej podjednostce sigma jak i w kompleksie binarnym, jest dostępna dla rodników hydroksylowych. Umieszczenie DNA w kanale głównym wymaga zatem uprzedniego usunięcia domeny 1.1 podjednostki sigma z kanału (Ryc. 9 b).



Ryc. 9. Zmiany strukturalne kompleksów polimerazy RNA z promotorowym DNA w kolejnych etapach inicjacji transkrypcji. Domeny podjednostki sigma zaznaczono kolorem pomarańczowym, pozostałą część polimerazy z wyjątkiem domeny flap (kolor niebieski) kolorem szarym. Jon Mg^{2+} w centrum aktywnym przedstawiono w postaci żółtego kółka. Nić matrycowa DNA – ciemnozielona, nić niematrixowa – jasnozielona, transkrypt RNA zaznaczono kolorem czerwonym.

a) RP_c – kompleks zamknięty, **b)** kompleks przejściowy (I), **c)** RP_o – kompleks otwarty i inicjacja abortywna, **d)** koniec inicjacji abortywnej. /154/.

Przejście kompleksu inicjacyjnego syntetyzującego abortywne produkty w kompleks elongacyjny wymaga kolejnej istotnej przebudowy struktury polimerazy RNA. Związane jest to z koniecznością usunięcia łącznika 3.2 podjednostki sigma, który ulokowany w kanale dla produktu uniemożliwia syntezę dłuższych RNA (Ryc. 9 c). Najprawdopodobniej ta przestrzenna zawada jest jedną z przyczyn transkrypcji abortywnej. Sugeruje się, że rosnący transkrypt usuwa łącznik 3.2 z kanału dla produktu umożliwiając tym samym syntezę dłuższych produktów transkrypcji, destabilizując kompleks inicjacyjny (osłabienie oddziaływań domen β Flap z σ_4), który ostatecznie pozbawiony podjednostki

sigma przechodzi w kompleks potrójny. Wskazują na to również odpowiednie mutacje Pro329 i Ser331 w regionie 3.2, które osłabiając oddziaływania łącznika z rdzeniem zmniejszają wydajność transkrypcji abortywnej /186/.

2. Cel pracy

Jednym z najważniejszych zagadnień związanych z badaniem procesu transkrypcji jest analiza multidomenowej budowy podjednostki sigma i złożonych funkcji, które pełni w procesie transkrypcji. Funkcje te obejmują:

1. Wiązanie rdzenia i tworzenie holoenzymu.
2. Udział w rozpoznawaniu sekwencji promotorowej.
3. Udział w tworzeniu i stabilizacji kompleksu otwartego
4. Wpływ na wczesną fazę transkrypcji produktywnej,
5. Prawdopodobny wpływ na elongację, pauzowanie a nawet na terminację transkrypcji.

Przy tak licznych zadaniach, które przypisuje się podjednostce sigma oczywiste jest, że wszystkie te funkcje nie mogą być pełnione równocześnie. Muszą być rozdzielone w czasie i przypisane do różnych domen podjednostki sigma. Jednym z kluczowych zagadnień tej pracy jest odpowiedź na pytanie o możliwość uzyskania fragmentów podjednostki sigma, które zawierałyby oddzielne domeny strukturalne i zachowały niektóre z funkcji natywnej podjednostki sigma. W związku z tym celem pracy jest konstrukcja, klonowanie a następnie nadprodukcja w komórkach bakterii i oczyszczenie pięciu fuzyjnych białek zawierających wybrane domeny strukturalne podjednostki sigma. Po drugie funkcjonalna charakterystyka otrzymanych białek tj. ocena efektywności procesu renaturacji, zdolności wiązania promotorowego DNA i tworzenia kompleksów transkrypcyjnych. Fragmenty podjednostki sigma jako białka fuzyjne z GST analizowane wcześniej przez Dombroski i wsp. /45, 46, 47, 49/ były badane wyłącznie pod kątem ich zdolności do wiązania promotorowego DNA. Nie udało się wówczas stwierdzić czy fragmenty te zdolne są do wiązania z rdzeniem i tworzenia kompleksów transkrypcyjnych. Severinowa i wsp. analizowali zdolność fragmentu σ^{70}_2 podjednostki sigma w strukturze holoenzymu do wiązania oligonukleotydu, jednak również w tym przypadku nie udało się wykazać wiązania promotorowego DNA, inicjacji transkrypcji i syntezy produktu RNA

/191/. W pracy oceniona więc zostanie również zdolność otrzymanych fragmentów podjednostki sigma do tworzenia z rdzeniem polimerazy RNA holoenzymu, rozpoznawania przez holoenzym promotorowego DNA i transformacji kompleksów binarnych w aktywne transkrypcyjnie kompleksy potrójne syntetyzujące RNA.

3. Materiały

3.1 Szczep bakteryjny:

BL21(DE3)*Escherichia coli* [*hsdS gal(λcIts857 ind1Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*]
(Novagen)

3.2 Plazmidy:

pET16b – 5711 pz [Ap^R , ori pBR322, T7 promotor i terminator, T7 start transkrypcji, sekwencja kodująca His-Tag, *lacI*, MCS NdeI - BamH I (Novagen)

pHTT7f1- σ [Ap^R ; ori-pBR322; ori-f1; Φ 10P-*rpoD*] (dzięki uprzejmości H. H. Ebrighta)

3.3 Pożywki:

3.3.1 LB:

Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g
woda	do 1000 ml

3.3.2 LA:

Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g
agar	15 g
woda	do 1000 ml

Przygotowane pożywki sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem 1 atm. w temperaturze 121°C przez 20 min. Dla obu pożywek pH = 7,4.

3.4 Bufory stosowane do enzymów

- 3.4.1** 10 x stężony bufor do Taq polimerazy DNA (MBI Fermentas)
- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0 w 25 °C)
 - 500 mM KCl
 - 0,8% Nonidet P40
- 3.4.2** 5 x stężony bufor do enzymu restrykcyjnego *NdeI* – D (MBI Fermentas)
- 10 mM Tris-HCl pH 7,5
 - 100 mM NaCl
 - 10 mM MgCl₂
 - 0,1 mg/ml BSA
- 3.4.3** 10 x stężony bufor do kinazy polinukleotydowej (MBI Fermentas)
- 700 mM Tris-HCl pH 7,6
 - 100 mM MgCl₂
 - 50 mM DTT
- 3.4.4** 10 x stężony bufor do alkalicznej fosfatazy (MBI Fermentas)
- 100 mM Tris-HCl pH 7,5
 - 100 mM MgCl₂
- 3.4.5** 10 x stężony bufor do ligazy DNA bakteriofaga T4 (MBI Fermentas)
- 400 mM Tris-HCl pH 7,8
 - 100 mM MgCl₂
 - 100 mM DTT
 - 5 mM ATP

3.5 Enzymy

- 3.5.1 *Bam*HI, 10 u/μl (MBI Fermentas)
- 3.5.2 *Nde*I, 10 u/μl (MBI Fermentas)
- 3.5.3 Fosfataza alkaliczna (CIP), 1 u/μl (MBI Fermentas)
- 3.5.4 Kinaza polinukleotydowa, 10 u/μl (MBI Fermentas)
- 3.5.5 Ligaza DNA faga T4, 1 u/μl (MBI Fermentas)
- 3.5.6 Lizozym w 10 mM Tris – HCl, pH 8,0 (10 mg/ml) (Sigma)
- 3.5.7 Polimeraza RNA 1 u/μl (0,5 μg/μl) (EPICENTRE Biotechnologies)
- 3.5.8 Rdzeń polimerazy RNA 1 u/μl (0,7 μg/μl) (EPICENTRE Biotechnologies)
- 3.5.9 RNaza, 1000 u/μl (MBI Fermentas)
- 3.5.10 Taq polimeraza DNA do reakcji PCR, 1 u/ μl (MBI Fermentas)

3.6 Startery

Wykorzystano startery zamówione o wyjściowym stężeniu 10 μM zamówione w Thermo Hybaid GmbH,

- 3.6.1 **FR3L** 5'- CGG TCG GCA TAT GAT TGA GAC CAT CAA CAA G – 3'
- 3.6.2 **FR4L** 5'- CAT CCG TCA TAT GGC CAA AGA GCC AAT CTC CAT- 3'

- 3.6.3 **FR5L** 5' - AAA GTT CTC CAT ATG CTG GAT TCT GCG ACC AC - 3'
- 3.6.4 **SIGMA L** 5' -TAT CGA GGT CAT ATG GAG CAA AAC CCG CAG T - 3'
- 3.6.5 **SIGMA P** 5'-AGC CGG ATC CTC TTA ATC GTC CAG GAA GCT ACG-3'
- 3.6.6 **SPL 1** 5'-GGT CGT CAT ATG GGC ACC GTT GAA-5'
- 3.6.7 **SPP 3** 5' - GGT CTC AAT CAT ATG CAC CGG – 3'
- 3.6.8 **T7L** 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
- 3.6.9 **T7P** 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
- 3.6.10 **PLA1** 5'-GGA TCC TCG AGA TCC CGA AAA TTT ATC AAA-3'
- 3.6.11 **PPA1** 5'-GGA TCC TCG AGC TCC AGA TCC CGG ACC C-3'
- 3.6.12 **TBL** 5'-GCG GAG ATC TGC CAT CGA GAG GGA C-3'

3.7 **Oligo1**

Wykorzystano oligonukleotyd o stężeniu 10 µM zamówiony w Thermo Hybaid GmbH,

5'-ATTGGGTATAATTGACTCA-3'

3.8 **Nukleotydy**

dNTP set 100 mM (MBI Fermentas)

3.9 Roztwory do lizy alkalicznej

3.9.1 Roztwór I (GET):

50 mM glukoza
10 mM EDTA
15 mM Tris-HCl pH 8.0

3.9.2 Roztwór II – mieszanina lizująca (przygotowana tuż przed użyciem)

1 M NaOH	1,2 ml
10% SDS	0,6 ml
woda redestylowana	4,2 ml
	na 24 próbki

3.9.3 Roztwór III – Octan potasu w lodowatym kwasie octowym.

5 M octan potasu	10 ml
lodowaty kwas octowy	1,9 ml
woda redestylowana	4,75 ml

3.9.4 Fenol – równoważony 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA (Sigma)

3.9.5 Roztwór chloroform – alkohol izoamylowy (24:1)

3.10 Roztwory wykorzystane do wytrącania DNA

3.10.1 3 M octan sodu, pH 5,2

3.10.2 3 M octan amonu

3.10.3 70% alkohol etylowy

3.10.4 96% alkohol etylowy

3.11 Roztwór wykorzystywany do przygotowania komórek kompetentnych

100 mM CaCl₂

CaCl₂ 1,47 g

woda redestylowana do 100 ml

3.12 Roztwory wykorzystywane do indukcji, izolacji i oczyszczania fragmentów σ^{70}

3.12.1 Roztwory IPTG

3.12.1.1 0,5 mM IPTG

1,26 g/ 5000 ml hodowli bakteryjnej

3.12.1.2 1 mM IPTG

3,26 g/ 5000 ml hodowli bakteryjnej

3.12.2 0,5 M roztwór PMSF

PMSF 0,87 g

70 % etanol do 10 ml

3.12.3 50 mM roztwór NiSO₄

NiSO₄ 1,4 g

woda redestylowana do 100 ml

3.12.4 Bufory wykorzystywane do oczyszczania białek w warunkach natywnych

3.12.4.1 Bufor lizujący – wiążący (pH 8,0)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,9 g
300 mM NaCl	17,54 g
10 mM imidazol	0,68 g
woda redestylowana	do 1000 ml

3.12.4.2 Bufor wypłukujący białka niespecyficznie związane ze złożem (pH 8)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,9 g
300 mM NaCl	17,54 g
20 mM imidazol	0,68 g
woda redestylowana	do 1000 ml

3.12.4.3 Bufor elucyjny (pH 8)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,9 g
300 mM NaCl	17,54 g
250 mM imidazol	0,68 g
woda redestylowana	do 1000 ml

3.12.5 Bufory wykorzystywane do oczyszczania białek w warunkach denaturujących

3.12.5.1 Bufor lizujący, pH 8

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,9 g
10 mM Tris – HCl	1,2 g
8 M mocznik	480,5 g
woda redestylowana	do 1000 ml

3.12.5.2 Bufor wypłukujący białka niespecyficznie związane ze złożem, pH 6,8

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,9 g
10 mM Tris – HCl	1,2 g
8 M mocznik	480,5 g
woda redestylowana	1000 ml

3.12.5.3 Bufor elucyjny I, pH 5,9

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,9 g
10 mM Tris – HCl	1,2 g
8 M mocznik	480,5 g
woda redestylowana	do 1000 ml

3.12.5.4 Bufor elucyjny II, pH 4,5

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,9 g
10 mM Tris – HCl	1,2 g
8 M mocznik	480,5 g
woda redestylowana	do 1000 ml

3.12.6 Bufory wykorzystywane do renaturacji białek w procesie dializy

3.12.6.1 Bufor do dializy I

50 mM Tris -HCl	50 ml
500 mM NaCl	29,22 g
10 mM MgCl ₂	2,05 g
1 mM EDTA	2 ml 0,5 M
20 % glicerol	200 ml
5 mM β-merkaptetanol	349 μl
woda redestylowana	do 1000 ml

3.12.6.2 Bufor do dializy II

50 mM Tris -Hcl	50 ml
300 mM NaCl	17,54 g
10 mM MgCl ₂	2,05 g
0,1 mM EDTA	0,2 ml 0,5 M
20 % glicerol	200 ml
5 mM β-merkaptetanol	349 μl
woda redestylowana	do 1000 ml

3.13 Roztwory i materiały do ilościowego oznaczania stężenia białka (mikrometoda)**3.13.1** Nitroceluloza CA 250/0 (Selection/Niemcy)**3.13.2** Roztwór czerni amidowej

czerni amidowa	0,25 g
metanol	45 ml
kwasy octowe	10 ml
woda	45 ml

3.13.3 Roztwór odbarwiacza

metanol	225 ml
kwasy octowe	50 ml
woda	225 ml

3.13.4 Roztwór do elucji barwnika z membrany

kwasy mrówkowe	80 ml
kwasy octowe	10 ml

100 % TCA	1 ml
-----------	------

3.14 Izotopy do znakowania DNA

5 mCi roztwór [γ - ^{32}P] ATP, (74 Mbq) (aktywność właściwa 7000 Ci/mmol)

500 μCi roztwór [α - ^{32}P] GTP, (18,5 Mbq)

3.15 Bufory do tworzenia kompleksów białko - DNA

3.15.1 Bufor do kompleksów (10 x stężony):

80 mM Tris – HCl pH 7,9

500 mM NaCl

10 mM β – merkaptoetanol (2-merkaptoetanol)

3.15.2 Bufor TE

1 M Tris-HCl, pH 7,9	10 ml
----------------------	-------

0,5 M EDTA, pH 8	0,4 ml
------------------	--------

woda redestylowana	do 1000 ml
--------------------	------------

3.16 Mieszanina do transkrypcji *in vitro*

0,4 mM ApUpC	2 μl
--------------	-----------------

5 mM ATP	1 μl
----------	-----------------

5 mM GTP	1 μl
----------	-----------------

150 mM MgCl_2	1 μl
------------------------	-----------------

W doświadczeniach w których stosowano radioaktywne substraty, znakowano ApUpC przy użyciu [γ - ^{32}P] ATP bądź też używano radioaktywnego GTP ([α - ^{32}P] GTP) [Materiały 3.14].

3.17 Roztwory do autoradiografii

3.17.1 Roztwór do wywoływania klisz rentgenowskich

Część A – 995 g	Część B – 148 g
węglan sodu	hydrochinon
siarczyn sodu	1-fenylopirazolidyn-3-on
Po zmieszaniu części A i B dopełnić wodą do 9 L	

3.17.2 Roztwór utrwalający do klisz rentgenowskich

Część A

tiosiarczan sodu krystaliczny 2160 g

Część B

chlerek amonu 270 g

Część C

pirosiarczyn sodu 180 g

Po zmieszaniu części A, B i C dopełnić wodą do 9 L

3.18 Elektroforeza agarozowa DNA

W pracy wykorzystywano żele agarozowe 1% i 1,5% w zależności od masy cząsteczkowej rozdzielanych fragmentów.

	Agaroza	Woda
1%	250 mg	22,25 ml
1,5%	375 mg	33,38 ml

Następnie roztwory ogrzewano, aż do rozpuszczenia się agarozy, dodawano 2.5 ml buforu TBE (1x stęż.) [Materiały 3.18.1] i wlewano do poziomego aparatu do elektroforezy. Przed zestalaniem w żelu umieszczano pionowo grzebień w celu uformowania studzienek.

3.18.1 Bufor TBE 5 x stężony

Tris	54 g
Kwas borowy	27,5 g
0,5 M EDTA pH 8	1 ml
stężony HCl	do pH 8,3
woda redestylowana	do 1000 ml

3.18.2 6 x stężony roztwór barwników do elektroforezy

0,09% błękit bromofenolowy
0.09% cyjan ksylenu
60% glicerol
60 mM EDTA

3.18.3 Roztwór bromku etydyny o stężeniu 5 mg/ml

3.19 Elektroforeza poliakrylamidowa

3.19.1 Roztwory i bufor

3.19.1.1 Roztwór akrylamidów (30/0.8%)

Bisakrylamid	0,8
Akrylamid	30 g
woda	do 1000 ml

3.19.1.2 Bufor do żelu rozdzielającego (dolnego) 1.5 M Tris-HCl /0.4% SDS
pH 8.8

Tris	60,59 g
SDS	2 g
woda	do 500 ml

3.19.1.3 Bufor do żelu zatężającego (górnego) 0.5 M Tris-HCl/0.4% SDS pH 6.8

Tris	20,19 g
SDS	2 g
woda	do 500 ml

3.19.1.4 10 x stężony bufor do elektroforezy białek w warunkach denaturujących
(zawiera SDS;)

Tris	30,2 g
Glicyna	142,2 g
SDS	10 g
woda	do 1000 ml

3.19.1.5 Bufor lizujący (obciążający)

1M Tris HCl, pH 6,8	12,5 ml
SDS	5 g
2-merkaptoetanol	10 ml
błękit bromofenolowy	10 mg
glicerol	20 ml

3.19.1.6 Roztwory do barwienia żeli poliakrylamidowych

3.19.1.6.1 Barwienie azotanem srebra

3.19.1.6.1.1 Roztwór azotanu srebra

Azotan srebra	0.8 g
Woda amoniakalna	1.4 ml
Wodorotlenek sodu	75.5 mg
Woda	do 100 ml

3.19.1.6.1.2 Roztwór wywołujący

1% kwas cytrynowy	0,5 ml
37% formaldehyd	50 µl
woda	do 100 ml

3.19.1.6.1.3 Roztwór przerywający

10% kwas octowy	50 ml
45% metanol	50 ml

3.19.1.6.2 Barwienie Coomase Brillant Blue G

3.19.1.6.2.1 Wyjściowy roztwór do barwienia 2 x stężony

Coomase Brillant Blue	2,8 g
metanol	500 ml
woda	500 ml

3.19.1.6.2.2 Roztwór do barwienia 1 x, gotowy do użycia

roztwór stężony barwnika	75 ml
kwas octowy	30 ml

woda 45 ml

3.19.1.6.2.3 Roztwór odbarwiacza

kwas octowy 100 ml
metanol 200 ml
woda 800 ml

3.19.2 Żel poliakrylamidowy do elektroforezy w warunkach niedenaturujących

W pracy wykorzystywano żele poliakrylamidowe 3,5 i 5%, przygotowywane według schematu

Skład:	3,50%	5,00%
30% roztwór akrylamidów	2.32 ml	3.32 ml
Bufor TBE, 10 x stęż.	2 ml	2 ml
woda	15.46 ml	14.46 ml
10% nadsiarczan amonu	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Po dokładnym wymieszaniu składników roztworu mieszaninę wlewano pomiędzy wcześniej przygotowane (dokładnie umyte, odtłuszczone i uszczelnione) płytki szklane. Między płytkami w górnej części żelu zanurzano grzebień w celu uformowania studzienek i pozostawiano do momentu spolimeryzowania żelu (około 20-30 minut).

3.19.3 Żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących

Żele denaturujące przygotowywano według schematu:

Dla żelu rozdzielającego (dolnego):

<i>Składniki żelu</i>	15,00%	12,50%
1.5 M Tris pH 8.8	2 ml	2 ml
0.4% SDS		
Roztwór akrylamidów (30%/0.8%)	3.96ml	3.3 ml
woda	2.1 ml	2.7 ml
10% nadsiarczan amonu	40 μ l	40 μ l
TEMED	8 μ l	8 μ l

Dla żelu zatażającego (górnego):

<i>Składniki żelu:</i>	4,5 %
0.5 M Tris pH 6.8	0.8 ml
0.4% SDS	
Roztwór akrylamidów (30%/0.8%)	0.5 ml
woda	2.1 ml
10% nadsiarczan amonu	30 μ l
TEMED	6 μ l

Wymieszane składniki żelu dolnego wlewano pomiędzy wcześniej przygotowane szklane płytki (umyte, odtłuszczone i dobrze uszczelnione), na powierzchnię żelu wprowadzono 0,1 ml wody redestylowanej i pozostawiano do momentu spolimeryzowania. Następnie usuwano wodę, wlewano żel górny, między płytkami w górnej części żelu zanurzano grzebień w celu uformowania studzienek i pozostawiono do czasu spolimeryzowania żelu górnego.

3.20 Złoże chromatograficzne agarozą Ni NTA (QIAGEN)

Złoże agarozowe (Sepharose® CL-6B) zawierające jako grupy chelatujące jony metalu reszty kwasu nitrylotrioctowego. NTA posiada cztery miejsca koordynacyjne chelatujące jony metalu (Ni^{2+}). Związany przez złoże jon metalu zachowuje jeszcze dwa miejsca koordynacyjne dla związania oczyszczanego białka. Służy do oczyszczania białek fuzyjnych typu His-Tag. Złoże wiąże 5 – 10 mg białka na ml złoża.

3.21 Odczynniki

Odczynniki	Nazwa Firmowa	Firma
Agar	Agar – Agar	Merck
Agarozą	Agarose	Sigma
Akrylamid	Acrylamide	Sigma
Ampicylina	Ampicilinum	Polfa Tarchomin PL
Azotan srebra	Azotan srebra	POCh Gliwice
Bisakrylamid	N,N'-methylene-bis-acrylamide	Sigma
Błękit kumasyny G	Coomasse Brilat Blue G	Sigma
Chlorek magnezu	Magnesium chloride	Sigma
Chlorek potasu	Potassium chloride	Sigma
Chlorek sodu	Sodium chloride	ICN
Chlorek wapnia	Calcium chloride	Sigma
Chloroform	Chloroform	POCh Gliwice
Czerń amidowa	Czerń amidowa	
EDTA	EDTA	Sigma
Ekstrakt drożdżowy	Yeast Extract	Gibco BRL
Fenol	Phenol	Sigma
Formaldehyd	Formaldehyd	POCh Gliwice
Glicerol	Glicerol 87%	Sigma
Glicyna	Aminoacetic acid	Sigma
Heparyna	Heparin	Sigma
Imidazol	Imidazole	Sigma

Kwas borowy	Boric acid	Sigma
Kwas cytrynowy	Citric acid	Sigma
Kwas octowy	Kwas octowy 80%	POCh Gliwice
Kwas mrówkowy	Kwas mrówkowy	POCh Gliwice
Kwas solny	Kwas solny	POCh Gliwice
TCA	Kwas trójchlorooctowy	POCh Gliwice
Lizozym	Lysozyme	Sigma
Markery masowe DNA 100 pz	GeneRuler™100pz DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
Markery masowe DNA 1000 pz	GeneRuler™1kp DNA Ladder	MBI Fermentas
Markery masowe DNA Mix	GeneRuler™DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
Markery masowe pUC	pUC Mix Marker 8	MBI Fermentas
Markery masowe białka	PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
Metanol	Metanol	PoCh Gliwice
Mocznik	Urea	Sigma
Nadsiarczan amonu	Ammonium persulfate	Sigma
Octan amonu	Ammonium acetate	Sigma
Octan potasu	Potassium acetate	Sigma
Octan sodu	Sodium acetate	Sigma
PMSF	PMSF	Sigma
Roztwór obciążający	6 x Loading Dye Solution	MBI Fermentas
SDS	Sodium Dododecyl Sulfate	Sigma
Siarczan niklu	Nickel sulfate	Sigma
TEMED	TEMED	Sigma
Tris	TRIS	Sigma
Triton-X100	TRITON-X100	Sigma
Woda amoniakalna	Woda amoniakalna	POCh Gliwice
Wodorotlenek sodu	Wodorotlenek sodu	POCh Gliwice
β-merkaptoetanol	2-Mercapto-Ethanol	Sigma

3.22 Aparatura

Poziomy aparat do elektroforezy agarozowej	Kucharczyk T.E.
Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej	Kucharczyk T.E.
Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej	Pharmacia Biotech, USA
Mieszadło laboratoryjne typ MM5	Polamed, Polska
pH-metr uniwersalny Φ 45	Beckman, USA
Homogenizator ultradźwiękowy Sonoplus HD2070	Fisher Scientific
Spektrofotometr typ DU62	Beckman, USA
Termocykler Hot Shot 18	DNA Gdańsk
Transiluminator UV typ UV 943A	J.W.Electronic, Warszawa
Waga laboratoryjna typ WPS180	Radwag, Polska
Wirówki:	
• Microfuge E™	Beckman, USA
• L7-55 Ultracentrifuge	Beckman, USA
• typ mlw K23	Zentrifugenbau, Engelsdorf
• typ mlw 70D	Zentrifugenbau, Engelsdorf
Zasilacze do elektroforezy:	
• StabNap 200	Kucharczyk T.E.
• StabNap 300	Kucharczyk T.E.
• PS 3002	APELEX, Francja

4. Metody

4.1 Otrzymanie fragmentów DNA metodą PCR

W celu przeprowadzenia reakcji PCR do probówki reakcyjnej dodawano niżej podane odczynniki według wymienionej kolejności. Zawartość probówki dokładnie mieszano poprzez kilkakrotne pipetowanie oraz delikatne zwirowanie. Do reakcji amplifikacji wykorzystywano termocykler Hot Shot 18, firmy DNA Gdańsk.

Składniki:	Ilość:
woda dejonizowana jałowa	39.7 μ l
10 x stęż. bufor do PCR	5 μ l
10 mM dNTP _s	1 μ l
10 μ M starter 1	1 μ l
10 μ M starter 2	1 μ l
matryca DNA (10 ng)	1 μ l
Taq polimeraza DNA, 1 u/ μ l	1.3 μ l
	suma 50 μ l

Dla wszystkich fragmentów DNA stosowano jeden profil temperaturowy.

1. 95°C, 60s	
2. 95°C, 60s	} 35 cykli
50°C, 30s	
72°C, 60s	
3. 72°C, 200s	
2. 4°C	

4.2 Izolacja plazmidu metodą lizy alkalicznej

Pożywkę płynną LB [Materiały 3.3.1] o objętości 25 ml z dodatkiem ampicyliny (100 $\mu\text{g/ml}$) zaszczipiano pojedynczą kolonią bakteryjną. Bakterie inkubowano z wytrząsaniem przez noc w temperaturze 37°C. Do probówki reakcyjnej Eppendorfa wprowadzano 1,5 ml hodowli i wirowano przez 5 minut (15000 obr./min., 15850 x g), a supernatant odrzucano. Czynność tę powtarzano trzykrotnie, w sumie zwirowywano 4,5 ml hodowli bakteryjnej. Do uzyskanego osadu bakteryjnego dodawano 100 μl buforu GET [Materiały 3.9.1] oraz 10 μl lizozymu (10 mg/ml) i intensywnie mieszano do całkowitego zawieszenia osadu. Probówkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Do probówki następnie dodawano 200 μl świeżo przygotowanego roztworu II [Materiały 3.9.2], mieszano delikatnie poprzez kilkakrotne obracanie probówki i inkubowano w lodzie przez 5 minut. Po inkubacji dodawano 150 μl zimnego roztworu III [Materiały 3.9.3]. Próbkę intensywnie wytrząsano przez 30 sekund i wirowano przez 15 minut (15000 obr./min. - 15850 x g). Supernatant przenoszono do świeżej probówki reakcyjnej, dodawano 200 μl fenolu [Materiały 3.9.4] oraz 200 μl mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy [Materiały 3.9.5] i intensywnie mieszano przez 30 sekund. Po odwirowaniu, około 400 μl górnej fazy przenoszono do nowej probówki i dodawano 1 ml 96% etanolu [Materiały 3.10.4]. Zawartość mieszano poprzez kilkakrotne odwracanie probówki. Próbkę inkubowano w lodzie przez około 30 minut. Następnie odwirowywano przez 15 minut (15000 obr./min., 15850 x g), a powstały supernatant odrzucano. Uzyskany osad dwukrotnie przepłukiwano 1 ml 70% etanolu, za każdym razem odwirowując przez 30 sekund (15000 obr./min., 15850 x g). Przemyty osad suszono przez 10 min. pod próżnią uzyskaną za pomocą próżniowej pompy rotacyjnej. Tak uzyskiwany osad DNA przechowywano w temperaturze -20°C. Do dalszych badań osad DNA rozpuszczano w 30 μl jałowej, dejonizowanej wody, a następnie w celu pozbycia się RNA, które mogłoby przeszkadzać w enzymatycznych reakcjach z DNA, dodawano 1 μl RNazy (10 u/ μl) i inkubowano w 37°C przez 30 min.

4.3 Oczyszczanie i wytrącanie DNA

W celu usunięcia białka z roztworu DNA po reakcjach enzymatycznych (PCR, defosforylacja, cięcie enzymami restrykcyjnymi) dodawano mieszaninę fenolu i chloroformu w stosunku 1:1, w objętości równej połowie wyjściowej objętości roztworu DNA. Próbkę energicznie mieszano i pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie próbkę wirowano przez 2 minuty (15000 obr./min., 15850 x g). Górną fazę zawierającą DNA ostrożnie pobierano i przenoszono do nowej probówki Eppendorfa. Do roztworu DNA dodawano 2 objętości 96% etanolu (-20°C) oraz 0,1 objętości zimnego 3 M octanu sodu. Mieszaninę inkubowano w temperaturze -20°C przez 30 minut (w przypadku niskiego stężenia DNA inkubację przedłużano na całą noc) a następnie próbkę wirowano przez 15 minut (15000 obr./min., 15850 x g). Supernatant odrzucano, a osad przemywano dwukrotnie 1 ml 70% etanolu w celu usunięcia nadmiaru soli. Otrzymany osad DNA suszono pod próżnią przez 10 minut, a następnie rozpuszczano w 30 µl jałowej, dejonizowanej wody.

4.4 Cięcie plazmidowego DNA oraz fragmentów DNA otrzymanych w reakcji PCR enzymami restrykcyjnymi

Do 10 µl roztworu DNA dodawano 3 µl buforu D [Materiały 3.4.2], 16 µl wody dejonizowanej oraz 1 µl enzymu restrykcyjnego *NdeI* i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C. W procedurze klonowania białek FR1 i FR2 używano tylko jednego enzymu. Przy klonowaniu białek FR3, FR4 i FR5 korzystano z dwóch enzymów. Po zastosowaniu *NdeI* dodawano 1 µl enzymu *BamHI* i inkubowano w temp. 37°C przez 4 godziny. Gdy plazmid był izolowany metodą lizy alkalicznej, przed zastosowaniem enzymów restrykcyjnych z próbki DNA usuwano RNA za pomocą RNazy. Wydajność cięcia plazmidu sprawdzano za pomocą elektroforezy w żelach agarozowych [Metody 4.10].

4.5 Defosforylacja plazmidowego DNA

Plazmid pET16b izolowano z komórek za pomocą lizy alkalicznej. Trawiono jednym lub dwoma enzymami restrykcyjnymi, oczyszczano metodą fenol/chloroform oraz wytrącano etanolem. Wysuszony pod próżnią osad rozpuszczano w wodzie dejonizowanej. W celu przeprowadzenia defosforylacji do 90 μ l roztworu plazmidowego DNA dodawano 10 μ l 10x stężonego buforu do defosforylacji [Materiały 3.4.4], 1 μ l alkalicznej fosfatazy (1u/ μ l) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min. Po inkubacji, w celu inaktywacji enzymu, mieszaninę ogrzewano przez 10 min. w 75°C, a następnie ponownie oczyszczano przy użyciu mieszaniny fenol/chloroform i wytrącano alkoholem.

4.6 Ligacja

Pocięte enzymami restrykcyjnymi i oczyszczone fragmenty DNA (produkty PCR i plazmid) mieszano w odpowiednich proporcjach i poddawano reakcji ligacji w celu uzyskania zrekombinowanych plazmidów. Stężenia fragmentów DNA i wektora w mieszaninie ligacyjnej ustalano w oparciu o analizę ilościową DNA za pomocą elektroforezy agarozowej.

Mieszanina ligacyjna:	Ilość:
fragment DNA	7 μ l
wektor	1 μ l
ligaza faga T4	1 μ l (10 u/ μ l)
bufor	0,5 μ l
dejonizowana woda	0,5 μ l

W przypadku ligacji fragmentów DNA kodujących białka FR1 i FR2, przed dodaniem ligazy mieszaninę inkubowano w temperaturze 45°C przez 10 minut. Reakcję ligacji prowadzono przez 10 godzin w 16°C, a następnie w celu inaktywacji ligazy próbkę ogrzewano w temperaturze 65°C przez 10 minut.

4.7 Przygotowanie komórek kompetentnych

Pożywkę LB [Materiały 3.3.1] o objętości 50 ml zakażono pojedynczą kolonią szczepu *E. coli* BL21 i inkubowano przez noc w wytrząsarce w temp. 37°C. Hodowlę nocną odmładzano poprzez przeniesienie 5 ml hodowli nocnej do świeżej pożywki i hodowano do $OD_{600} \approx 0,3$. Hodowlę oziębiano przez 10 minut w łaźni lodowej, a następnie wirowano przez 10 minut w jałowych probówkach (4000 obr./min., 4°C, MLW K23). Osad zawieszano w 10 ml jałowego, zimnego 100 mM $CaCl_2$, inkubowano w łaźni lodowej przez 10 minut, ponownie wirowano, a następnie zawieszano w 2 ml zimnego 100 mM $CaCl_2$ i rozporcjowywano po 200 μ l do probówek Eppendorfa.

4.8 Transformacja

Do zawiesiny 200 μ l świeżo przygotowanych komórek kompetentnych [Metody 4.7] dodawano 10 μ l mieszaniny ligacyjnej i delikatnie mieszano. Próbkę inkubowano kolejno: przez 30 min. w łaźni lodowej, następnie przez 3 minuty w łaźni wodnej w temperaturze 43°C i przez 2 minuty w lodzie. Dodawano 800 μ l pożywki LB i hodowano w 37°C przez 60 minut. Transformowane komórki wysiewano na płytki z pożywką stałą LA [Materiały 3.3.2] z dodatkiem ampicyliny (100 μ g/ml). Jako kontrolę ujemną i dodatnią wysiano odpowiednio komórki kompetentne na płytki z ampicyliną i bez ampicyliny. Płytki inkubowano przez noc w cieplarni w temperaturze 37°C.

4.9 Analiza otrzymanych transformantów

Pojedyncze kolonie transformantów sprawdzano na obecność zrekombinowanego plazmidu. W tym celu plazmidy izolowano za pomocą lizy alkalicznej. Obecność klonowanych fragmentów DNA stwierdzano za pomocą reakcji PCR przy użyciu odpowiednich starterów [Materiały 3.6] lub analizy restrykcyjnej. Uzyskane produkty reakcji analizowano w żelu agarozowym.

4.10 Elektroforeza w żelu agarozowym

Próbki DNA mieszano z buforem obciążającym [Materiały 3.18.2] w stosunku 6:1 i nanoszono do studzienek w żelu. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 95 V. Żele barwiono roztworem bromku etydyny [Materiały 3.18.3] przez 20 minut. Analizę wyników powadzono w świetle UV o długości fali $\lambda = 312$ nm.

4.11 Elektroforeza w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym

Próbki na żel przygotowywano jak punkcie 4.10. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 1x stężonym buforze TBE [Materiały 3.18.1], pod napięciem 120 V, przez około 60-70 minut. Prażki DNA uwidaczniiano jak w punkcie 4.10.

4.12 Hodowla bakterii *E. coli* BL 21 (DE3) i nadprodukcja fragmentów podjednostki σ^{70}

Pożywkę LB o objętości 250 ml z dodatkiem ampicyliny (stężenie 100 $\mu\text{g/ml}$) [Materiały 3.3.1] zaszczipiano pojedynczą kolonią szczepu bakterii *Escherichia coli* BL21 [Materiały 3.1] zawierającego zrekombinowany plazmid [Materiały 3.2], kodujący zmodyfikowaną podjednostkę σ^{70} . Hodowle inkubowano całą noc w temperaturze 37°C. Całą hodowlę nocną następnie wprowadzano do 5 l świeżej pożywki LB z ampicyliną (100 $\mu\text{g/ml}$) i hodowano, silnie napowietrzając w 37°C, do momentu osiągnięcia przez hodowlę gęstości optycznej (OD 600) około 0.5 – 0.7. Przy tej wartości OD przeprowadzono indukcję za pomocą 0.5-1 mM IPTG [Materiały 3.12.1] i hodowano przez kolejne 2-3 godziny. W celu skontrolowania przebiegu indukcji i wydajności ekspresji genu, z hodowli pobierano (przed i po indukcji) do probówek Eppendorfa próbki hodowli o objętości 1ml. Zawartość probówek zwirowywano (5 min., 15000 obr./min.), zawieszano w buforze lizującym [Materiały 3.19.1.5], umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 3 minuty i analizowano za pomocą elektroforezy w denaturujących żelach poliakrylamidowych [Materiały 4.19.3]. Hodowlę zwirowywano (przez 30 minut, 4000 obr./min., wirówka MLW K23, 4°C), osad zawieszano w buforze lizującym (patrz 3.12.4.1), zamrażano w ciekłym

azocie i przechowywano w -80°C .

4.13 Izolacja i oczyszczanie fragmentów podjednostek σ^{70}

W celu zahamowania aktywności proteaz serynowych do osadu bakteryjnego zawieszono w 50 ml buforu lizującego (wiążącego) dodawano 10 μl PMSF [Materiały 3.12.2]. Aby zniszczyć ścianę komórkową bakterii dodawano 4 mg lizozymu [Materiały 3.5.6]. Zawiesinę bakterii inkubowano przez 30 minut w łaźni lodowej, a następnie sonifikowano za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego Sonoplus HD2070 (5 cykli po 1 minucie z 1 minutowymi przerwami - przy użyciu 80% mocy sonifikatora). Przez cały czas tego procesu zawiesinę trzymano w lodzie. Lizat bakteryjny zwirowywano w ultrawirówce L7-55 (30 minut, 22000 obr./min., rotor SW 28 (Beckmann), 4°C). Supernatant i osad analizowano na obecność fragmentów podjednostki σ^{70} .

4.13.1 Oczyszczanie fragmentów podjednostki σ^{70} za pomocą chromatografii na złożu Ni-NTA

Procedura oczyszczania rekombinowanych fragmentów podjednostki σ^{70} zależy od tego czy nadprodukowane białko jest w formie rozpuszczalnej i znajduje się w supernatancie czy też jest nierozpuszczalne i znajduje w ciałach inkluzyjnych. W pierwszym przypadku izolację i oczyszczanie białka prowadzono w warunkach niedenaturujących, w drugim stosowano mocznik w celu rozpuszczenia ciał inkluzyjnych.

4.13.1.1 Przygotowanie kolumny.

Złoże NiNTA agarozowe zaaktywowane niklem przechowywano w 30% etanolu. Przed oczyszczaniem w warunkach niedenaturujących kolumnę równoważono 10 objętościami buforu lizującego (wiążącego) [Materiały 3.12.4.1]. W przypadku warunków denaturujących przepłukiwano złoże dziesięcioma objętościami kolumny buforu lizującego zawierającego mocznik [Materiały 3.12.5.1].

4.13.1.2 Oczyszczanie fragmentów podjednostki σ^{70} w warunkach niedenaturujących

Na złożę Ni-NTA zrównoważone odpowiednim buforem lizującym nanoszono supernatant otrzymany w wyniku wirowania lizatu bakteryjnego. W celu elucji niespecyficznie związanych białek kolumnę przemywano dziesięcioma objętościami buforu płuczącego z 20 mM imidazolem [Materiały 3.12.4.2]. Białka specyficznie związane z kolumną wypłukiwano 10 objętościami buforu elucyjnego zawierającego imidazol [Materiały 3.12.4.3] o stężeniu 250 mM. Wstępnie określano zawartość białka w kolejnych frakcjach za pomocą mikrometody [Metody 4.14], a następnie szczegółową analizę wybranych frakcji przeprowadzano metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych.

4.13.1.3 Oczyszczanie w warunkach denaturujących

Osad otrzymany z wirowania lizatu bakteryjnego zawieszano w 50 ml denaturującego buforu lizującego zawierającego mocznik (pH 8) [Materiały 3.12.5.1], inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, po czym wirowano (30 minut, 22000 obr./min., rotor SW 28). Supernatant nanoszono na odpowiednio przygotowaną kolumnę ze złożem Ni-NTA agarozą. W celu usunięcia białek nie związanych ze złożem, i związanych mało specyficznie kolumnę przemywano buforem płuczącym (pH 6,8) [Materiały 3.12.5.2]. Właściwe białka wypłukiwano buforem elucyjnym I o pH 5,9 [Materiały 3.12.5.3] oraz buforem elucyjnym II o pH 4,5 [Materiały 3.12.5.4]. pH wszystkich buforów ustalano tuż przed ich użyciem. Frakcje do analiz w denaturujących żelach poliakrylamidowych, wybierano na podstawie oznaczeń białka w kolejnych frakcjach za pomocą mikrometody [Metody 4.14].

4.13.2 Regeneracja złoża

Po każdym procesie chromatografii złożę płukano wodą filtrowaną (10 objętości kolumny) i 2-3 objętościami 30% etanolu, w którym złożę przechowywano. Jeżeli zachodziła potrzeba, ze złoża Ni NTA agarozy wypłukiwano nikiel 0,25 M roztworem EDTA. Przepłukiwano wodą i ponownie aktywowano roztworem niklu [Materiały 3.12.3] (3 objętości złoża), nadmiar niklu wypłukiwano wodą.

4.14 Oznaczenie stężenia białka w roztworze – Mikrometoda

Na nitrocelulozę CA 250/0 (Selection/Niemcy) nakrapiano 2 μ l roztworu białka i suszono. Nitrocelulozę umieszczano na 10 minut w roztworze barwnika czerni amidowej [Materiały 3.13.2]. Następnie membranę odbarwiano w roztworze odbarwiacza [Materiały 3.13.3] przez około 20 minut. Plamy białka w zależności od stężenia przybierały różną intensywność zabarwienia. Na tej podstawie wybierano frakcje do analiz w denaturujących żelach poliakrylamidowych. Dla dokładniejszego określenia stężenia białka w próbie zabarwiony krążek wycinano usuwając odbarwioną całkowicie nitrocelulozę i umieszczano w 0,5 ml roztworu rozpuszczalnika [Materiały 3.13.4]. Następnie wykonywano pomiary spektrofotometrycznie uzyskanych roztworów przy długości fali $\lambda = 630$ nm w kuwetach kwarcowych. Stężenie białka odczytywano z krzywej wzorcowej wykonanej dla rosnących stężeń BSA.

4.15 Renaturacja białek

W celu usunięcia z roztworu białka czynnika denaturującego (mocznik) i zapewnienia warunków do prawidłowego zwijania się łańcucha polipeptydowego, aby uzyskać właściwą strukturę przestrzenną białka, przeprowadzano proces dializy. W pierwszej kolejności przy użyciu mikrometody [Metody 4.14] oznaczano wyjściowe stężenie białka w roztworze. Wyjściowe roztwory białka rozcieńczano tak aby uzyskać końcowe stężenie 10-50 μ g/ml. Taki roztwór umieszczano w szczelnie zamkniętym worku dializacyjnym, który umieszczano w buforze do dializy I [Materiały 3.12.6.1] z dodatkiem PMSF [Materiały 3.11.2]. Dializę prowadzono w 4°C, z delikatnym mieszaniem buforu. Cały proces trwał około 24 godzin z 5 - 6 krotną wymianą buforu. Dwa ostatnie etapy prowadzono w buforze II do dializy [Materiały 3.12.6.2]. Po dializie zawartość worka dializacyjnego wirowano (22 tys. obr./min., rotor SW 28) w celu usunięcia ewentualnie wytrąconego białka. Wstępne zateżanie supernatantu wykonywano na złożu Ni NTA [Metody 4.13.1.2]. Dalsze zateżanie roztworu białka prowadzona za pomocą zestawu MICROCON[®] firmy Milipore.

4.16 Zateżanie białka za pomocą zestawu MICROCON[®] - Centrifugal Filter Devices (Millipore)

Metoda ta umożliwia w sposób prosty i wydajny zateżanie i odsalanie roztworów zawierających wysokocząsteczkowe związki. Wykorzystuje niskowiążące, anizotropowe, hydrofilowe regenerowalne membrany celulozowe, które dobiera się w zależności od masy cząsteczkowej zateżanego białka.

Próbki białka nanoszono na kolumnkę z odpowiednim filtrem celulozowym i odwirowywano (20 minut, 4°C, 8 tys. obr./min., rotor SW 55 (Beckmann)). Następnie kolumnkę umieszczano w odwróconej pozycji w czystej probówce i wirowano (15 minut, 4°C, 8 tys. obr./min., rotor SW 55). Białko osadzone wcześniej na membranie przy wirowaniu kolumnki w odwrotnej pozycji zostaje uwolnione z membrany.

4.17 Elektroforeza białek w warunkach denaturujących

Do wybranych na podstawie mikrometody próbek białka (ok. 45 µl) dodawano 15 µl 4x stężonego buforu lizującego [Materiały 3.19.1.5] i umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 3 minuty. Próbki nanoszono na wcześniej przygotowane żele poliakrylamidowe do elektroforezy w warunkach denaturujących [Materiały 3.19.2] i przeprowadzano elektroforezę w 1x stężonym buforze zawierającym SDS [Materiały 3.19.1.4] pod napięciem 180V przez około 90 do 120 minut. Po zakończeniu elektroforezy żele barwiono w zależności od potrzeb roztworem barwnika Coomassi Brillant Blue lub roztworem azotanu srebra.

4.18 Barwienie białek w żelach poliakrylamidowych

4.18.1 Barwienie żelu za pomocą Coomasse Brillant Blue G

Żele umieszczano w około 100 ml roztworu barwnika [Materiały 3.19.1.6.2.2] i inkubowano w temperaturze pokojowej przez około 1 – 2 godzin. Następnie w celu usunięcia zabarwienia tła, żele odbarwiano roztworem odbarwiacza [Materiały 3.19.6.2.3],

również w temperaturze pokojowej. W niektórych przypadkach w celu przyspieszenia obu etapów procesu prowadzono je w temperaturze 55°C.

4.18.2 Barwienie żelu azotanem srebra

W celu usunięcia SDS żel umieszczano na 60 minut lub całą noc w 50% roztworze metanolu (100 ml). Po usunięciu metanolu żel zalewano na 15 minut roztworem azotanu srebra [Materiały 3.19.1.6.1.1], a następnie trzykrotnie przez 5 minut płukano wodą redestylowaną. Żel „wywoływano” roztworem wywoływacza [Materiały 3.19.1.6.1.2] do momentu pojawienia się i uzyskania odpowiedniej intensywności prążków białek, po czym barwienie przerywano stosując roztwór przerywający [Materiały 3.19.1.6.1.3].

4.19 Znakowanie starterów za pomocą [γ -³²P] ATP

Startery DNA do reakcji PCR oraz ApUpC do reakcji transkrypcji *in vitro* znakowano na końcu 5' za pomocą kinazy polinukleotydowej bakteriofaga T4 (Fermentas). Mieszaninę reakcyjną z DNA do znakowania przygotowywano wg poniższego schematu

Składniki:	Ilość:
10 μ M starter PLA1 lub 2 mM ApUpC	40 μ l
bufor do kinazy faga T4 (10 x stężony)	10 μ l
[γ - ³² P] ATP (aktywność właściwa 7000 Ci/mmol)	5 μ l
kinaza polinukleotydowa, 10 u/ μ l	6 μ l
Woda dejonizowana, jałowa	39 μ l

Wszystkie składniki dokładnie mieszano i inkubowano 30-45 minut w temperaturze 37°C. Następnie enzym inaktywowano przez 10 minut w temperaturze 68°C. Startery wyznakowane izotopem oczyszczano za pomocą zestawu AIQuick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) zgodnie z zaleceniami producenta. W przypadku ApUpC, po

inaktywacji enzymu nie stosowano oczyszczania.

4.20 **Badanie oddziaływań fragmentów podjednostki σ^{70} z rdzeniem polimerazy RNA i promotorowym DNA – reakcja tworzenia kompleksów**

W celu uzyskania kompleksów binarnych polimerazy RNA i promotorowego DNA przygotowywano najpierw mieszaninę rdzenia polimerazy RNA i podjednostki σ^{70} typu dzikiego lub jej fragmentów w odpowiednim buforze do kompleksowania.

Składniki:	Ilość:
Bufor do kompleksów 10 x stężony	2 μ l
Rdzeń polimerazy RNA (0,7 μ g/ μ l)	3,5 μ l
Podjednostka sigma typu dzikiego lub jej fragmenty	4 μ l (5,5 μ g/ μ l)
Woda dejonizowana	0,5 μ l

Po 20 minutowej inkubacji w 37°C (rekonstrukcja holoenzymu) do mieszaniny reakcyjnej dodawano znakowane izotopowo promotorowe DNA i inkubowano ponownie w tych samych warunkach przez kolejne 20 minut. Następnie mieszaninę dializowano wobec buforu TE [Materiały 3.15.2] przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Stosowano błony dializacyjne Millipore VS o średnicy porów 0.025 μ m. Po dializie do próbek dodawano 1 μ l stężonego roztworu barwników do elektroforezy [Materiały 3.18.2] aby uzyskać stężenie końcowe około 0,1 lub 1 mg/ml. Próbkę otrzymanych kompleksów nanoszono na 3.5% niedenaturujący żel poliakrylamidowy i przeprowadzano elektroforezę w buforze TBE [Materiały 3.18.1] pod napięciem 70 V przez około 2.5-3 godzin. W celu analizy żeli wykonywano autoradiografię żeli na kliszach rentgenowskich [Materiały 3.17, Metody 4.23].

4.21 **Badanie oddziaływań fragmentów podjednostki σ^{70} z DNA – test kompetycyjny z wykorzystaniem filtrów nitrocelulozowych**

Kompleksy fragmentów podjednostki sigma z DNA przygotowano zgodnie z procedurą podaną w punkcie 4.20. W tym przypadku użyto mieszaniny dwóch fragmentów DNA znakowanych ^{32}P : fragmentu zawierającego promotor A1 i fragmentu nie zawierającego sekwencji promotorowej. W mieszaninie oba fragmenty DNA występowały w tym samym stężeniu molowym. Uzyskane kompleksy filtrowano przez filtr nitrocelulozowy, aby usunąć niezwiązany w kompleksie DNA. Następnie krążki filtru umieszczano w świeżej probówce i zalewano buforem TE [Materiały 3.15.2]. Po 24 godzinnej elucji DNA wytrącono z roztworu [Metody 4.3] i rozpuszczano w małej objętości dejonizowanej wody. Próbkę nakładano na 5% żel poliakryloamidowy i przeprowadzano elektroforezę w buforze TBE [Materiały 3.18.1], pod napięciem 70 V, przez około 3 - 4 godzin. Po elektroforezie wykonywano autoradiografię żelu [Metody 4.23]. Ilość zawartego w kompleksie każdego z fragmentów DNA oznaczano na podstawie stopnia zaciemnienia kliszy. Było to możliwe dlatego, że użyte fragmenty DNA zawierające sekwencje promotorową i fragmenty DNA pozbawione tej sekwencji różniły się długością.

4.22 **Transkrypcja *in vitro***

Do kompleksów binarnych [Metody 4.20] dodawano 5 μl mieszaniny MIX (ApUpC, ATP, GTP, MgCl_2) [Materiały 3.16] i inkubowano 20 minut w 37°C . Po inkubacji dodawano 1 μl heparyny o stężeniu wyjściowym 10 mg/ml, 2 μl stężonego roztworu barwnika do elektroforezy [Materiały 3.18.2] i nakładano na niedenaturujący żel poliakrylamodowy. Elektroforezę prowadzono jak w punkcie 4.11. W przypadku reakcji transkrypcji, w której używano znakowanego ApUpC [Metody 4.19] lub GTP [α - ^{32}P], wykorzystywano nieznakowany promotorowy DNA.

4.23 **Autoradiografia**

Po zakończeniu elektroforezy na żelu zawierającym radioaktywnie znakowany DNA układano kliszę rentgenowską oraz ekran wzmacniający, umieszczano w kasecie do

autoradiografii i odpowiednio eksponowano w temperaturze -80°C . Następnie kliszę wywoływano przez 1-2 minut [Materiały 3.17.1], utrwalano przez 2 minuty [Materiały 3.17.2] i suszono. Wszystkie czynności wykonywano w warunkach ciemni fotograficznej przy świetle czerwonym.

5. Wyniki

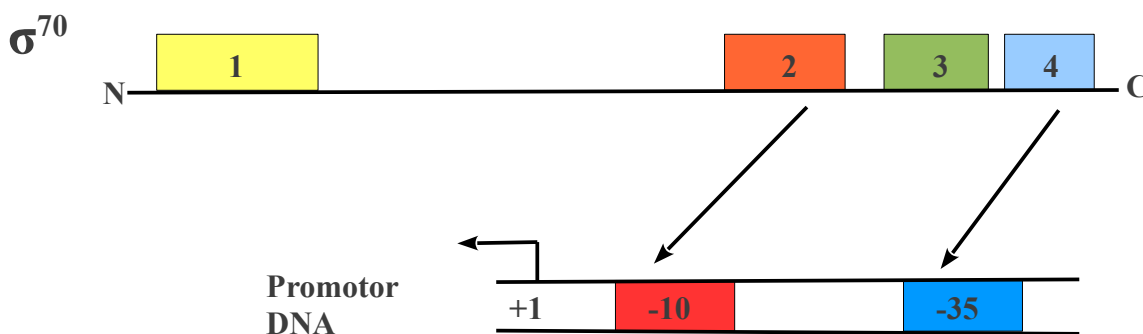
Podstawowy czynnik sigma (u *E. coli* σ^{70}) kieruje transkrypcją podczas eksplotencjalnego wzrostu bakterii, warunkując przeprowadzenie polimerazy RNA przez wszystkie etapy inicjacji transkrypcji. Na podstawie szerokich badań biochemicznych i genetycznych wykorzystujących również ograniczoną proteolizę σ^{70} ustalono, że białko to zawiera cztery funkcjonalnie zróżnicowane i silnie konserwowane domeny połączone giętkimi łącznikami. Taka budowa podjednostki sigma umożliwia dynamiczne zmiany konformacyjne zachodzące najprawdopodobniej sekwencyjnie podczas inicjacji transkrypcji. Podobną dużą elastyczność konformacyjną wykazuje rdzeń wiążący podjednostkę sigma jak i cały holoenzym na różnych etapach transkrypcji. Pełna analiza wszystkich zmian strukturalnych zachodzących w czasie i przestrzeni w obrębie holoenzymu jest bardzo trudna ze względu na bardzo skomplikowaną budowę i funkcjonalną złożoność polimerazy RNA. Pierwszym z najważniejszych zadań które musi wykonać polimeraza RNA jest uformowanie transkrypcyjnie kompetentnego kompleksu holoenzym-DNA, zdolnego do zainicjowania transkrypcji. Właśnie na tym etapie najważniejszą rolę w specyficznym rozpoznaniu sekwencji promotora pełni podjednostka sigma. Podjednostce sigma przypisuje się również udział w rozplataniu podwójnej helisy DNA, stabilizacji „bąbla transkrypcyjnego” w trakcie formowania kompleksu otwartego oraz udział w formowaniu pierwszych wiązań fosfodiesterowych. Kluczowym etapem inicjacji, który limituje wszystkie pozostałe etapy transkrypcji jest rozpoznanie sekwencji konsensusowych promotora, odpowiednio elementu -10 przez domenę 2.4 i elementu -35 przez domenę 4.2 podjednostki sigma. Podstawowe pytanie jakie sobie zadano było czy fragmenty σ^{70} zawierające domeny odpowiedzialne za rozpoznanie tylko jednego z dwóch elementów promotora będą nadal w stanie uformować holoenzym, skierować go do miejsca inicjacji transkrypcji i utworzyć kompleks otwarty. Jeżeli taki kompleks powstanie to czy będzie on zdolny do syntezy łańcucha RNA. Aby uzyskać odpowiedź na te pytania zaprojektowano, sklonowano i oczyszczono 5 fragmentów podjednostki σ^{70} , które zawierają (Ryc. 10 i 11):

FR1 - domeny 1 i 2

FR2 - domeny 2 i 3

FR3 – domeny 3 i 4

FR4	część domeny 3 i domenę 4
FR5	domenę 4



Ryc. 10 Diagram liniowy przedstawiający schemat budowy podjednostki σ^{70} i jej oddziaływanie z promotorowym DNA. Cyframi 1, 2, 3 i 4 zaznaczono domeny najsilniej ewolucyjnie konserwowane.

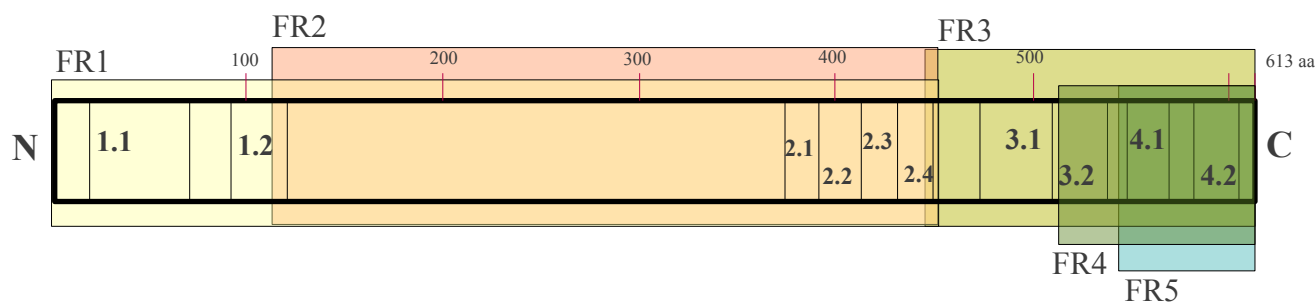
Zaprojektowane fragmenty podjednostki sigma wklonowano do systemu ekspresyjnego, który do transkrypcji białka wykorzystuje polimerazę RNA bakteriofaga T7. Dzięki temu możliwe było uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji klonowanych białek, które dodatkowo na jednym ze swoich końców zostały powiększone o 10 reszt histydyny. Fuzja klonowanych białek z rozszerzeniem polihistydynowym znacznie upraszczała proces ich oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa.

5.1 Konstrukcja i klonowanie fragmentów podjednostki σ^{70}

Wykorzystane w pracy fragmenty σ^{70} projektowano uwzględniając informacje o strukturze domenowej podjednostki sigma oraz przypisywanej tym domenom roli w rozpoznaniu sekwencji promotora oraz w tworzeniu kompleksu otwartego. Jednym z najważniejszych celów było otrzymanie takich fragmentów białka, które będą zdolne do niezależnego rozpoznania elementów -10 i -35 promotora. Oznaczało to przede wszystkim oddzielenie domen 2.4 i 4.2. Rekonstrukcja holoenzymu z takimi fragmentami podjednostki sigma, a następnie analiza oddziaływań holoenzymu z promotorem umożliwia w istocie niezależną analizę funkcji obu domen 2.4 i 4.2 w rozpoznaniu promotora. Brak szczegółowych danych o wszystkich oddziaływaniach podjednostki σ z rdzeniem

w obrębie tworzącego się holoenzymu oraz kompleksu z promotorowym DNA, nie daje pewności czy uzyskane konstrukty będą w stanie wypełniać wszystkie funkcje zarówno na etapie powstawania holoenzymu jak i specyficznego wiązania sekwencji promotora. Dlatego też skonstruowano fragmenty podjednostki sigma, które poza domenami 2.4 i 4.2 zawierały również sekwencje dodatkowe. Sekwencje te mogły być istotne na przykład dla wiązania z rdzeniem polimerazy.

Diagram na rycinie 11 przedstawia zaprojektowane fragmenty podjednostki σ^{70} wraz z domenami, które zawierają.



Ryc. 11 Diagram liniowy podjednostki σ^{70} polimerazy RNA *E. coli* z zaznaczonymi fragmentami FR1, FR2, FR3, FR4 i FR5.

FR1 – zawiera część N terminalną podjednostki sigma tj domeny 1 i 2, obejmuje aminokwasy 1 – 456 (1 – 1368 pz) – białko o masie 56,8 kDa.

FR2 – zawiera fragment domeny 1 i całą domenę 2, obejmuje aminokwasy 113 – 456 (313 – 1368 pz) – białko o masie 45 kDa.

FR3 – zawiera część C terminalną podjednostki sigma, z domenami 3 i 4, obejmuje aminokwasy 454 – 613 (1365 – 1842 pz) – białko o masie 22,8 kDa

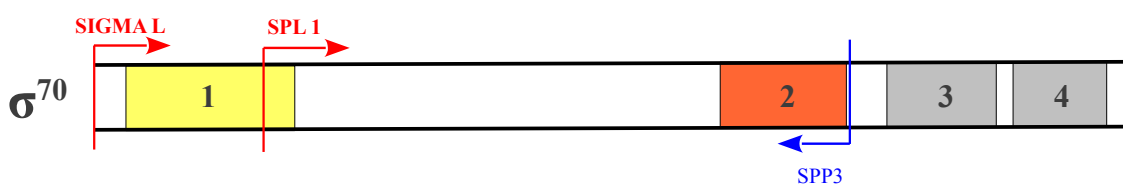
FR4 - zawiera fragment domeny 3 i całą domenę 4, obejmuje aminokwasy 499 – 613 (1497 – 1842 pz) – białko o masie 17,8 kDa

FR5 - białko o masie 14,3 kDa obejmuje jedynie C terminalną domenę 4. Aminokwasy od 530 do 613 (1590 – 1842 pz).

Fragmety DNA wykorzystane w klonowaniu uzyskano w reakcji PCR przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych starterów, do których wprowadzono dodatkowe sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne *Bam*HI i/lub *Nde*I. Wybór tych enzymów został dokonany na podstawie sekwencji MCS (ang. *Multiple Cloning Sites*) wektora pET16b (Ryc. 14 i 15). Upewniono się również, czy sekwencje rozpoznawane przez enzymy *Bam*HI i *Nde*I nie występują w konstruowanych fragmentach DNA kodujących odpowiednie fragmenty podjednostki σ^{70} .

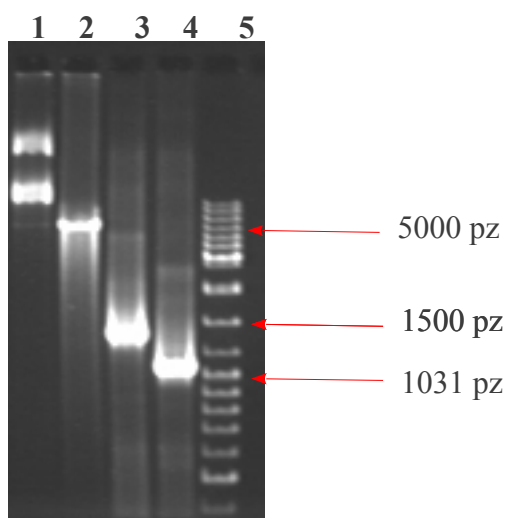
5.1.1 Klonowanie fragmentów DNA kodujących białka FR1 i FR2

Fragmety DNA kodujące białka FR1 i FR2 uzyskano w reakcji PCR przy użyciu dwóch starterów lewych SIGMA L dla FR1 oraz SPL1 dla FR2 i startera prawego SPP3 dla obu fragmentów [Materiały 3.6.6 i 3.6.5] (Ryc. 12). Do wszystkich trzech starterów wprowadzono sekwencje dla tego samego enzymu restrykcyjnego *Nde*I. Do prawego startera SPP3 nie wprowadzono sekwencji rozpoznawanej przez enzym *Bam*HI, ponieważ w sekwencji DNA podjednostki sigma dzikiego typu w regionie 1301 -1306 pz znajduje się naturalna sekwencja rozpoznawana przez ten enzym. Koniec dla obu fragmentów FR1 i FR2 zaplanowano na 1368 parę zasad. Czyli DNA kodujące białka FR1 i FR2 zawierało zatem naturalną sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny *Bam*HI.



Ryc. 12 Diagram liniowy podjednostki σ^{70} uwzględniający miejsca przyłączenia starterów użytych do otrzymania białek FR1 (SIGMA L, SPP3) i FR2 (SPL1, SPP3).

Na fotografii 1 przedstawiono rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA kodujących białka FR1 i FR2 użytych do klonowania oraz wektor pET16b.



Fot 1. Fragmenty DNA wykorzystane do klonowania białek FR1 i FR2.

Ścieżka 1 – plazmid pET16b nie cięty

Ścieżka 2 – plazmid pET16b w formie liniowej trawiony enzymem *NdeI* - 5711pz

Ścieżka 3 – fragment DNA o długości 1368 par zasad (kodujący białko FR1)

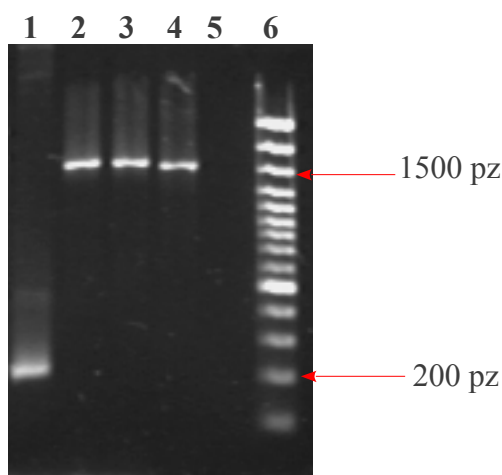
Ścieżka 4 – fragment DNA o długości 1055 par zasad (kodujący białko FR2)

Ścieżka 5 – marker GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas)

Elektroforezę przeprowadzono w 1% żelu agarozowym. Fragmenty DNA barwiono bromkiem etydyny.

Oczyszczone fragmenty DNA [Metody 4.3] – produkty reakcji PCR, poddano działaniu enzymu *NdeI*, który generował na obu końcach fragmentów tzw. „lepkie końce”. Wektor również został trawiony enzymem *NdeI*, oczyszczony i defosforylowany [Metody 4.3, 4.4, 4.5]. W celu zerwania wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi końcami fragmentów DNA wstawki, mieszaninę ligacyjną przed dodaniem enzymu inkubowano 10 minut w 45°C (powoduje to zwiększenie efektywności łączenia się insertu z wektorem). Ligację przeprowadzono przy pomocy ligazy DNA faga T4 [Metody 4.6]. Po 10 godzinach inkubacji w temperaturze 16°C i termicznym zainaktywowaniu ligazy mieszaninę użyto do transformacji świeżo przygotowanych komórek kompetentnych szczepu BL21(DE3) [Metody 4.7, Materiały 3.1]. Wektor pET16b zawiera gen β -laktamazy, dlatego transformanty wysiano na płytce z podłożem LA z dodatkiem ampicyliny [Materiały 3.3.2]. Ułatwiło to wstępną selekcję bakterii, które pobrały plazmid. Z kolonii bakteryjnych, które wyrosły na płytkach z ampicyliną wyizolowano plazmidy metodą lizy alkalicznej [Metody

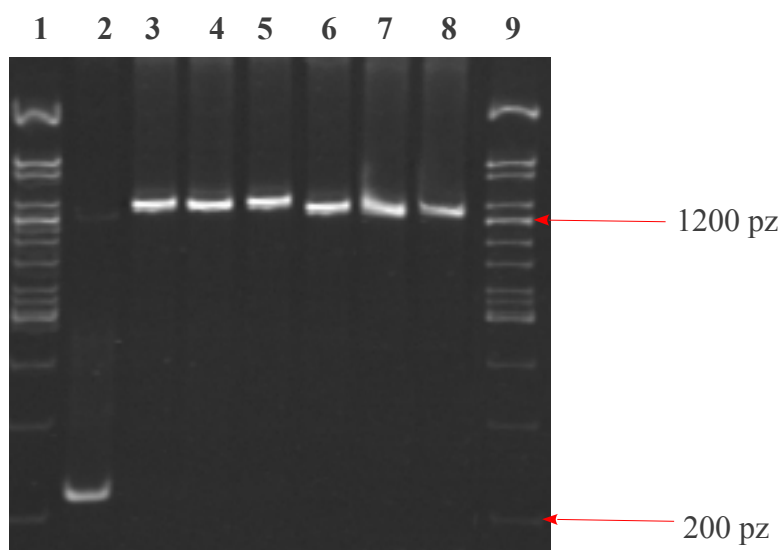
4.2] i sprawdzono czy zawierają klonowane fragmenty DNA. Klonowane fragmenty na obu końcach zwierały „lepkie końce” utworzone przez enzym *NdeI*, dlatego mogły zostać połączone z wektorem w obu orientacjach. Dodatkowo konieczne było zatem sprawdzenie orientacji klonowanych fragmentów DNA. W tym celu wykonano dwie reakcje PCR [Metody 4.1] przy użyciu odpowiednich starterów. W pierwszej reakcji użyto starterów T7L i T7P [Materiały 3.6.8, 3.6.9], komplementarnych do sekwencji promotora i terminatora polimerazy RNA faga T7, znajdujących się w wektorze (Ryc. 15). W reakcji PCR na niezrekombinowanym plazmidzie pET16b uzyskany zostanie produkt o długości 227 pz (Fot. 2 ścieżka 1, Fot. 3 ścieżka 2). W tym przypadku zamplifikowany zostanie tylko region klonowania i ekspresji tego wektora znajdujący się pomiędzy promotorem i terminatorem polimerazy RNA faga T7. Gdy w procesie ligacji wektor zostanie połączony z klonowanym fragmentem DNA kodującym białko FR1, w reakcji PCR na tym wektorze ze starterami T7L i T7P uzyskuje się produkt o długości 1595 pz (Fot. 2 ścieżka 2 i 3). Długość tego produktu była wynikiem amplifikacji regionu klonowania/ekspresji wektora pET16b (227 pz), powiększonego o klonowany fragment DNA o długości 1368 pz. W przypadku klonowania fragmentu DNA kodującego białko FR2, w wyniku reakcji PCR na zrekombinowanym wektorze, uzyskano przy użyciu starterów T7L i T7P produkt o długości 1282 pz, czyli 227 pz pochodzących od wektora i 1055 pz wstawki (Fot. 3 ścieżki 3, 4 i 5).



Fot 2. Kontrola klonów fragmentu FR1 podjednostki σ^{70} .

Ścieżki 1, 2, 3 – produkty reakcji PCR uzyskane przy użyciu starterów T7P i T7L. **Ścieżka 1** – produkt o długości 227 pz, **ścieżki 2 i 3** – produkt o dł. 1595 pz (1368 +227 pz). **Ścieżka 4 i 5** – produkty PCR uzyskane przy użyciu starterów T7L i SPP3, **ścieżka 4** – produkt o długości 1518 pz, **ścieżka 5** – brak produktu. **Ścieżka 6** – marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus.

Elektroforezę prowadzono w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny.



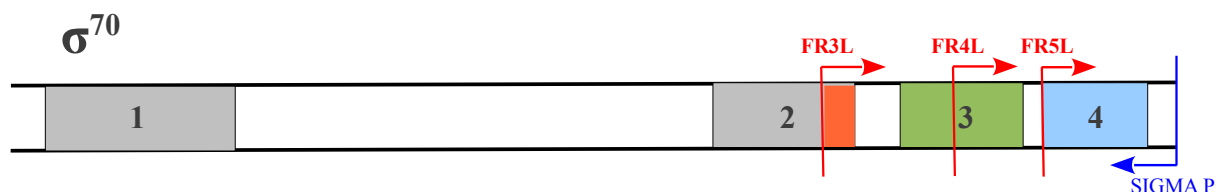
Fot. 3 Kontrola transformantów zawierających DNA fragmentu FR2 podjednostki σ^{70} .
Ścieżki 2, 3, 4 i 5 – produkty reakcji PCR przy użyciu starterów T7L i T7P
Ścieżka 2 – produkt PCR o długości 227 pz
ścieżki 3, 4 i 5 – produkty o długości 1282 pz
Ścieżki 6, 7 i 8 – produkty reakcji PCR (1205 pz) przy użyciu starterów T7L i SPP3
Ścieżki 1 i 9 – marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).
 Elektroforezą prowadzono w 5% żelu poliakrylamidowym. Żel barwiono bromkiem etydyny.

Drugim etapem kontroli klonów było sprawdzanie zrekombinowanych wektorów czy w procesie ligacji uzyskały wstawkę o prawidłowej orientacji. W tym celu wykonano drugą reakcję PCR przy użyciu innego zestawu starterów. Wykorzystano starter prawy SPP3 komplementarny do klonowanych fragmentów DNA oraz starter lewy T7L komplementarny tylko do wektora pET16b, a dokładnie do sekwencji promotora polimerazy RNA faga T7. Przy tak dobranych starterach reakcja PCR może zajść tylko przy prawidłowej orientacji klonowanych fragmentów DNA kodujących zarówno białko FR1 jak i FR2. Przy prawidłowej orientacji wstawki kodującej białko FR1 powinien powstać produkt o długości 1518 pz (Fot. 2 ścieżka 4), w wyniku amplifikacji 150 pz regionu wektora pET16 od sekwencji promotora T7 oraz 1368 pz klonowanego fragmentu. Analogicznie na matrycy wektora zawierającego fragment DNA, który koduje białko FR2 w prawidłowej orientacji w reakcji PCR oczekiwany jest produkt o długości 1205 pz (Fot. 3 ścieżki 6, 7 i 8), w tym 150 pz pochodziło od wektora, a od wstawki 1055 pz. Z fotografii 2 i 3 wynika, że uzyskano wektory zawierające fragmenty sigmy FR1 i FR2 w prawidłowej orientacji. Wyjątek stanowi klon dla którego w reakcji PCR nie otrzymano oczekiwanego produktu amplifikacji (Fot. 2

ścieżka 5) co świadczy o tym, że fragment FR1 został wklonowany do wektora w przeciwnej orientacji.

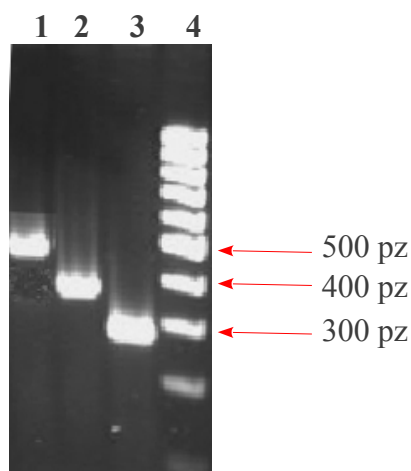
5.1.2 Klonowanie fragmentów DNA kodujących białka FR3, FR4 i FR5

Aby otrzymać fragmenty podjednostki σ^{70} zawierające C terminalne domeny metodą PCR wygenerowano fragmenty DNA zawierające sekwencje domen 2, 3 i 4. W tym celu użyto trzech różnych starterów lewych FR3L, FR4L i FR5L [Materiały 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3], odpowiednio dla białka FR3, FR4 i FR5. Startery te zwierały dodatkową sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny *Nde* I. Dla otrzymania wszystkich trzech fragmentów użyto tego samego startera prawego SIGMA P [Materiały 3.6.5], zawierał on sekwencję rozpoznawaną przez enzym *Bam*HI. Rycina 13 przedstawia schemat liniowy podjednostki sigma z uwzględnieniem miejsc przyłączenia starterów FR3L, FR4L, FR5L oraz SIGMA P.



Ryc. 13 Diagram liniowy podjednostki σ^{70} , uwzględniający miejsca przyłączenia starterów użytych do otrzymania fragmentów DNA kodujących białka FR3, FR4 i FR5.

Na fotografii 4 przedstawiono rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR, które następnie zostały użyte do klonowania.



Fot. 4 Fragmenty DNA użyte do klonowania białek FR3, FR4 i FR5.

Ścieżka 1 – produkt reakcji PCR otrzymany przy użyciu starterów FR3L i SIGMA P – 477 pz

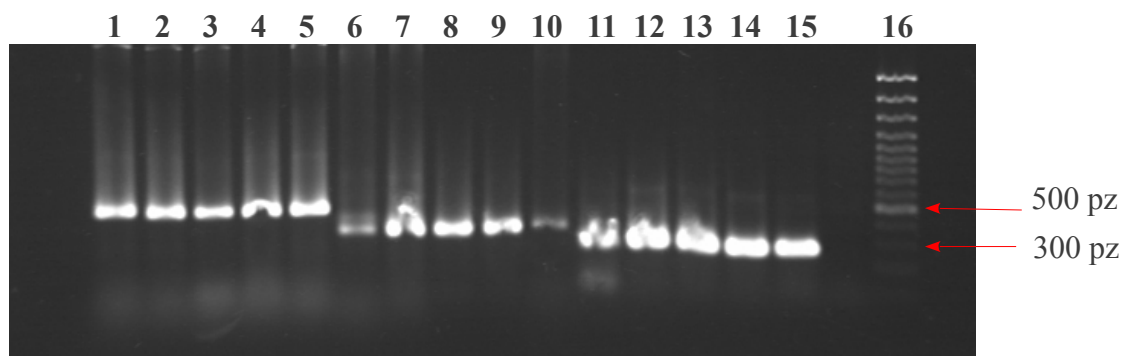
Ścieżka 2 – produkt reakcji PCR otrzymany przy użyciu starterów FR4L i SIGMA P – 345 pz

Ścieżka 3 – produkt reakcji PCR otrzymany przy użyciu starterów FR5L i SIGMA P – 257 pz

Ścieżka 4 – marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Elektroforezę prowadzono w 1,5% żelu agarozowym. Żel barwiono bromkiem etydyny.

Fragmenty DNA otrzymane w reakcji PCR poddano następnie sekwencyjnemu trawieniu enzymami *Nde* I i *Bam*H I. Po usunięciu białek enzymatycznych fragmenty DNA kodujące białka FR3, FR4 i FR5 połączono przy użyciu ligazy bakteriofaga T4 z wektorem pET16b, również trawionym enzymami *Nde* I i *Bam*H I. Mieszaninę ligacyjną [Metody 4.8] użyto do transformacji świeżo przygotowanych komórek kompetentnych szczepu BL21(DE3) [Metody 4.7]. Z transformantów, które wyrosły na płytkach LA z ampicyliną wyizolowano plazmidy metodą lizy alkalicznej [Metody 4.2], które następnie poddano dalszej analizie na zawartość klonowanych fragmentów DNA. W tym celu wykonano reakcję PCR przy użyciu starterów FR3L, FR4L, FR5L i SIGMA P. Otrzymanie produktów dla FR3 o długości 477 pz, FR4 o długości 345, a 257 pz w przypadku klonowania fragmentu DNA kodującego białko FR5, świadczyło o obecności odpowiednich fragmentów DNA w zrekombinowanych wektorach (Fot. 5).



Fot. 5 Kontrola transformantów otrzymanych w wyniku klonowania FR3, FR4 i FR5. Żel przedstawia analizę produktów reakcji PCR uzyskanych na matrycy plazmidowego DNA wyizolowanego z transformantów.

Ścieżki 1-- 5 produkty PCR uzyskane przy użyciu starterów FR3L i SIGMA P – 477 pz

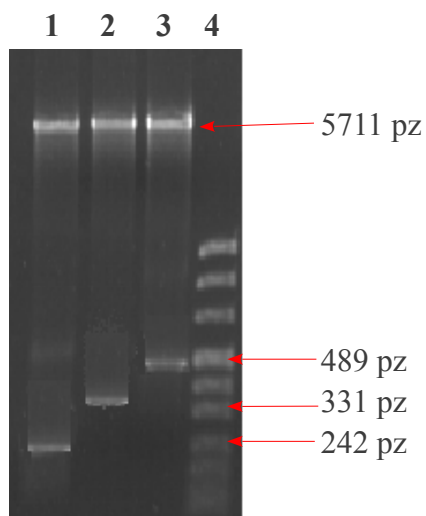
Ścieżki 6 – 10 produkty reakcji PCR uzyskane przy użyciu starterów FR4L i SIGMA P – 345 pz

Ścieżki 11 – 15 produkty reakcji PCR otrzymane przy użyciu starterów FR5L i SIGMA P – 257 pz

Ścieżka 16 – marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

Elektroforezę prowadzono w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny.

Te same plazmidy dodatkowo poddano analizie restrykcyjnej przy użyciu enzymów *Nde* I i *Bam*H I [Metody 4.4]. Analiza restrykcyjna uzyskanych klonów potwierdza obecność prawidłowych fragmentów DNA o długościach: 477 pz, 345 pz i 257 pz (Fot. 6). Na żelu agarozowym wyraźnie można zaobserwować górny prążek odpowiadający wektorowi w formie liniowej (5711 pz) i wycięte fragmenty klonowanego DNA (prążek dolny).



Fot. 6 Analiza restrykcyjna klonów FR3, FR4 i FR5 zawierających DNA kodujące fragmenty podjednostki sigma:

Ścieżka 1 – FR5

Ścieżka 2 – FR4

Ścieżka 3 – FR3

Ścieżka 4 – marker pUC Mix Marker 8 (Fermentas)

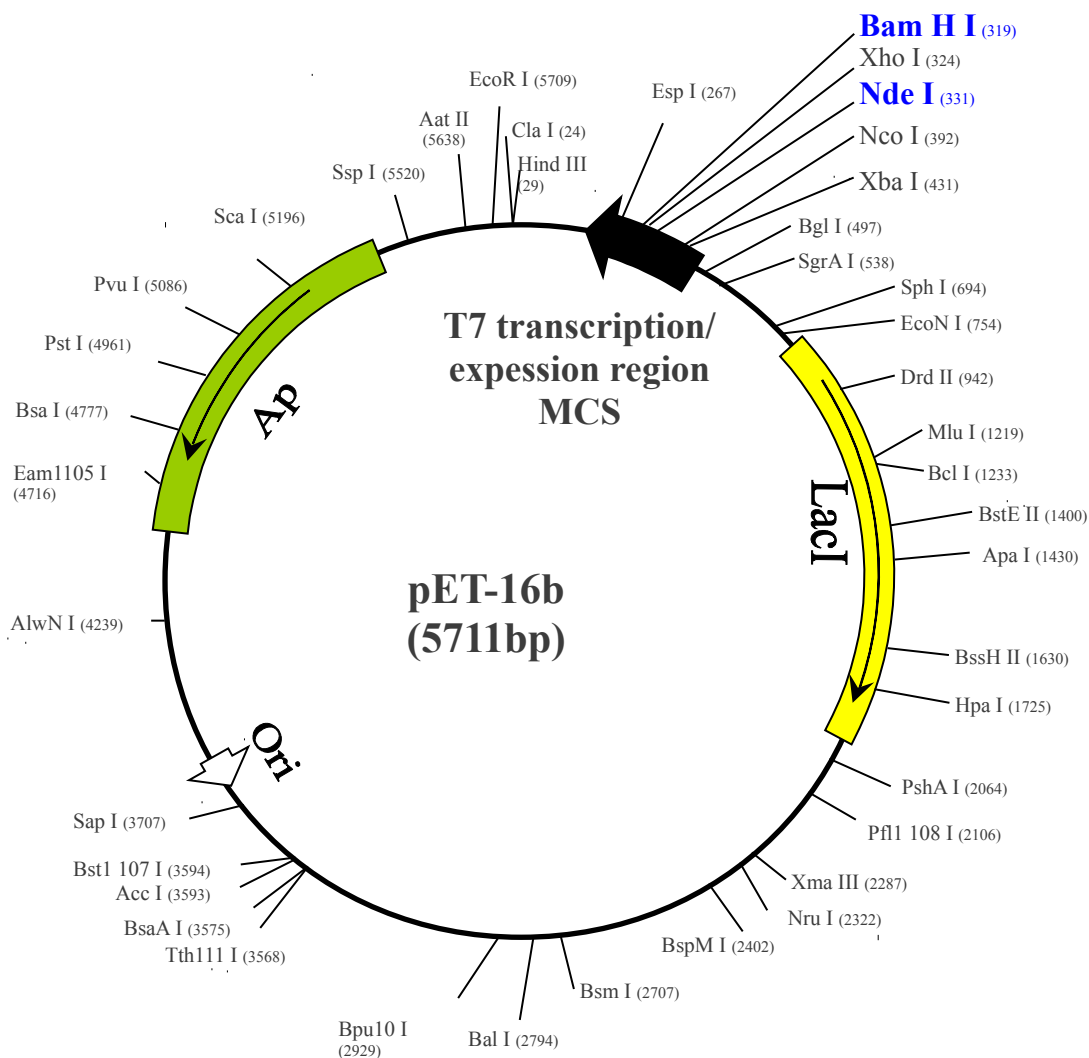
Elektroforezę prowadzono w 1,5% żelu agarozowym. Żel barwiono bromkiem etydyny.

Na ścieżkach 1, 2 i 3 widoczny jest górny prążek DNA odpowiadający formie liniowej wektora pET16b (5711 pz). Położenia prążków dolnych odpowiadają długościom klonowanych fragmentów DNA.

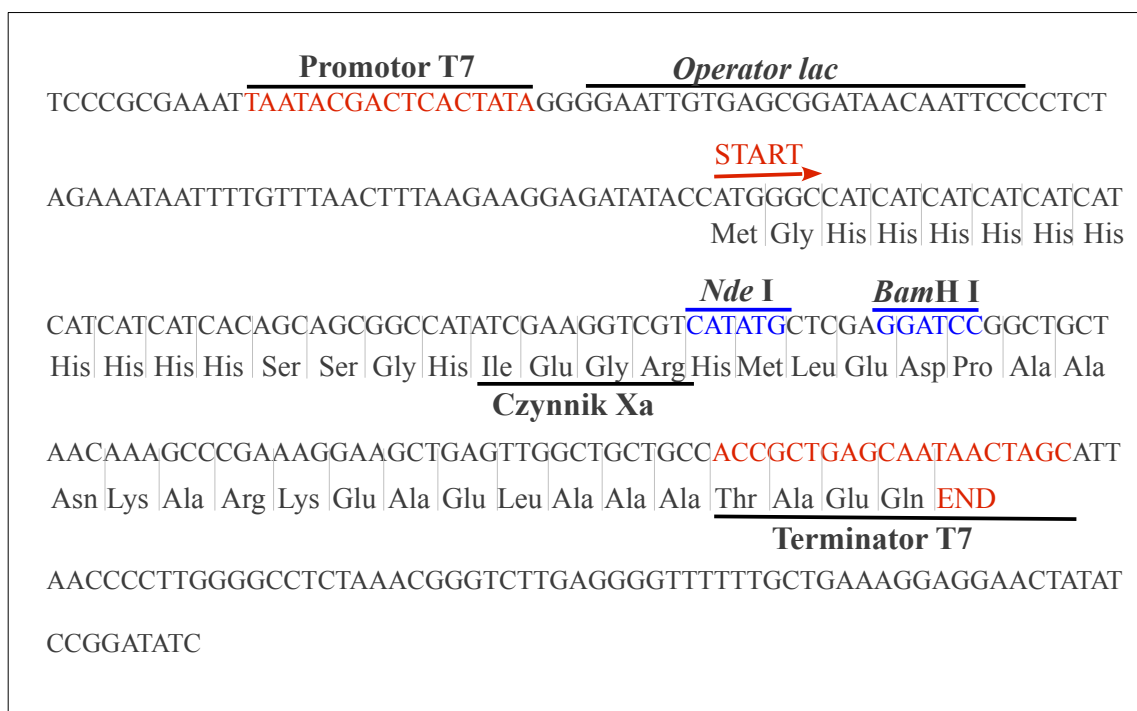
5.2 Indukcja, ekspresja i oczyszczanie białek będącymi fragmentami podjednostki σ^{70}

Jako nośnik klonowanych fragmentów DNA wybrano wektor pET16b, który umożliwia bardzo wydajną nadprodukcję i ścisłą regulację ekspresji białka w komórce bakteryjnej. Klonowane DNA, wstawione w MCS (ang. *Multiple Cloning Sites*) wektora, znajduje się pod kontrolą bardzo silnego promotora rozpoznawanego przez polimerazę RNA faga T7 (Ryc. 15). W regulacji transkrypcji z tego promotora wykorzystano element operonu laktozowego, a dokładnie sekwencję operatora, do której przyłącza się represor Lac I blokując transkrypcję. Gen represora również zlokalizowany jest w plazmidzie (Ryc. 14).

Nieindukowany promotor faga T7 jest nieaktywny ponieważ w sekwencji operatora *lac* zlokalizowany jest represor Lac I, który uniemożliwia przyłączenie się fagowej polimerazy RNA. Kolejny element regulacji związany jest z dostępnością polimerazy RNA faga T7, która dostarczana jest do systemu dzięki wbudowaniu genu kodującego ten enzym w chromosom bakterii. W tym przypadku jest to szczep BL21, który zawiera w chromosomie gen kodujący polimerazę RNA faga T7 wprowadzony w procesie lizogenizacji bakteriofagiem λ DE3. Gen polimerazy RNA faga T7 jest pod kontrolą promotora *lac UV5* i również podlega represji poprzez przyłączenie się represora Lac I. Dodanie do hodowli bakteryjnej induktora niemetyabolicznego IPTG powoduje zniesienie represji ekspresji genu kodującego polimerazę RNA faga T7, która niezbędna jest do transkrypcji klonowanych fragmentów DNA z promotora faga T7, obecnego w plazmidzie ekspresyjnym. IPTG znosi także represję tego promotora. Te dwa zdarzenia - odblokowanie promotora faga T7 w plazmidzie i intensywna synteza polimerazy RNA faga T7, która rozpoznaje ten promotor skutkują rozpoczęciem wydajnej ekspresji genów kodujących klonowane białka. Podwójna blokada ekspresji opisana powyżej zapobiega niekontrolowanej syntezie białka, które mogłyby być toksyczne dla komórki gospodarza.

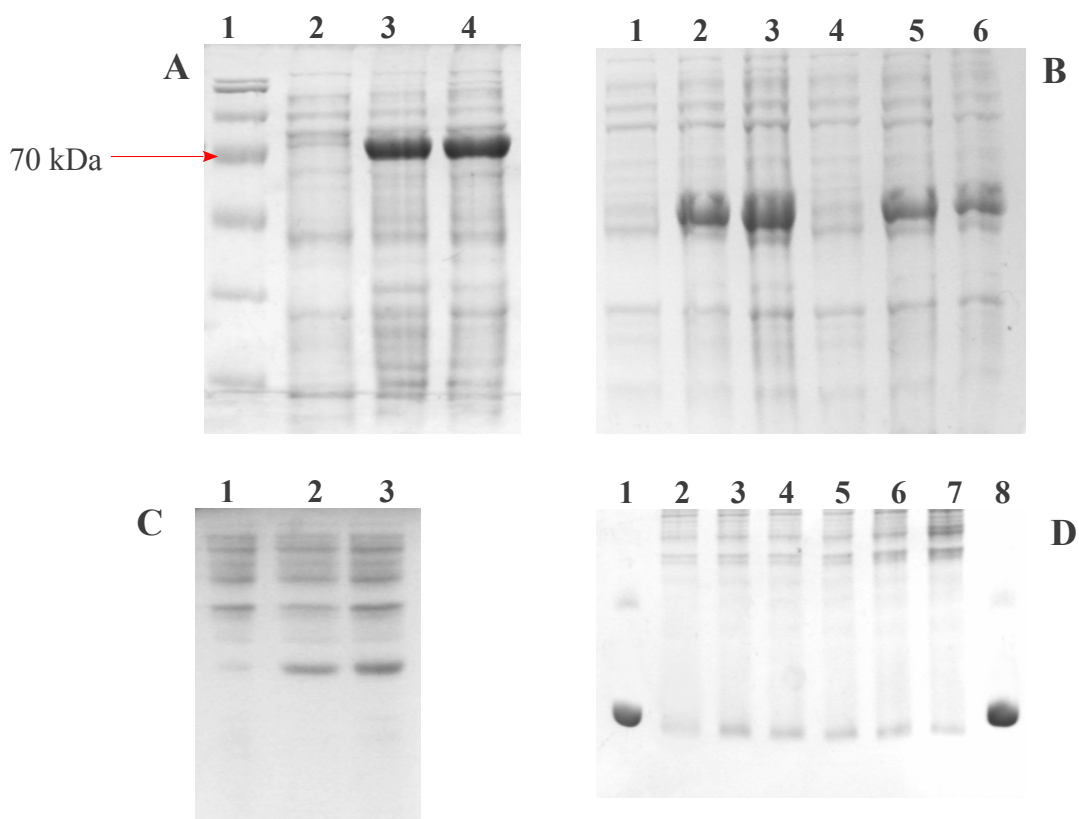


Ryc. 14 Mapa restrykcyjna wektora pET 16b (Novagen) z zaznaczonymi sekwencjami kodującymi β -laktamazę, represor Lac I oraz rejon ekspresji i klonowania, który wyróżniono czarną strzałką.



Ryc. 15 Rejon klonowania i ekspresji wektora pET16b. Zaznaczono sekwencje: promotora i terminatora polimerazy faga T7, operatora *lac*, oraz sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne *Nde I* i *BamH I* i czynnik Xa.

W pierwszej kolejności w uzyskanych klonach sprawdzono poziom indukcji i sprawność systemu represji, tzn. czy ekspresja białka rozpocznie się dopiero po dodaniu IPTG. Odmłodzoną hodowlę nocną inkubowano monitorując jej wzrost za pomocą spektrofotometru, do momentu gdy hodowla w logarytmicznej fazie wzrostu osiągnie $OD_{600} = 0,5-0,6$. Przy tej gęstości optycznej do hodowli dodawano induktor w stężeniu 1 mM. Przed dodaniem IPTG pobierano próbkę hodowli w celu sprawdzenia profilu białkowego nieindukowanej hodowli bakteryjnej metodą elektroforezy w denaturujących żelach poliakrylamidowych. W celu prześledzenia poziomu indukcji, pobierano kolejne próbki do analizy w żelu poliakrylamidowym w 30 minutowych odstępach czasu od momentu dodania induktora. Hodowlę z reguły kontynuowano po indukcji przez 3 – 3,5 godziny. Procedurę tę stosowano w przypadku wszystkich pięciu klonowanych białek. Na fotografii 7 przedstawiono żele poliakrylamidowe obrazujące przebieg indukcji syntezy białek FR1, FR2, FR3 i FR5.



Fot. 7 Przebieg indukcji syntezy białek FR1, FR2, FR3 i FR5 w hodowli bakterii BL21.

A. Indukcja białka FR1. **Ścieżka 1** – Wzorzec masowy białek (Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)), **ścieżka 2** – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG, **ścieżki 3 i 4** – próbki pobrane z hodowli bakteryjnej 30 minut i godzinę po dodaniu IPTG.

B. Indukcja białka FR2. **Ścieżki 1 i 4** – próbki pobrane z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG, **ścieżki 2 i 5** – próbki pobrane z hodowli bakteryjnej 30 min po dodaniu IPTG, **ścieżki 3 i 6** – godzinę po dodaniu IPTG.

C. Indukcja białka FR3. **Ścieżka 1** – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG, **ścieżka 2** – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej 30 min po dodaniu IPTG, **ścieżka 3** – godzinę po dodaniu IPTG.

D. Indukcja białka FR5. **Ścieżka 2** – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG, **ścieżki 3 – 7** – próbki pobierane z hodowli bakteryjnej co 30 minut od momentu indukcji, **ścieżki 1 i 8** – wzorzec masowy, lizozym 14,2 kDa. Elektroforezę prowadzono w 12,5% żelach poliakrylamidowych dla białek FR1, 2 i 3 i 15% w przypadku białka FR5. Żele barwiono Coomassie Brilliant Blue.

W hodowlach wszystkich klonów przed dodaniem induktora stwierdzono obecność tylko minimalnej ilości białka, którego masa cząsteczkowa zbliżona jest do masy cząsteczkowej indukowanych białek rekombinacyjnych (Fot. 7 A – ścieżka 2, B, C – ścieżka 1, D – ścieżka 2). Oznacza to, że w nieindukowanej hodowli BL21 w wyniku słabej ekspresji powstaje białko o podobnej masie cząsteczkowej lub też pomimo bardzo skutecznej represji w systemie obserwuje się niski poziom syntezy właściwych białek rekombinacyjnych (ang. *leaking*). Poziom ekspresji znacznie wzrasta po dodaniu IPTG i we wszystkich przypadkach osiąga swoje maksimum po około 30 – 60 minut (Fot. 7 A, D, B i C – ścieżka 3).

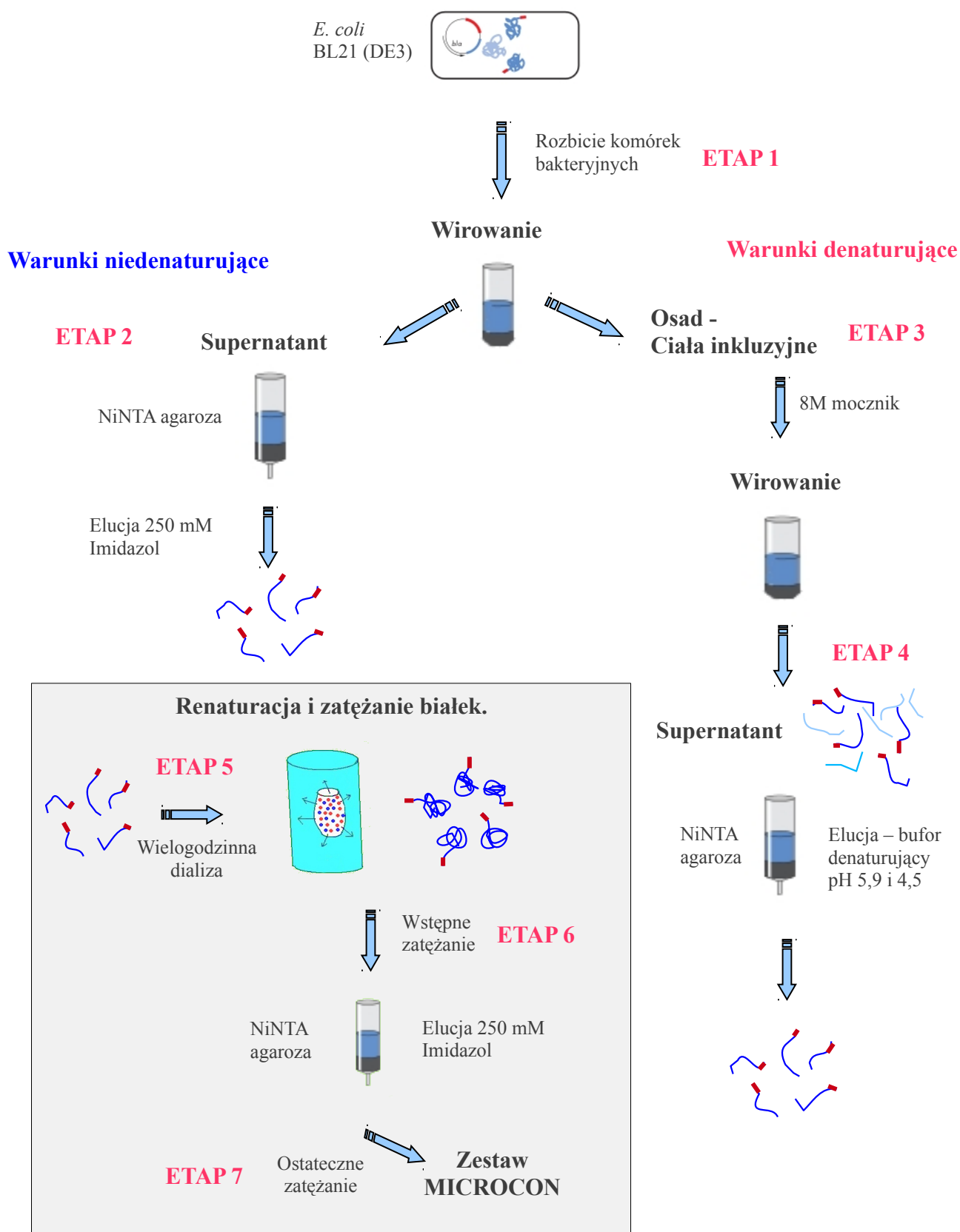
Łatwo zauważyć, że ruchliwość elektroforetyczna indukowanych białek różna jest od oczekiwanej ruchliwości białek o masach cząsteczkowych odpowiadających masie cząsteczkowej białek rekombinowanych. Uwzględniono dodatkową masę cząsteczkową pochodzącą od reszt aminokwasowych, dodanych do N-końca białka w procesie klonowania. Jest to analogiczna sytuacja do obserwowanej w przypadku podjednostki σ^{70} typu dzikiego, która w żelu poliakrylamidowym migruje jak białko o masie cząsteczkowej 82 kDa [68, 135]. Obliczona masa białka FR1 wynosi 57,2 kDa, w żelu zaś białko to lokalizuje się trochę powyżej białek o masie około 70 kDa (Fot. 7 A – ścieżki 1 i 3). FR2, które ma masę 45,1 kDa, w żelach poliakrylamidowych migruje jak białko o 10 kDa większe. Podobnie zachowują się fragmenty białkowe FR3 i FR4 (Fot. 11 i 12). Nie zaobserwowano tego zjawiska dla najmniejszego fragmentu białka FR5, które wykazuje ruchliwość elektroforetyczną zbliżoną do ruchliwości elektroforetycznej lizozymu, o prawie identycznej masie cząsteczkowej 14,2 kDa (Fot. 7 D – ścieżki 1 i 3).

Do izolacji i oczyszczania zrekombinowanych białek – fragmentów podjednostki σ^{70} wykorzystano chromatografię powinowactwa (IMAC – *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) na złożu Ni NTA [Materiały 3.20]. Było to możliwe dzięki obecności dziesięciu reszt histydyny w N-terminalnej części białek.

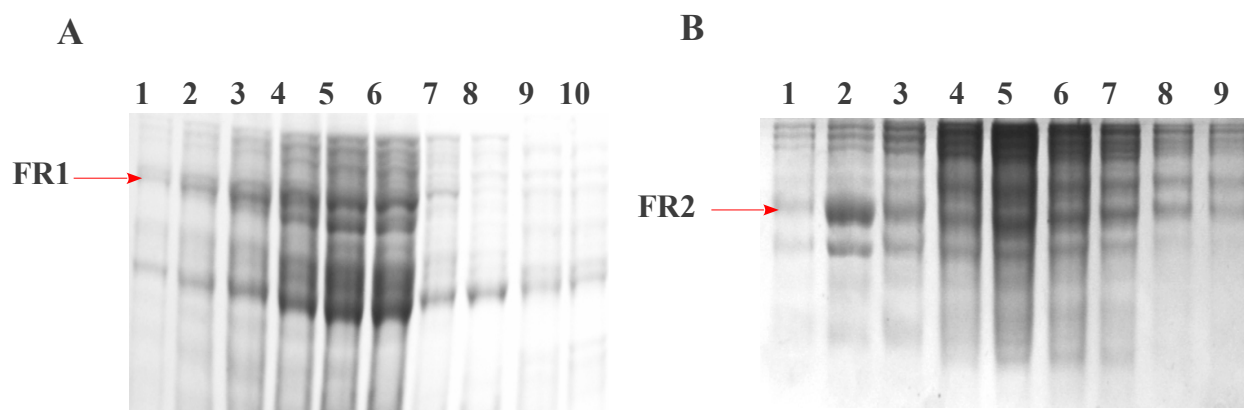
Histydyna jest jednym z dwóch obok tyrozyny aminokwasów występujących w białkach, zdolnym do kompleksowania metali, dlatego można ją wykorzystać do konstrukcji domen fuzyjnych. W warunkach fizjologicznych nie jest obdarzona ładunkiem, gwarantuje to minimalny wpływ domeny fuzyjnej na aktywność oczyszczanego białka. Histydyna zawiera pierścień imidazolowy, jest tak zwaną „miękką zasadą” i będzie tworzyła trwałe termodynamicznie kompleksy z „miękkimi kationami” metali np. Ni^{2+} (J. Minczewski, Z. Marczenko, *Chemia analityczna*, t. I, PWN, Warszawa 2005). Domena His-Tag jest jedną z najmniejszych stosowanych domen fuzyjnych w chromatografii powinowactwa. Przy długości 10 aminokwasów ma masę 1,4 kDa, dzięki temu jej wpływ na właściwości fizykochemiczne białka jest minimalny. Dodatkowo na wiązanie się białka fuzyjnego do złoża nie mają wpływu takie związki jak 6 M chlorowodorek guanidyny, 8 M mocznik, 2 % Triton X -100 czy 2 % Tween 20. Umożliwia to oczyszczanie białka nie tylko w warunkach natywnych, ale również w denaturujących. W warunkach natywnych, w celu elucji białka fuzyjnego, można zastosować kompetytor histydyny jakim jest imidazol, mający większe powinowactwo do jonów niklu. W warunkach denaturujących z użyciem mocznika obniża

się pH do 5,9, powodując protonację histydyny i wypłukanie białka ze złoża. Dodatkowo ekspresja białka fuzyjnego z rozszerzeniem polihistydynowym jest małym obciążeniem metabolicznym dla gospodarza, ale z kolei nie zwiększa rozpuszczalności białka.

W pracy tej sklonowano pięć różnych białek będących fragmentami podjednostki sigma. Skracanie podjednostki sigma od N czy też C-końca mogło wpłynąć na poprawę rozpuszczalności konstruktów. Dlatego po uzyskaniu nadprodukcji klonowanych białek, w pierwszej kolejności podjęto próbę ich oczyszczania w warunkach natywnych. W tym celu komórki bakteryjne zawieszono w buforze lizującym/wiążącym z dodatkiem inhibitorów proteaz serynowych, PMSF i lizozymu. Po inkubacji w lodzie przez około 20 minut uzyskano sferoplasty, które następnie rozbijano stosując ultradźwięki. Otrzymany w ten sposób lizat bakteryjny zwirowano w celu oddzielenia białek rozpuszczalnych od błon i ewentualnych ciał inkluzyjnych (Ryc. 16 ETAP 1). Osad w którym znajdowały się ciała inkluzyjne, przechowano w celu dalszych analiz. Supernatant zawierający białka rozpuszczalne nakładano na zrównoważoną buforem wiążącym kolumnę ze złożem Ni-NTA agarozą (ETAP 2). Oczyszczanie prowadzono w temperaturze 4°C. Frakcje wypłukane ze złoża analizowano w denaturujących żelach poliakrylamidowych na zawartość rekombinowanych białek. Okazało się, że większość białek wypłukiwana jest buforem z 20 mM imidazolem, czyli związana jest ze złożem niespecyficznie (Fot. 8 A ścieżki 2-6, B ścieżki 4 i 5). Frakcje wypłukiwane ze złoża Ni-NTA buforem elucyjnym z 250 mM imidazolem [Materiały 3.12.4, Metody 4.13.1] zawierały głównie zanieczyszczenia (Fot. 8 A ścieżki 7-10, B ścieżki 6-9) .



Ryc. 16 Schemat procedury oczyszczania i renaturacji białek fragmentów podjednostki sigma.



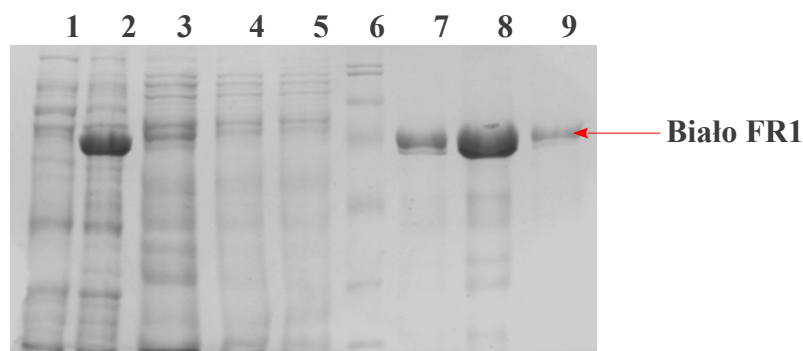
Fot 8. Oczyszczanie białek FR1 i FR2 w warunkach natywnych na złożu NiNTA.

A. FR1. Ścieżka 1 – frakcja nie związana ze złożem. Ścieżki 2-6 frakcje wypłukane ze złoża buforem płuczającym z 20 mM imidazolem. Ścieżki 7-10 frakcje wypłukane buforem elucyjnym z 250 mM imidazolem.

B. FR2. Ścieżka 1 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem induktora. Ścieżka 2 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej po wyindukowaniu syntezy białka. Ścieżka 3 – frakcja białka nie związana ze złożem. Ścieżki 4 i 5 – frakcje wypłukane ze złoża buforem płuczającym z 20 mM imidazolem. Ścieżki 6-9 frakcje wypłukane buforem elucyjnym z 250 mM imidazolem.

Elektroforezę prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żel barwiony Coomase Brilliant Blue.

Z eksperymentów poświęconych próbie odzyskania białek rekombinacyjnych FR1 i FR2 z supernatantu w warunkach natywnych wynika, że praktycznie całe nadprodukowane białko znajduje się w ciałach inkluzyjnych. Podobny wynik uzyskano również dla białek FR3, FR4 i FR5. Dlatego też, po uzyskaniu lizatu bakteryjnego i wirowaniu supernatant odrzucano, a ciała inkluzyjne zawieszano w roztworze czynnika denaturującego (8 M mocznik) i inkubowano przez 1 – 12 godzin (Ryc. 16, ETAP 3). Po kolejnym wirowaniu osad odrzucano, a supernatant, w którym znajdowały się rozpuszczone zrekombinowane białka, наносzono na kolumnę ze złożem NiNTA (Ryc. 16, ETAP 4) [Materiały 3.12.5, Metody 4.13.1]. Podczas chromatografii w warunkach denaturujących białka eluowano ze złoża obniżając pH buforów do 5,9 i 4,5. Przebieg procesu oczyszczania analizowano za pomocą elektroforezy w denaturujących żelach poliakrylamidowych [Metody 4.17]. Fotografia 9 przedstawia efekt oczyszczania białka FR1.



Fot. 9 Oczyszczanie białka FR1 metodą chromatografii powinowactwa na NiNTA agarozie w warunkach denaturujących.

Ścieżka 1 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG.

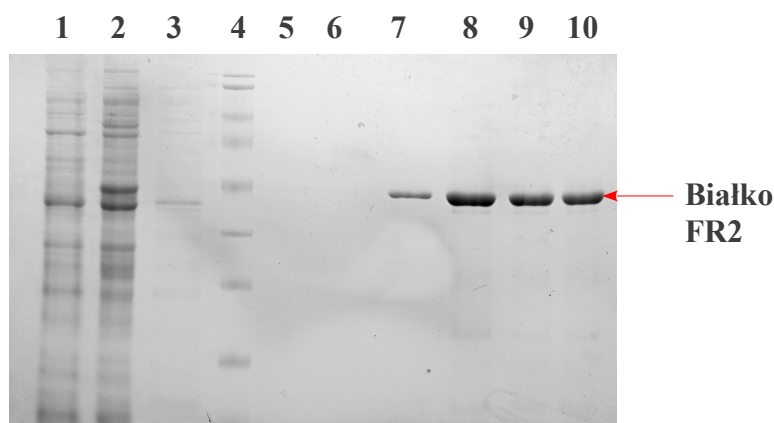
Ścieżka 2 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej po wyindukowaniu nadprodukcji białka przez IPTG.

Ścieżka 3 – frakcja nie związana ze złożem. **Ścieżki 4 i 5** – frakcje wypłukane buforem denaturującym płuczającym o pH 6,8. **Ścieżki 7-9** – frakcje wypłukane elucyjnym buforem denaturującym o pH 4,5

Ścieżka 6 – Masowy Marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)). Elektroforezę prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żel barwiony Coomase Brilliant Blue.

We frakcjach białek, które nie związały się ze złożem (Fot. 9 ścieżka 3) oraz wypłukiwanych buforem o pH 6,8 (Fot. 9 ścieżki 4 i 5) znajdowały się tylko zanieczyszczenia. Właściwe białko otrzymywano we frakcjach wypłukiwanych buforem elucyjnym o pH 4,5 (Fot. 9 ścieżki 7-9). Wyraźny prążek, który obserwujemy w tych ścieżkach odpowiada dokładnie białku, które pojawia się w hodowli bakteryjnej po dodaniu IPTG (ścieżka 2). Znajdują się one na wysokości czwartego prążka markera białkowego (ścieżka 6), który zawiera białko o masie około 70 kDa. Masa cząsteczkowa białka FR1 obliczona na podstawie sekwencji wynosi 57,2 kDa.

Efekt oczyszczania białka FR2 w warunkach denaturujących obrazuje fotografia 10. Podobnie jak w przypadku białka FR1, właściwe białko o dużym stopniu czystości wypłukano ze złoża buforem o pH 4,5 (Fot. 10 ścieżki 7 – 10). Oczyszczone białko odpowiada dokładnie temu, które pojawia się w komórce po dodaniu induktora (ścieżki 1 i 2). Porównanie z markerem białkowym (ścieżka 4), pozwala określić masę cząsteczkową tego białka na około 55-54 kDa, czyli o 10 kDa więcej niż wynosi masa cząsteczkowa obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej. We frakcjach nie związanych ze złożem i wypłukanych buforem płuczającym o pH 6,8 stwierdzono tylko niewielką obecność białkowych zanieczyszczeń (ścieżka 3).



Fot 10. Oczyszczanie białka FR2 przy użyciu chromatografii powinowactwa na złożu Ni-NTA agarozie w warunkach denaturujących.

Ścieżka 1 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG.

Ścieżka 2 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej po wyindukowaniu nadprodukcji białka przez dodanie IPTG.

Ścieżka 3 – frakcja nie związana ze złożem.

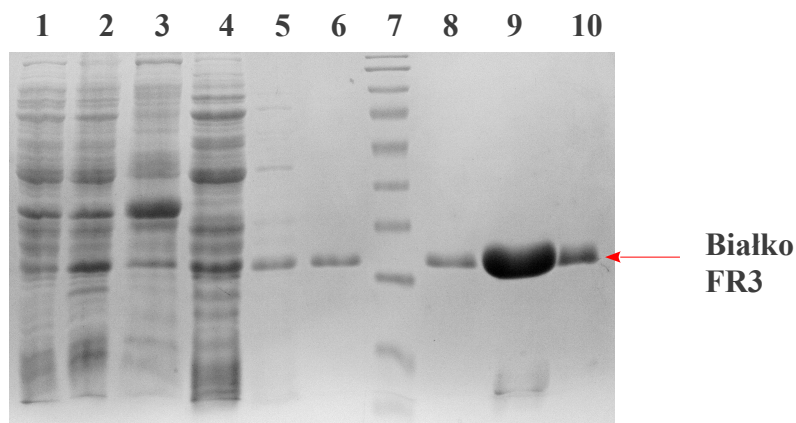
Ścieżki 5 i 6 – frakcje wypłukane buforem denaturującym elucyjnym o pH 5,9

Ścieżki 7 -10 – frakcje wypłukane buforem denaturującym elucyjnym o pH 4,5

Ścieżka 4 – Marker Masowy (Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)).

Elektroforezę prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żel barwiono Coomase Brilliant Blue.

Przebieg oczyszczania białka FR3 przedstawiono na fotografii 11.



Fot. 11 Oczyszczanie białka FR3 przy użyciu chromatografii powinowactwa na złożu NiNTA agarosa w warunkach denaturujących.

Ścieżka 1 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG.

Ścieżka 2 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej po wyindukowaniu nadprodukcji białka za pomocą IPTG.

Ścieżka 3 – Frakcja nie związana ze złożem.

Ścieżka 4 – frakcja wypłukana buforem denaturującym płuczającym o pH 6,8.

Ścieżki 5, 6 – frakcje wyeluowane buforem denaturującym elucyjnym o pH 5,9 i 4,5

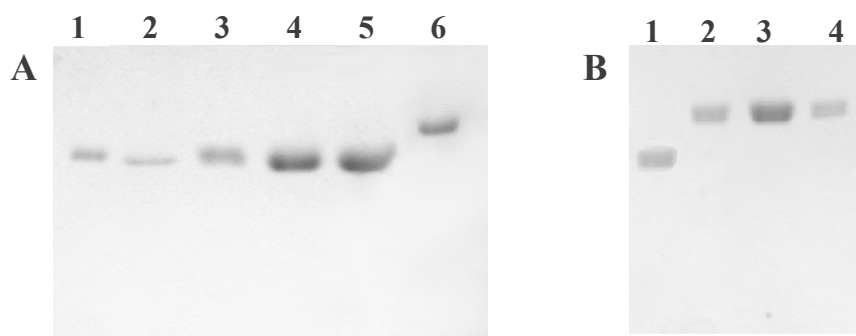
Ścieżki 8, 9 i 10 – frakcje wyeluowane buforem denaturującym elucyjnym o pH 4,5

Ścieżka 7 – Marker Masowy (Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)).

Elektroforezę prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żel barwiony Coomase Brilliant Blue.

Białko FR3 podobnie jak białka FR1 i FR2, wyeluowano buforem o pH 5,9 i 4,5 (ścieżki 5-10). Supernatant otrzymany w wyniku wirowania rozpuszczonych ciał inkluzyjnych zawierał niewielką ilość zanieczyszczeń, które są usuwane w czasie nakładania na kolumnę chromatograficzną i płukania buforem płuczającym o pH 6,8. Elucja białka z kolumny buforem o pH 5,9 i 4,5 daje praktycznie czyste białko FR3. W żelu poliakrylamidowym białko to migruje niezgodnie ze swoją masą 22,8 kDa, tylko lokalizuje się pomiędzy prążkami 7 i 8 markera, zawierającymi białka o masach około 35 i 25 kDa.

W przypadku chromatografii białka FR4 w warunkach denaturujących uzyskiwany preparat był praktycznie pozbawiony zanieczyszczeń, co doskonale widoczne jest na fotografii 12 (A – ścieżki 1-5, B ścieżki 2-4). Jako markery masowe wykorzystano białka FR3 i lizozym o masie 14,2 kDa.



Fot. 12 Oczyszczanie białka FR4 na Ni-NTA agarozą w warunkach denaturujących.

A. Ścieżki 1, 2 i 3 – frakcje wyeluowane ze złoża buforem denaturującym elucyjnym pH 5,9.

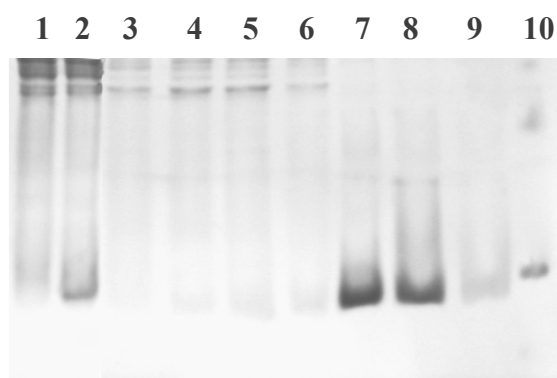
Ścieżki 4 i 5 frakcje wypłukane ze złoża buforem denaturującym elucyjnym pH 4,5.

Ścieżka 6 – marker masowy – białko FR3

B. Ścieżka 1 – marker masowy - lizozym (14,2 kDa). **Ścieżka 2** – frakcje wyeluowane ze złoża buforem denaturującym elucyjnym pH 5,9. **Ścieżki 3 i 4** – frakcje wypłukane ze złoża buforem denaturującym elucyjnym pH 4,5. Elektroforezę prowadzono w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących barwionym Coomase Brilliant Blue.

Obliczona masa cząsteczkowa białka FR4 to 17,8 kDa. W czasie elektroforezy w 15% żelach poliakrylamidowych białko to wykazuje ruchliwość elektroforetyczną mniejszą niż lizozym a większą niż białko FR3 wędrujące w pozycji odpowiadającej białku o masie około 28 kDa. Fragment ten migruje zatem w pozycji w przybliżeniu odpowiadającej jego rzeczywistej masie cząsteczkowej.

Białko FR5 oczyszczane w analogiczny sposób jak pozostałe rekombinowane białka (FR1, FR2, FR3 i FR4) w warunkach denaturujących daje pojedynczy prążek o ruchliwości elektroforetycznej zbliżonej do ruchliwości elektroforetycznej lizozymu (Fot 13). Obliczona masa cząsteczkowa fragmentu FR5 (14,3 kDa) jest niemal identyczna z masą cząsteczkową lizozymu.

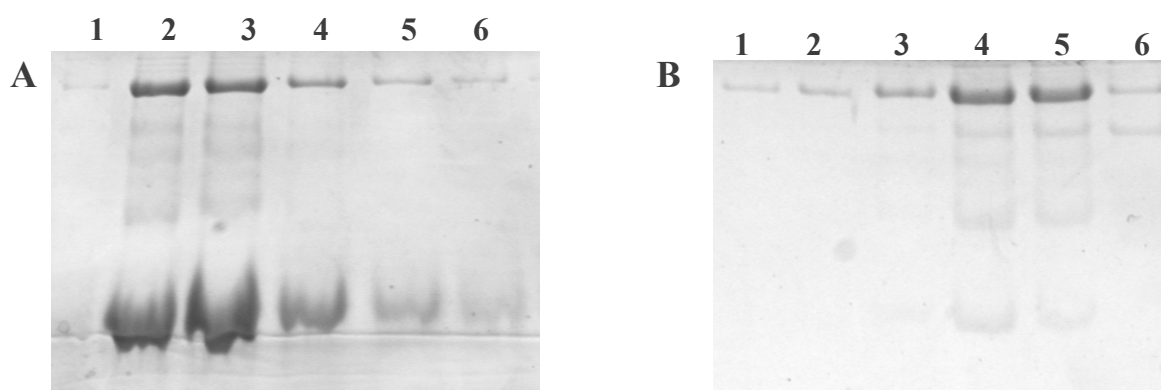


Fot. 13 Oczyszczanie białka FR5 na kolumnie z NiNTA agarozą w warunkach denaturujących. **Ścieżka 1** – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej przed dodaniem IPTG. **Ścieżka 2** – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej po wyindukowaniu nadprodukcji białka przez IPTG. **Ścieżka 3** – Frakcja nie związana ze złożem. **Ścieżki 4 i 5** – frakcje wypłukane buforem denaturującym płuczącym o pH 6,8. **Ścieżki 6-9** frakcje wyeluowane buforem denaturującym elucyjnym o pH 5,9. **Ścieżka 10** – marker lizozym (14,2 kDa). Elektroforezę prowadzono w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żel barwiono Coomase Brillant Blue.

Fragment FR5 podobnie jak FR4, a w przeciwieństwie do fragmentów FR1, FR2 i FR3 nie wykazuje anomalnej ruchliwości elektroforetycznej.

W przypadku wszystkich pięciu klonowanych białek po chromatografii na złożu NiNTA osiągnęto wysoką ponad 90% czystość preparatu. Kolejnym krokiem było przywrócenie białkom natywnej, prawidłowej konformacji. W tym celu należało usunąć czynnik denaturujący. Zastosowano wielogodziną dializę wobec buforu do „rekonstrukcji” (Ryc. 16, ETAP 5) [Materiały 3.12.6]. W początkowych eksperymentach w czasie dializy dochodziło do wytrącania się dializowanych białek rekombinacyjnych. Optymalizując warunki rekonstrukcji stwierdzono, że główną przyczyną było zbyt duże stężenie białka w worku dializacyjnym. W dużym stopniu można było zapobiec temu odpowiednio rozcieńczając dializowane białka. Aby uniknąć wytrącania białka w worku dializacyjnym w trakcie dializy roztwory białek rozcieńczano do stężenia ok. 50 µg/ml, co z kolei zwiększało objętość dializatu. Często końcowa objętość roztworu białka w worku dializacyjnym przekraczała 150 ml, dlatego też po dializie zachodziła konieczność zateżnienia białka. Do wstępnego zateżnienia białka po dializie wykorzystano ponownie złożo NiNTA (Ryc. 16, ETAP 6). Dalsze zateżnienie preparatów osiągnęto przy użyciu zestawu MICROCON® - Centrifugal Filter Devices (Millipore) (Ryc. 16, ETAP 7) [Metody 4.16]. W przypadku czterech białek FR2, FR3, FR4 i FR5 uzyskano zadowalające efekty. Białko FR1 podczas dializy i zateżnienia ulegało niestety silnej degradacji pomimo obecnego w roztworze

inhibitora proteaz PMSF. Widoczne jest to na żelach wykonanych po etapie zateżenia z użyciem chromatografii na NiNTA agarozie (Fot. 14A). Wszystkie widoczne prążki na poszczególnych ścieżkach musiały być fragmentami białka FR1 z polihistydyną na N końcu, ponieważ związały się ze złożem na kolumnie. Obecność szeregu dyskretnych prążków białkowych oraz bardzo silny prążek w dolnej części żelu mogą świadczyć, że proces degradacji wymagał kilku cięć proteaz w różnych miejscach białka i, że ostateczne produkty to krótkie fragmenty zawierające polihistydynę.



Fot. 14 Zateżanie natywnego białka FR1 na Ni NTA agarozie.

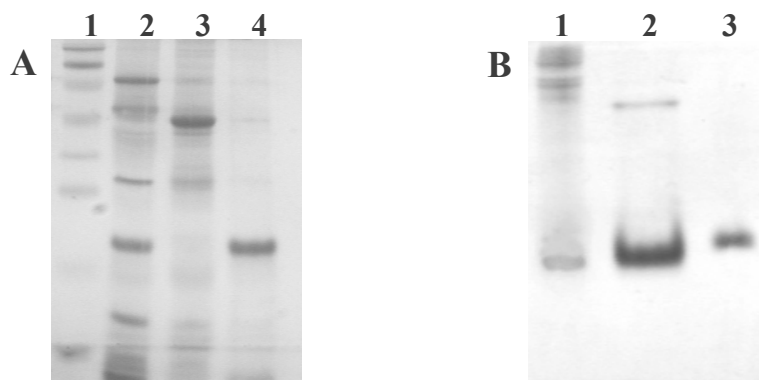
A. Ścieżki 2-6 – frakcje wypłukane ze złoża buforem elucyjnym z 250 mM imidazolem.

B. Ścieżki 2-6 – frakcje wypłukane ze złoża buforem elucyjnym z 250 mM imidazolem.

Elektroforezę prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żele barwiono azotanem srebra.

Aby ograniczyć degradację białka FR1 w czasie oczyszczania próbowano modyfikować proces dializy i zateżenia. Mimo pewnej poprawy stanu białka po dializie (Fot. 14B ścieżki 2-6), na dalszym etapie zateżenia nie udało się zapobiec degradacji (Fot. 15A ścieżka 2). Próby zastosowania alternatywnej metody zateżenia przez wysalanie białka siarczanem amonu były nieskuteczne. Ponadto w czasie rozpuszczania zateżonego już preparatu białko wytrącało się. Dlatego też białka FR1 nie wykorzystywano w dalszych eksperymentach poświęconych funkcjonalnej charakterystyce tego fragmentu.

Efekty uzyskane w procesie renaturacji i zateżenia pozostałych białek rekombinacyjnych były zadowalające (Fot. 15 A – białko FR2 ścieżka 3, białko FR3 ścieżka 4; Fot. 15 B – białko FR5 ścieżka 2).



Fot. 15 Efekt zateżenia renaturowanych białek FR1, FR2, FR3 i FR5.

A. Ścieżka 1 – Marker Masowy (Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)).

Ścieżka 2 – białko FR1, **ścieżka 3** – białko FR2, **ścieżka 4** – białko FR3.

B. Ścieżka 1 – próbka pobrana z hodowli bakteryjnej po wyindukowaniu nadprodukcji białka przez IPTG.

Ścieżka 2 – zateżone natywne biało FR5, **ścieżka 3** – lizozym (14,2 kDa).

Elektroforezę prowadzono w 12,5% (A) i 15% (B) żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żele barwiono azotanem srebra.

Preparaty przedstawione na fotografii 15 uzyskano najpierw w procesie dializy, a następnie wstępnie zateżono metodą chromatografii na złożu Ni-NTA agarozie oraz wirowano przy użyciu zestawu MICROCON (Centrifugal Filter Devices (Millipore)). Preparaty te zawierały, z wyjątkiem fragmentu FR1, stosunkowo niewielki procent zanieczyszczeń i produktów degradacji, co umożliwiała przystąpienie do następnego etapu poświęconego funkcjonalnej charakterystyce otrzymanych fragmentów podjednostki sigma.

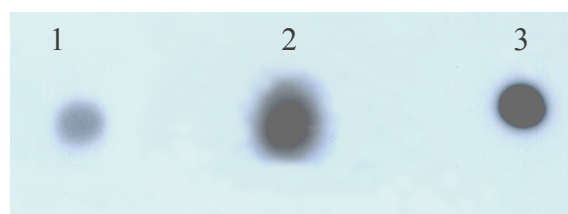
5.3 Badanie aktywności fragmentów σ^{70}

Jedną z zalet oczyszczania białka w warunkach denaturujących jest to, że całą procedurę oczyszczania można wykonywać w temperaturze pokojowej. Są to warunki, w których oczyszczane białko chronione jest przed działaniem proteaz przez czynnik denaturujący mocznik lub guanidynę, a ostateczny produkt pochodzący z ciał inkluzyjnych charakteryzuje wysoki stopień czystości. Bardzo poważny problem stanowi jednak konieczność odzyskania białka w formie natywnej. Należy tak dobrać warunki, aby w trakcie usuwania czynnika denaturującego białko nie ulegało wytrąceniu, przybierało prawidłową konformację i odzyskiwało aktywność. W przypadku enzymów dowodem skutecznej renaturacji jest przywrócenie aktywności enzymatycznej. W naszym przypadku

sprawa była znacznie bardziej złożona, ponieważ podjednostka sigma sama nie posiada aktywności enzymatycznej. Do wypełnienia swej funkcji wymaga utworzenia złożonego, wielopodjednostkowego kompleksu polimerazy RNA *E. coli*. Fragmenty podjednostki sigma, nawet gdy białko przyjmie formę natywną, mogą być niezdolne do oddziaływania z rdzeniem i w efekcie do przeprowadzenia któregoś z etapów inicjacji transkrypcji. Konieczne zatem było znalezienie zastępczej metody, która pozwoliła by na wstępne sprawdzenie aktywności białka. Zaproponowano więc test z wykorzystaniem filtrów membranowych, oparty na analizie oddziaływania podjednostki sigma z DNA.

Wolna podjednostka σ^{70} nie łączy się z promotorowym DNA, następuje to dopiero po połączeniu się z rdzeniem w holoenzym. Dombroski i wsp (1993) wykazali, że N terminalna domena 1.1 blokuje czy też maskuje te regiony sigmy, które łączą się specyficznie z elementami promotora. Skonstruowali szereg fragmentów σ^{70} sekwencyjnie usuwając aminokwasy od N końca i sprawdzając, który fragment, jako wolne białko fuzyjne z GST, połączy się z promotorowym DNA. Satisfakcjonujący wynik uzyskano dla fragmentu podjednostki sigma z którego usunięto 72 N-terminalne aminokwasy, czyli dla podjednostki sigma pozbawionej całkowicie domeny 1.1.

Białka FR2 i FR3 zawierające odpowiednio domenę 2 (FR2) oraz 3 i 4 (FR3) podjednostki σ^{70} , pozbawione są domeny 1.1. Można więc zakładać, że jeśli przyjęły formę natywną będą zdolne samodzielnie bez udziału rdzenia oddziaływać z DNA. Na fotografii 16 przedstawiono wyniki doświadczeń, w których badano zdolność fragmentów rekombinacyjnych podjednostki sigma do wiązania promotorowego DNA.



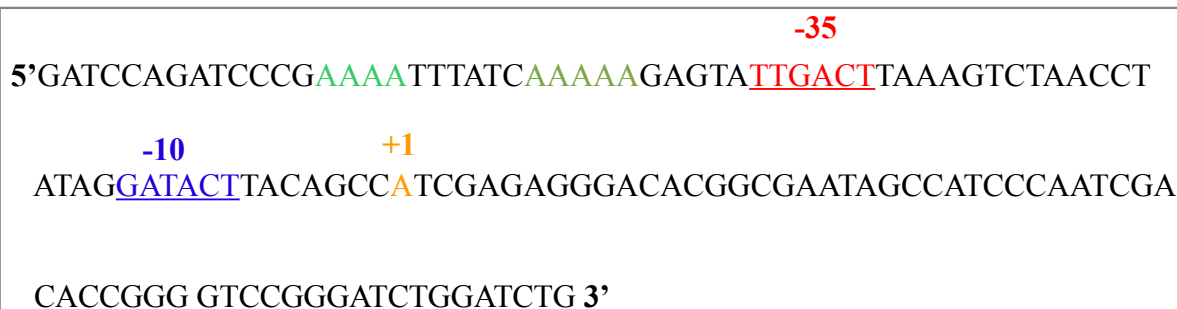
Fot. 16 Autoradiografia kompleksów fragmentów podjednostki sigma z promotorowym DNA immobilizowanych w czasie sączenia na membranowych filtrach nitrocelulozowych. DNA zawierające sekwencję promotora A1 znakowano radioaktywnie na końcu 5' przy użyciu $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. 1, 2 i 3 odpowiednio kompleksy białek FR1, FR2 i FR3 z promotorowym DNA.

Wyniki te sugerują, że badane fragmenty podjednostki sigma wiążą promotorowe DNA i powstający kompleks jest zatrzymywany w czasie sączenia przez nitrocelulozowy filtr membranowy. W takim eksperymencie wolne, nie związane w kompleksie DNA znajdzie się w przesączu. Stopień zacierzenia kliszy przez DNA znajdujące się w kompleksie może być miarą efektywności oddziaływania fragmentu białkowego z DNA. Najwyższą aktywność w wiązaniu promotorowego DNA wykazują fragmenty FR3 i FR2. Znacznie słabszą aktywnością charakteryzuje się fragment FR1. Fragment ten, jak pokazano na rycinie 11 zawiera całe domeny 1 i 2, pozbawiony jest natomiast domen 3 i 4. W związku z tym, że zawiera on domenę 1, zgodnie z sugestią Dombrowski i wsp., nie powinien umożliwiać powstawania kompleksów z wolnym promotorowym DNA, ponieważ domena 1 przeszkadza w oddziaływaniu domen 2 i 4 w wiązaniu sekwencji promotorowych. W naszym eksperymencie białko FR1 tworzy (mniej wydajnie niż fragmenty FR2 i FR3) kompleksy z promotorowym DNA. Może mieć to związek z brakiem domeny 4 i maskującym efektem domeny 1. Tworzenie z niską efektywnością kompleksu białko-DNA może być w tym przypadku wynikiem oddziaływań niespecyficznych.

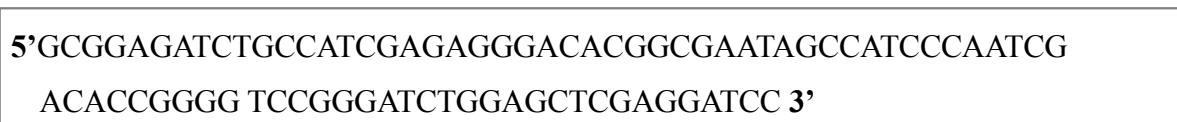
5.3.1 Test kompetycyjny z wykorzystaniem filtrów membranowych dla białka FR3

Wykonano zatem test kompetycyjny, w którym do tworzenia kompleksów z białkiem wykorzystywano mieszaninę dwóch fragmentów DNA, zawierającego pełną sekwencję promotora A1 (130 pz) oraz fragment DNA Ø (81 pz) pozbawiony całkowicie sekwencji promotora (Ryc. 17).

A1



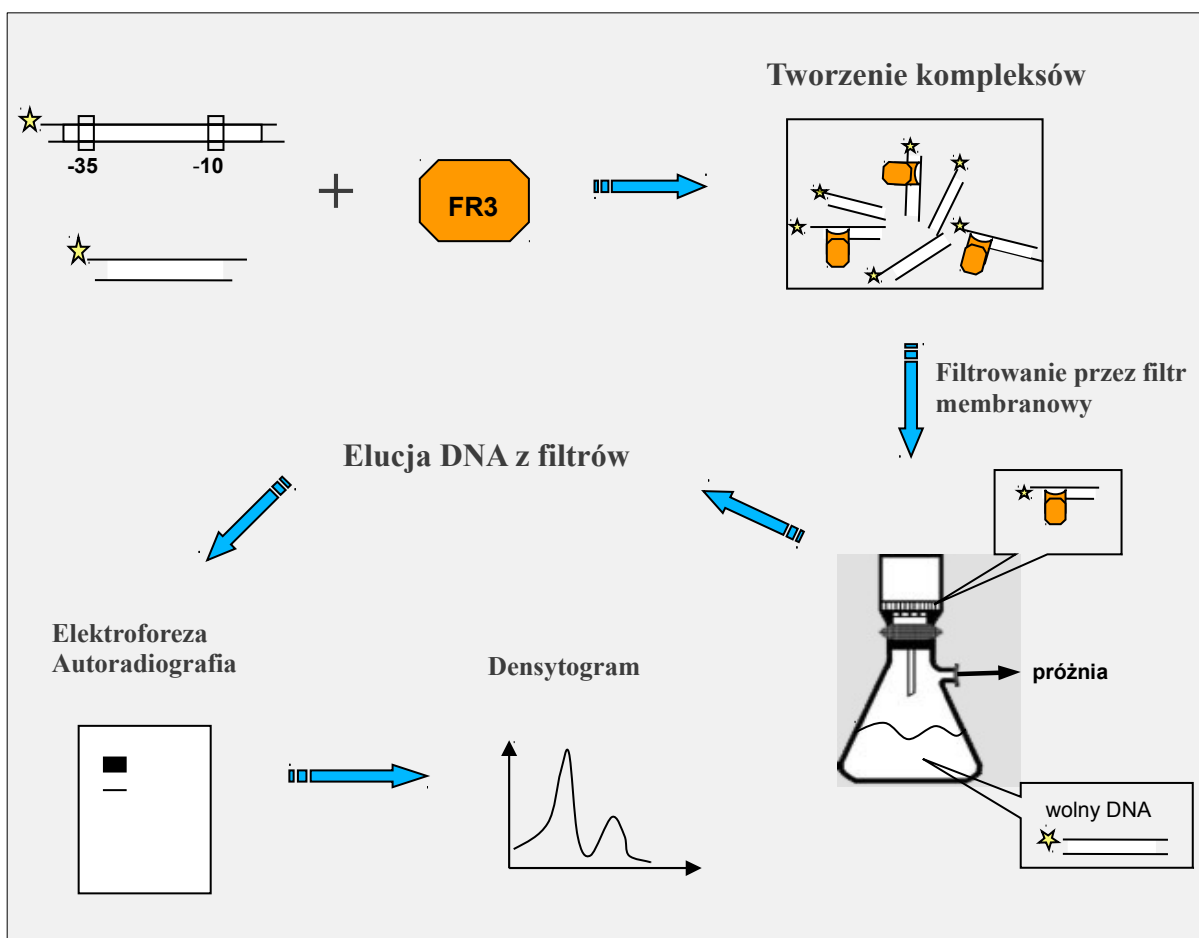
Ø



Ryc. 17 130 nukleotydowa sekwencja niematrixowej nici promotora A1 faga T7 z wyróżnionymi sekwencjami elementów -35 i -10 oraz miejsca startu transkrypcji. Sekwencja nici niematrixowej fragmentu Ø pozbawionego sekwencji promotorowej.

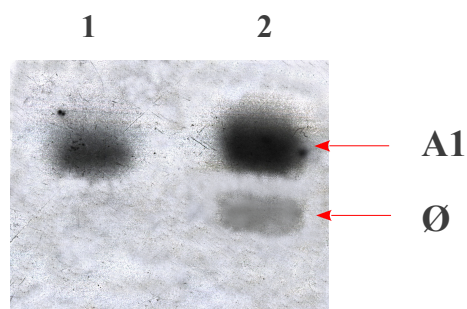
Fragment DNA zawierający promotor A1 bakteriofaga T7 uzyskiwano w reakcji PCR przy użyciu starterów PA1P i PA1L [Materiały 3.6.10, 3.6.11; Metody 4.1]. Jest to jeden z trzech wczesnych promotorów bakteriofaga T7 rozpoznawanych przez polimerazę RNA *E. coli*. Należy do najsilniejszych promotorów, a jego sekwencje -10 i -35 tylko nieznacznie różnią się od konsensusowych. Fragment DNA Ø uzyskiwano w reakcji PCR przy użyciu starterów PA1P i TBL (starter wykorzystany w pracy doktorskiej K. Tureckiej /216/, w celu otrzymania sekwencji promotora A1, pozbawionego jednak sekwencji konsensusowych -10 i -35) [Materiały 3.6.11, 3.6.12].

Na schemacie poniżej (Ryc. 18) przedstawiono ideę eksperymentu.



Ryc. 18 Schemat wykonywania testu kompetycyjnego.

Do reakcji tworzenia kompleksów binarnych w teście kompetycyjnym użyto fragmentów podjednostki sigma FR3 oraz fragmentów DNA znakowanych radioaktywnie na końcu 5' przy użyciu [γ - 32 P]ATP i kinazy polinukleotydowej faga T4. Radioaktywne DNA uzyskano stosując znakowane radioaktywnie startery do reakcji PCR. Mieszaninę DNA i białka FR3 inkubowano przez 20 minut w 37°C, a następnie sączono przez filtr membranowy z nitrocelulozy. Z kompleksu białko FR3-DNA zatrzymanego na filtrze odzyskiwano i wytrącano DNA. Dzięki temu, że oba fragmenty różniły się długością można było rozdzielić je w żelu poliakrylamidowych i wykonać pomiar ilościowy na podstawie stopnia zaczernienia kliszy przez znakowane fragmenty DNA. DNA zawierające promotor A1 ma długość 130 pz, DNA nie zawierające elementów promotora było o 49 pz krótsze (Fot. 17).

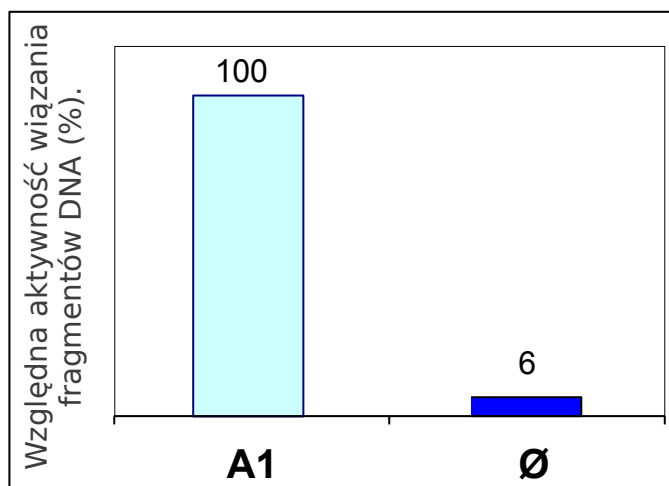


Fot. 17 Autoradiografia fragmentów DNA wyeluowanych z kompleksów z białkiem FR3 zatrzymanych na filtrach membranowych i poddanych elektroforezie poliakrylamidowej. Promotorowe DNA znakowano radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej.

Ścieżka 1 – DNA zawierające promotor A1 – marker masowy

Ścieżka 2 – DNA wyeluowane z kompleksu z białkiem FR3. Do przygotowania kompleksów użyto mieszaniny DNA zawierającej promotor A1 i fragmentu DNA Ø pozbawiony sekwencji promotorowej

Z zestawienia przedstawionego na rycinie 19 wynika, że białko FR3 preferencyjnie łączyło się z fragmentem DNA zawierającym sekwencję promotorową i tworzyło w ten sposób dominującą część powstającego kompleksu. DNA nie zawierające sekwencji promotorowych występowało w kompleksie tylko w ilości 6% w stosunku do promotorowego DNA.



Ryc. 19 Względna aktywność wiązania DNA przez fragment FR3 podjednostki sigma.

A1 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7, Ø – fragment DNA nie zawierający heksamerów -10 i -35.

Świadczy to o tym, że natywne białko FR3 w procesie renaturacji przybrało prawidłową konformację przestrzenną i było aktywne w teście specyficznego wiązania promotorowego DNA. Bardzo słabe wiązanie fragmentu pozbawionego sekwencji promotorowej (6%) może być miarą niespecyficznego oddziaływań DNA z fragmentem podjednostki sigma. Opisany test pozwala stwierdzić, że zastosowana procedura renaturacji białka w procesie dializy w buforze do rekonstrukcji, a następnie zateżanie białka poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa na NiNTA agarozie i ultrafiltracji z wykorzystaniem zestawu Microcon (Milipore), pozwala uzyskać natywne i aktywne w teście wiązania DNA fragmenty podjednostki sigma. Można sądzić, że również pozostałe fragmenty podjednostki sigma otrzymane z wykorzystaniem tej samej procedury uzyskały prawidłową konformację.

5.3.2 Badanie oddziaływań fragmentów podjednostki σ^{70} z rdzeniem polimerazy RNA i promotorowym DNA – reakcja tworzenia kompleksów binarnych

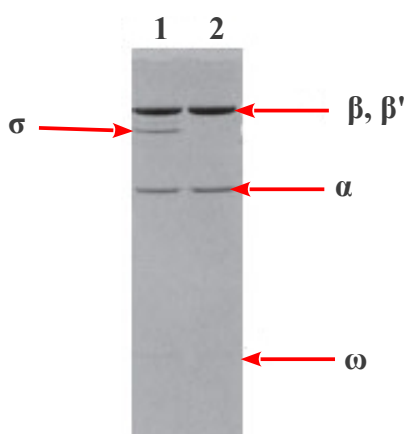
Eksperymenty z użyciem filtrów membranowych pozwalają sądzić, że procedura izolacji i oczyszczania, a następnie renaturacji białka umożliwia uzyskanie aktywnych fragmentów podjednostki sigma zdolnych do specyficznego rozpoznania promotora. Jednak właściwym testem funkcjonalnej, transkrypcyjnej kompetencji jest analiza ich zdolności do związania z rdzeniem polimerazy RNA, a następnie do specyficznego rozpoznania sekwencji promotorowej i tworzenia kompleksów binarnych. Uzyskanie takich kompleksów stanowi niezbędny warunek, który musi być spełniony, aby następnie można było ocenić aktywność fragmentów podjednostki sigma w kolejnych etapach procesu transkrypcji.

Jedną z ważniejszych metod analizy oddziaływań białek z kwasami nukleinowymi jest metoda opóźnienia migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym (ang. *gel retardation*). Kompleks białka z DNA wykazuje mniejszą ruchliwość elektroforetyczną w stosunku do DNA nie związanego w kompleksie. Metoda ta umożliwia zarówno jakościową ocenę kompleksów jak i analizy ilościowe w oparciu o ocenę ilości DNA wolnego i związanego w kompleksie. W tym celu próbki poddaje się elektroforezie poliakrylamidowej w warunkach niedenaturujących, a żele wybarwia bromkiem etydydy albo, w przypadku stosowania radioaktywnego izotopu do znakowania DNA, eksponuje się

na kliszy rentgenowskiej. Ten drugi sposób umożliwia obserwację i analizę kompleksów, w których zostały związane zaledwie pikogramowe ilości DNA. W związku z tym, że wyznakowane zostaje tylko DNA, preparaty białkowe nie muszą odznaczać się wysokim stopniem czystości, można też analizować złożone mieszaniny białek. Dodatkowo w żelu poliakrylamidowym można osiągnąć bardzo dużą rozdzielczość umożliwiającą szczegółową analizę kompleksów.

W reakcjach tworzenia kompleksów binarnych holoenzymu zawierającego fragmenty podjednostki sigma jako wzorca używano holoenzymu „typu dzikiego”, który zawiera niezmodyfikowaną podjednostkę sigma. Preparaty holoenzymu osiągają maksymalną efektywność wiązania promotorowego DNA dopiero po odpowiednim wysyceniu rdzenia podjednostką sigma. Aby to osiągnąć do mieszaniny dodawano stechiometrycznego nadmiaru tej podjednostki. Odpowiedni stosunek molowy rdzenia do podjednostki sigma w mieszaninie powinien wynosić 1:3 [92], wtedy największa ilość DNA w próbce zostanie związana w kompleksie. W przypadku zmodyfikowanej podjednostki sigma ta dysproporcja może być znacznie większa, a otrzymane kompleksy mogą znacznie różnić się ilościowo i jakościowo od kompleksów binarnych tworzonych z udziałem holoenzymu typu dzikiego.

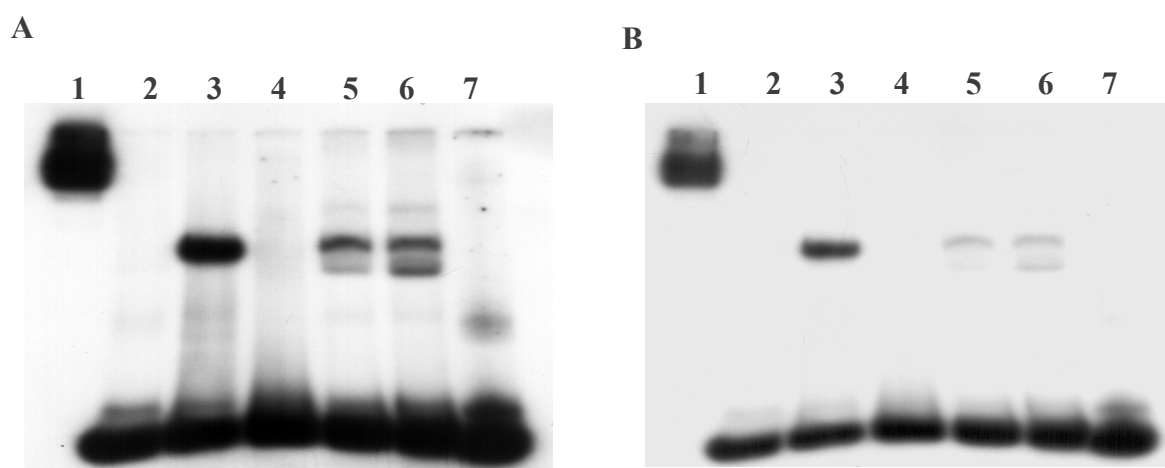
W większości eksperymentów wykorzystywano gotowe, dostępne komercyjnie preparaty rdzenia i holoenzymu firmy EPICENTRE® (USA) (Fot. 18).



Fot. 18 Analiza elektroforetyczna preparatów rdzenia i holoenzymu polimerazy RNA firmy EPICENTRE
Ścieżka 1 – Holoenzym polimerazy RNA *E. coli*. Ścieżka 2 – Rdzeń polimerazy RNA *E. coli*
Elektroforezę prowadzono w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Żel barwiony Coomasse Brilliant Blue.

W metodzie opóźnienia migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym analizowane powinny być tylko specyficzne kompleksy holoenzymu, to znaczy takie w których polimeraza RNA związana jest z DNA tylko w miejscu sekwencji promotorowej. W procesie specyficznego rozpoznawania tej sekwencji uczestniczy podjednostka sigma. Polimeraza łączy się z DNA również w sposób niespecyficzny poza sekwencją promotora, wykazując silną tendencję do łączenia się z końcami fragmentu DNA. Dodatkowo w mieszaninie reakcyjnej występują wolne cząsteczki rdzenia, które wykazują bardzo niską specyficzność wiązania DNA oraz wolne molekuly podjednostki sigma, której dodaje się w nadmiarze. W przypadku „dzikiej” podjednostki sigma, jej wiązanie do DNA jest znikome ze względu na obecność domeny 1.1. Fragmenty podjednostki sigma pozbawione tej domeny będą łączyły się z DNA i to z wysokim stopniem specyficzności, jak wykazano w przypadku białka FR3. Celem prowadzonych doświadczeń było zbadanie zdolności fragmentów podjednostki sigma do łączenia się z rdzeniem w funkcjonalny holoenzym, dlatego też istotne było osłabienie oddziaływań niespecyficznych. Funkcję taką może pełnić analog DNA heparyna, polianion łączący się z podjednostką β' , który osłabia niespecyficzne oddziaływania polimerazy z DNA. Przy odpowiednim stężeniu heparyny można całkowicie wyeliminować oddziaływania DNA z rdzeniem polimerazy.

Kompleksy binarne uzyskiwane przy użyciu białka FR2 [Metody 4.20] tworzone były ze znacznie mniejszą wydajnością w porównaniu z kompleksami utworzonymi przez holoenzym typu dzikiego (Fot. 19 ścieżki 3, 5 i 6). Dlatego też ich analiza wymagała dłuższego czasu ekspozycji żelu na kliszy rentgenowskiej niż było to wymagane dla kompleksów z udziałem holoenzymu typu dzikiego.

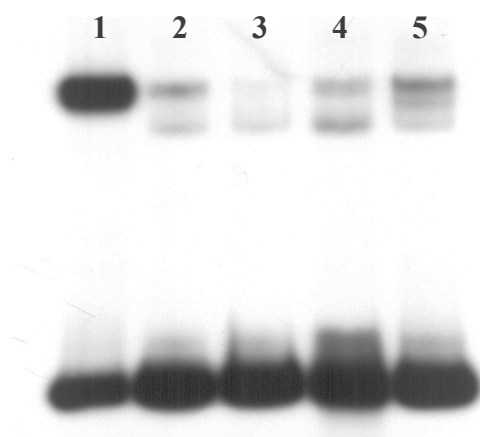


Fot. 19 Autoradiografia przedstawia analizę elektroforetyczną kompleksów binarnych dzikiego holoenzymu polimerazy RNA i holoenzymu zawierającego białko FR2 z promotorowym DNA znakowanym radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. **A i B** – fotografie dwóch klisz rentgenowskich o różnym czasie ekspozycji. **Ścieżki 1 i 2** - Kompleks rdzenia polimerazy RNA z DNA, **ścieżka 3** - kompleks holoenzymu typu dzikiego z promotorem A1, **ścieżka 4** – kompleks białka FR2 z promotorowym DNA, **ścieżka 5** – kompleks rdzenia polimerazy i białka **FR2** (3,5 μl) z promotorowym DNA, **ścieżka 6** – kompleks rdzenia polimerazy i białka **FR2** (8 μl) z promotorowym DNA. **Ścieżka 7** – wolne promotorowe DNA. Ścieżki 1 i 4 - kompleksy przygotowane bez dodatku heparyny, pozostałe z dodatkiem heparyny. W przypadku holoenzymu dzikiego typu użyto heparyny o końcowym stężeniu 1 mg/ml, w przypadku kompleksów rdzenia z białkiem FR2 – użyto heparyny o stężeniu wyjściowym około 0,1 mg/ml.

Na ścieżkach 5 i 6 widoczne są dwa prążki. Górny, bardziej intensywny, znajduje się na tej samej wysokości co wzorcowy kompleks binarny utworzony przez holoenzym typu dzikiego. Najprawdopodobniej jest to więc właściwy kompleks binarny. Dodatkowo, znacznie słabszy prążek, nie ma odpowiednika na ścieżce z holoenzymem typu dzikiego (ścieżka 3). Do reakcji tworzenia kompleksów z białkiem FR2 dodawana była heparyna, a więc obserwowane kompleksy, a zwłaszcza kompleksy znajdujące się w pozycji prążka górnego powinny być specyficzne. W reakcji kontrolnej, aby wykluczyć możliwość powstania w wyniku oddziaływania samego rdzenia z DNA obu obserwowanych na ścieżce 5 prążków – utworzono kompleksy DNA z rdzeniem bez i w obecności heparyny (odpowiednio ścieżki 1 i 2). Na ścieżce 1 widoczne są agregaty rdzenia z DNA, które w obecności heparyny ulegają rozpadowi (ścieżka 2). Samo białko FR2 też nie dawało wyraźnego kompleksu z DNA, nawet w reakcji bez dodatku heparyny (Fot. 19 ścieżka 4). Do tworzenia kompleksów binarnych holoenzymu zawierającego białko FR2 używano znacznego nadmiaru molowego fragmentu FR2 w stosunku do rdzenia w proporcji 8:1 (ścieżka 5). Mimo to kompleksy były dość słabe i pojawiał się dodatkowy dolny prążek.

Przy próbach poprawy jakości kompleksów przez zwiększenie ilości białka FR2 względem rdzenia w proporcji 16:1 (ścieżka 6), nie uzyskiwano zwiększenia intensywności górnego prążka, a wzmocnieniu ulegał prążek dolny.

Sądząc że kompleksy zawierające FR2 mogą być mniej stabilne niż zawierające natywną podjednostkę sigma typu dzikiego, w pierwszych reakcjach tworzenia kompleksów białka FR2 z rdzeniem i promotorowym DNA (Fot. 19 ścieżki 5 i 6), używano heparyny o stężeniu końcowym 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Zastosowano więc dziesięć razy większe stężenie heparyny, tak jak dla holoenzymu dzikiego typu. Nie spowodowało to jednak zmiany natężenia prążków odpowiadających kompleksom binarnym (porównaj Fot. 19 ścieżki 5 i 6 oraz Fot. 20 ścieżka 2).



Fot. 20 Autoradiografia przedstawiająca analizę elektroforetyczną kompleksów binarnych holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA i holoenzymu z białkami FR2 i FR3 z promotorowym DNA znakowanym radioaktywnie ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących.

Ścieżka 1 – kompleks holoenzymu typu dzikiego z promotorem A1

Ścieżka 2 – kompleks holoenzymu z białkiem **FR2** (3,5 μl)

Ścieżka 3 – kompleks holoenzymu z białka **FR3** (5,3 μl)

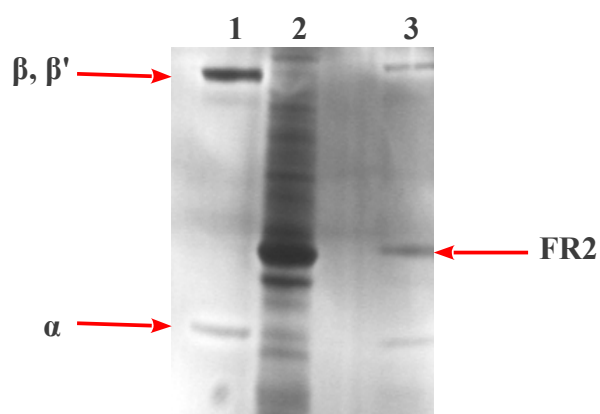
Ścieżka 4 – kompleks rdzenia polimerazy RNA i białek **FR2** i **FR3** z promotorowym DNA

Ścieżka 5 – kompleks holoenzymu i białka FR2 z promotorowym DNA (rdzeń otrzymany przez dr hab. Władysława Werela w Instytucie Maxa Plancka fuer Biochemie w Martinsried). W reakcjach użyto heparyny o stężeniu końcowym około 1mg/ml.

Stabilność wobec heparyny otrzymanych kompleksów holoenzymu zawierającego fragmenty podjednostki sigma FR2 lub FR3 z promotorowym DNA oraz położenie prążka górnego identyczne z lokalizacją kompleksów holoenzymu typu dzikiego z promotorem A1 pozwalają sądzić, że są to kompleksy specyficzne. Powstają jednak z

mniejszą wydajnością niż kompleksy zawierające holoenzym typu dzikiego. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest słabsze oddziaływanie fragmentu podjednostki sigma z rdzeniem. Na wiązanie to składa się szereg różnego rodzaju oddziaływań aminokwasów podjednostki sigma z odpowiednimi aminokwasami podjednostek tworzącymi rdzeń polimerazy.

Aby wykazać, że górny prążek istotnie zawiera holoenzym w którym znajduje się fragment podjednostki sigma, wyeluowano ten kompleks z żelu niedenaturującego, a białkowe składniki w nim zawarte rozdzielono w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Na fotografii 21 przedstawiono efekt tego eksperymentu, z którego wynika jednoznacznie, że analizowany kompleks binarny istotnie zawierał rdzeń polimerazy RNA i fragment FR2 podjednostki sigma.



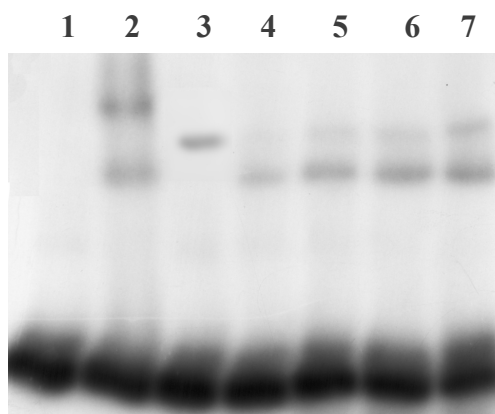
Fot. 21 Analiza elektroforetyczna w 12,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących białek wyizolowanych z kompleksu binarnego – kompleksu DNA z holoenzymem zawierającym fragment FR2 (Fot. 19 ścieżka 5 i 6 prążek górny) Żele barwiono azotanem srebra.

Ścieżka 1 – rdzeń polimerazy RNA

Ścieżka 2 – białko FR2

Ścieżka 3 – białka otrzymane z kompleksu binarnego rdzenia polimerazy RNA i białka FR2.

Białko FR3 zawierające domenę 3 i 4 dzięki podjednostki sigma tworzy z rdzeniem i DNA (Fot. 20, 22 i 23) dwie formy kompleksu podobnie jak w przypadku białka FR2.



Fot. 22 Analiza elektroforetyczna kompleksów holoenzymu typu dzikiego oraz holoenzymu zawierającego białko FR3 z promotorowym DNA znakowanym radioaktywnie ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących.

Ścieżki 1 i 2 kompleks rdzenia z DNA

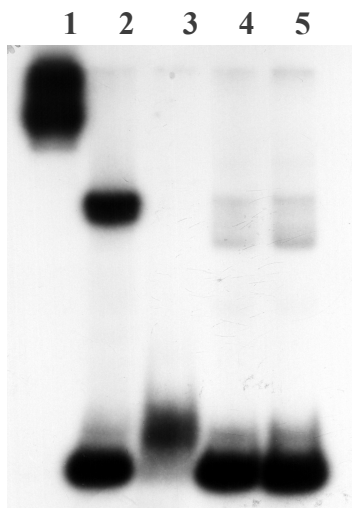
Ścieżka 3 – Kompleks holoenzymu typu dzikiego z DNA

Ścieżki 4-7 Kompleksy rdzenia ze wzrastającą ilością białka FR3.

Ścieżki 1 i 3-7 reakcje w obecności heparyny o stężeniu końcowym 1 mg/ml.

Przy czym, odwrotnie niż to miało miejsce w przypadku białka FR2, to górny prążek odpowiadający holoenzymowi typu dzikiego (Fot. 22, ścieżki 3 – 7) był znacznie słabszy od prążka dolnego. Próby miareczkowania rdzenia białkiem FR3 dawały jedynie niewielkie wzmocnienie właściwego kompleksu binarnego. Dopiero przy ogromnym nadmiarze stechiometrycznym fragmentu podjednostki σ w stosunku do rdzenia (20:1) pojawiał się wyraźnie wyodrębniony prążek. Kompleks dolny, podobnie jak przy białku FR2 nie znikał, lecz ulegał wzmocnieniu. Dolny prążek znajdował się dokładnie na wysokości jednej z form kompleksu samego rdzenia z promotorowym DNA (Fot. 22, ścieżka 2), który jednak po dodaniu heparyny całkowicie się rozpadał (ścieżka 1). Z kolei duży nadmiar heparyny nie rozbijał żadnej z form kompleksów rdzenia z białkiem FR3. Analogiczne wyniki tworzenia kompleksów binarnych uzyskano dla białek FR4 i FR5. Kompleksy te powstawały jednak z tak niską wydajnością, że ich rejestracja nawet za pomocą autoradiografii stawała się problematyczna i nie nadawały się do dalszych analiz.

Fotografia 23 dostarcza dodatkowych argumentów odnośnie siły oddziaływania wolnych fragmentów podjednostki sigma z promotorowym DNA.



Fot. 23 Analiza elektroforetyczna kompleksów holoenzymu typu dzikiego oraz rdzenia polimerazy RNA i białka FR3 z promotorowym DNA znakowanym radioaktywnie ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach nienaturujących.

Ścieżka 1 – Kompleks rdzenia polimerazy RNA z promotorowym DNA

Ścieżka 2 – kompleks holoenzymu typu dzikiego z promotorowym DNA

Ścieżka 3 – kompleks białka **FR3** z promotorowym DNA

Ścieżki 4 i 5 – kompleks rdzenia polimerazy i białka **FR3** z promotorowym DNA.

Ścieżki 1 i 3 - reakcje bez dodatku heparyny, w pozostałych do kompleksów widocznych w ścieżkach 4 i 5 dodano heparyny o stężeniu końcowym 0,1mg/ml. W przypadku holoenzymu typu dzikiego użyto heparyny o stężeniu końcowym 1 mg/ml.

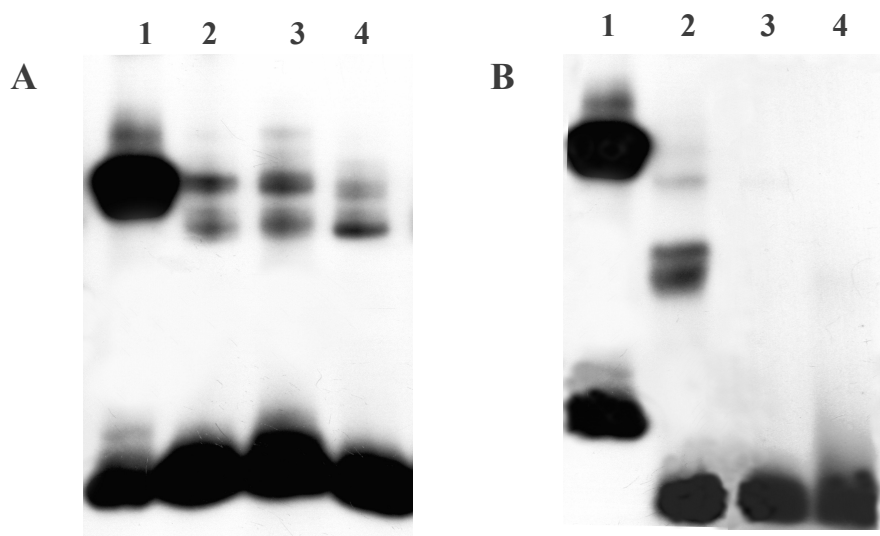
Na ścieżce 3 (Fot. 23) przedstawiono dowód, że oddziaływanie fragmentu FR3 z promotorowym DNA jest na tyle silne, że powstający kompleks nie rozpada się w czasie około czterogodzinnej elektroforezy w żelach natywnych. W tych samych warunkach kompleks fragmentu FR2 z promotorowym DNA (Fot. 19 – ścieżka 4) całkowicie ulega dysocjacji. Wyniki analizy stabilności tych kompleksów w czasie elektroforezy potwierdzają wstępne doświadczenia z retencją tych fragmentów na filtrach membranowych (Fot. 16). Wyniki przedstawione na fotografii 23 świadczą również jednoznacznie, że prążków górnych i dolnych kompleksów binarnych utworzonych przez rekonstruowany holoenzym – rdzeń + fragment FR3, nie można wiązać z kompleksem samego fragmentu FR3 z promotorem.

Z analizy poświęconej kompleksom binarnym utworzonym przez holoenzym zawierający obok rdzenia fragment FR2 lub FR3 (które tworzą dwa rodzaje kompleksów różniących się ruchliwością elektroforetyczną) wynika, że mniej mobilny kompleks (górny prążek, Fot. 19 - ścieżki 5 i 6, Fot. 20, 22 i 23) jest najprawdopodobniej właściwym kompleksem transkrypcyjnym. Weryfikację takiego wniosku mogłoby stanowić wykazanie, że kompleks ten jest w stanie specyficznie rozpoznawać sekwencję promotorową. Informację taką można uzyskać stosując odpowiednio zmodyfikowane promotorowe DNA. W tym celu skonstruowano dwa fragmenty promotorowe różniące się od promotora typu dzikiego całkowicie zmienioną sekwencją -35 (fragment A1₍₋₃₅₎) lub sekwencją -10 (A1₍₋₁₀₎).

	-35	-10	+1
A1	AGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTATAG	GATACTTACAGCCATCG	
	TC TCATAACTGAATT TCAGATTGGATATC	CTATGAATGTCGGTAGC	
A1₍₋₁₀₎	AGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTATAG	ACAGAGATC TGCCATCG	
	TCT CA TAACTGAATT TCAGATTGGATATC	TGTCTC TAG ACGGTAGC	
A1₍₋₃₅₎	AGAGTAGAATTC TAAAGTCTAACCTAATAG	GATACTTACAGCCATCG	
	TCTCAT CTTAAGA TTTCAGATTGGATTATC	CTATGA ATGTCGGTAGC	

Ryc. 20 Sekwencja fragmentów DNA zawierających oryginalną sekwencję promotora A1, oraz dwóch fragmentów DNA zawierających zmodyfikowany heksamer -10 (fragment A1₍₋₁₀₎) lub zmieniony heksamer -35 (fragment A1₍₋₃₅₎). Miejsce startu transkrypcji +1 zaznaczono kolorem pomarańczowym.

Na fotografii 24 przedstawiono analizę elektroforetyczną kompleksów holoenzymu zawierającego fragment FR2 podjednostki sigma (HoloFR2) z promotorem A1 typu dzikiego i zmodyfikowanymi promotorami zawierającymi zmienioną sekwencję -10 lub -35.



Fot. 24 A Analiza elektroforetyczna kompleksów holoenzymu typu dzikiego oraz holoenzymu zawierającego białko FR2 z promotorowym DNA znakowanym radioaktywnie ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej.

Ścieżka 1 – kompleks holoenzymu typu dzikiego z nie zmienionym promotorem A1

Ścieżka 2 – kompleksy holoenzymu zawierającego białko FR2 z nie zmienionym promotorem A1

Ścieżka 3 – kompleksy holoenzymu zawierającego białko FR2 z promotorem A1 ze zmienioną sekwencją elementu -35, A1_(Δ-35)

Ścieżka 4 – kompleksy rdzenia i białka FR2 z promotorem A1 ze zmienioną sekwencją elementu -10,

A1_(Δ-10). Do kompleksów widocznych na ścieżkach 2 – 5 dodano heparyny o końcowym stężeniu około 1mg/ml, na ścieżce 1- 0,1mg/ml

Fot. 24 B Analiza elektroforetyczna kompleksów holoenzymu typu dzikiego, białko FR2 oraz holoenzym zawierający białko FR2 z oligonukleotydem (oligo1) stanowiącym fragment nici niematrzykowej znakowanym radioaktywnie ^{32}P na końcu 5'.

Ścieżka 1 – kompleks holoenzymu typu dzikiego z nie zmienionym promotorem A1

Ścieżka 2 – kompleksy holoenzymu typu dzikiego z oligonukleotydem stanowiącym fragment nici niematrzykowej,

Ścieżka 3 – kompleksy holoenzymu zawierające białko FR2 z oligo1

Ścieżka 4 – kompleksy białka FR2 z oligo1

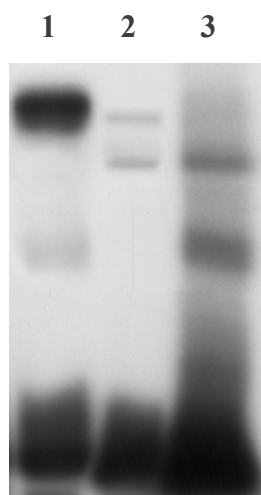
Do kompleksów widocznych na ścieżce 1 dodano heparyny o końcowym stężeniu około 0,1mg/ml, do pozostałych kompleksów nie dodano heparyny.

Elektroforezę prowadzono w 3,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących.

Z fotografii wynika, że rozkład natężenia prążków górnego i dolnego dla fragmentów promotorowych A1 i A1_(Δ-35) (żel 24A, ścieżki 2 i 3) jest zbliżony. Radykalnie zmienia się natomiast intensywność prążków w przypadku kompleksu HoloFR2 z sekwencją promotorową pozbawioną heksameru -10 (A1_(Δ-10)) (ścieżka 4). Bardzo znacząco zmalało natężenie prążka górnego, wzrosło natomiast natężenie dolnego prążka.

Interpretując wyniki tych doświadczeń należy zauważyć, że białko FR2 zawiera domenę 2.4 dzięki podjednostki σ^{70} odpowiedzialną za specyficzne rozpoznanie sekwencji -10 promotora, nie posiada zaś domeny 4.2 odpowiedzialnej za rozpoznanie sekwencji -35. Razem z rdzeniem polimerazy RNA tworzy holoenzym, który specyficznie rozpoznaje odpowiedni dla niego element promotora – heksamer -10. Zrozumiałe jest, że jeśli użyje się sekwencji promotorowej pozbawionej heksameru -10 to HoloFR2 nie może utworzyć specyficznego kompleksu z promotorem. Osłabieniu zatem powinien ulec prążek odpowiadający specyficznemu kompleksowi binarnemu (prążek górny, Fot. 24 A – ścieżka 4). Kompleksy przedstawione na ścieżkach 2 i 3 fotografii 24 nie wykazują różnic ponieważ obie sekwencje promotorowe A1 i A1₍₄₋₃₅₎ zawierają nie zmieniony heksamer -10.

Podobny efekt można zaobserwować w przypadku białka FR3 które zawiera domenę 4.2 odpowiedzialną za rozpoznanie sekwencji -35 promotora. Kompleks rdzenia z fragmentem FR3 (HoloFR3) w reakcji z promotorem A1₍₄₋₃₅₎ daje w żelu jedynie dolny prążek zawierający kompleks niespecyficzny, całkowicie pozbawiony jest natomiast prążka górnego (Fot. 25 ścieżka 3).



Fot. 25 Autoradiografia przedstawia analizę elektroforetyczną kompleksów holoenzymu typu dzikiego oraz holoenzymu zawierającego białko FR3 z promotorem DNA znakowanym radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej.

Ścieżka 1 – kompleks holoenzymu typu dzikiego z promotorem A1

Ścieżki 2 – kompleks holoenzymu zawierającego białko FR3 z nie zmienionym promotorem A1

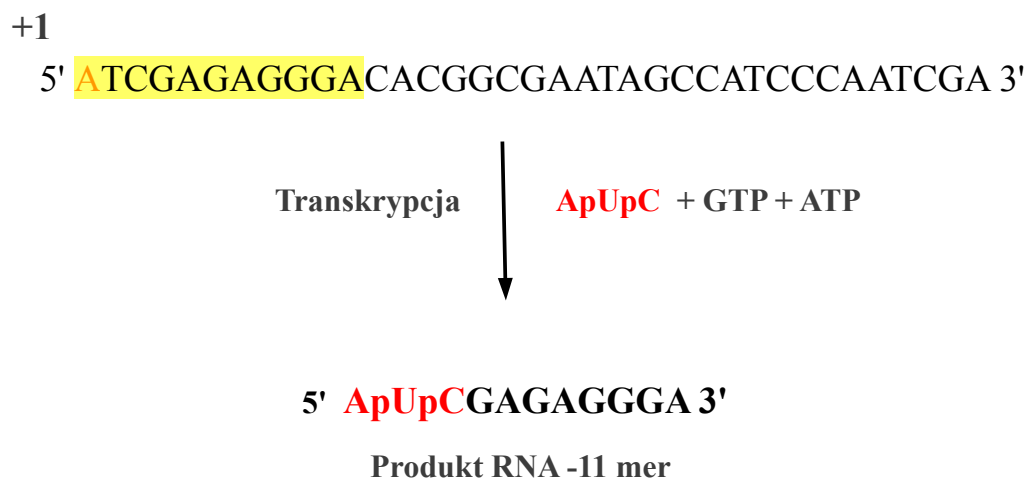
Ścieżka 3 – kompleks holoenzymu zawierającego białko FR3 z promotorem pozbawionym sekwencji -35 - A1₍₄₋₃₅₎. Do wszystkich reakcji użyto heparyny o stężeniu końcowym 1 mg/ml. Elektroforezę prowadzono w 3,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących.

Fotografia 24B pozwala stwierdzić, że zarówno wolny fragment FR2 podjednostki sigma jak i fragment FR2 w strukturze holoenzymu, w przeciwieństwie do holoenzymu typu dzikiego nie są w stanie związać oligonukleotydu zawierającego sekwencję nici niematrixowej (oligo1).

5.3.3 Transkrypcja *in vitro*

Kolejnym testem wyjaśniającym naturę uzyskanych kompleksów holoenzymu z udziałem białek FR2 i FR3 może być reakcja przekształcenia kompleksów binarnych w kompleksy potrójne, a więc próba przejścia do produktywnej fazy transkrypcji.

Aby stwierdzić, czy holoenzym zawierający fragmenty podjednostki sigma jest zdolny do zainicjowania syntezy RNA wykonano transkrypcję w warunkach limitowania substratów na matrycy promotora A1 bakteriofaga T7. Po dodaniu do kompleksu binarnego krótkiego starterowego fragmentu RNA ApUpC i tylko dwóch nukleotydów ATP i GTP, jak wynika z sekwencji promotorowego DNA, w reakcji transkrypcji powinien powstać produkt RNA o długości 11 nukleotydów (11- mer, Ryc. 21).

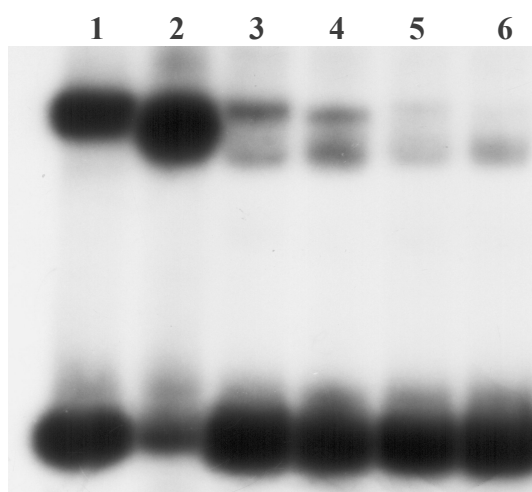


Ryc. 21 Schemat reakcji transkrypcji w warunkach limitowania substratów. Sekwencja nici niematrixowej promotora A1 z zaznaczonym miejscem startu transkrypcji +1 i z zaznaczonym na żółto regionem podlegającym limitowanej transkrypcji oraz powstający transkrypt.

Dodanie pozostałych dwóch nukleotydów UTP i CTP spowodowało by powstanie transkryptu pełnej długości (ang. *run off*), rozpad większości kompleksów

potrójnych i uwolnienie transkryptu. Limitowana transkrypcja w obecności ApUpC, ATP, GTP pozwala zatrzymać transkrypcję na etapie 11-meru i na ilościową analizę transformacji kompleksów binarnych w transkrybujące kompleksy potrójne. Analizy takie są możliwe dlatego, że powstaniu stabilnego kompleksu elongacyjnego towarzyszy uwolnienie podjednostki sigma z kompleksu i zmiana jego ruchliwości elektroforetycznej. Drugą przyczyną wpływającą na ruchliwość elektroforetyczną kompleksów transkrybujących może być dodatkowy ładunek ujemny związany z obecnością krótkiego transkryptu (11-mer). Te dwa elementy powodują, że kompleksy potrójne podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym migrują szybciej niż kompleksy podwójne (Fot. 26 i 27 - ścieżki 1 i 2).

Pierwsze reakcje transkrypcji *in vitro* przeprowadzano z kompleksami binarnymi utworzonymi z radioaktywnie znakowanym promotorem A1 i holoenzymem zawierającym fragmenty FR2 lub FR3 (Fot. 26)

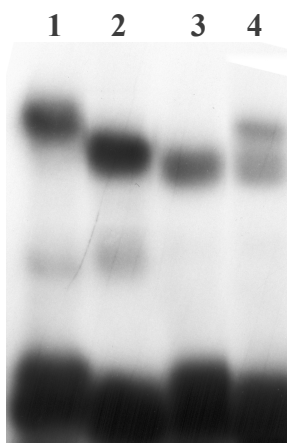


Fot. 26 Autoradiografia przedstawia analizę elektroforetyczną kompleksów binarnych i potrójnych holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA i holoenzymu utworzonego odpowiednio z białkami FR2 i FR3 z promotorowym DNA. Fragment DNA znakowano radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. Do wszystkich reakcji dodano heparyny o końcowym stężeniu około 1 mg/ml. :
Ścieżka 1 – kompleks binarny holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA
Ścieżka 2 – kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA
Ścieżka 3 – kompleks binarny holoenzymu zawierającego białko FR2
Ścieżka 4 – kompleks potrójny holoenzymu zawierającego białko FR2
Ścieżka 5 – kompleks binarny holoenzymu zawierającego białko FR3
Ścieżka 6 – kompleks potrójny holoenzymu zawierającego białko FR3.

Porównanie intensywności prążków kompleksów w ścieżkach 3 i 4 pozwala stwierdzić, że część kompleksów binarnych zwiększyła swoją ruchliwość

elektroforetyczną i znalazła się w pozycji dolnego kompleksu w ścieżce 3. Najprawdopodobniej więc są to kompleksy potrójne. W przypadku kompleksów binarnych zawierających rdzeń polimeazy RNA i białko FR3, obserwuje się całkowity zanik kompleksu binarnego i przekształcenie go w kompleks o zwiększonej ruchliwości elektroforetycznej lokujący się w pozycji dolnego prążka na ścieżce 5. Efekt ten w odniesieniu do holoenzymu zawierającego fragment FR3 jest jeszcze lepiej widoczny na fotografii 27. Silniejsze zaczerwienie kliszy (Fot. 26) w pozycji dolnego kompleksu na ścieżce 3 jest wynikiem zsumowania radioaktywności kompleksów elongacyjnych i kompleksów binarnych znajdujących się w pozycji dolnego prążka (ścieżka 4). Dodanie ApUpC i nukleotydów do holoenzymu utworzonego z białkiem FR2 nie powodowało przesunięcia wszystkich kompleksów binarnych w pozycję kompleksów potrójnych (Fot. 26, ścieżki 3 i 4). Prążek górny częściowo ulegał osłabieniu, a dolny wykazuje większą radioaktywność.

W przypadku kompleksów binarnych z białkiem FR3 dodanie substratów do transkrypcji powodowało, że zaczerwienie kliszy w pozycji prążka dolnego rosło, a prążek górny całkowicie zanikał (Fot. 26, ścieżki 5 i 6; Fot. 27, ścieżki 3 i 4).



Fot. 27 Autoradiografia przedstawia analizę elektroforetyczną kompleksów binarnych i potrójnych holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA i holoenzymu utworzonego z białkiem FR3 z promotorem A1 znakowanym radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

Ścieżka 1 – kompleks binarny holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA

Ścieżka 2 – kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA

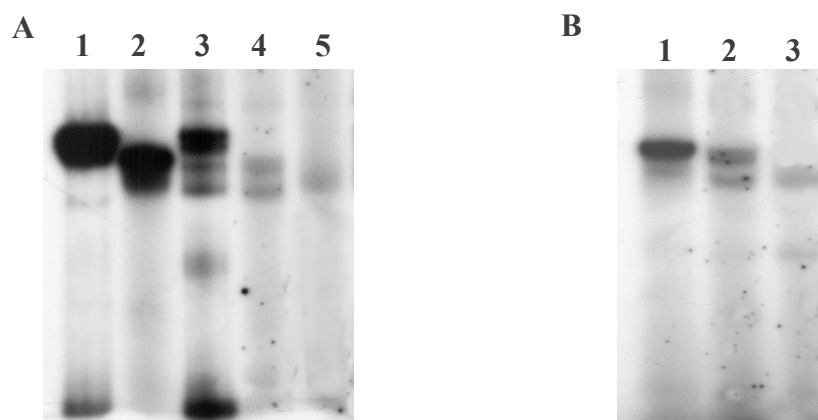
Ścieżka 3 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA utworzonego z białkiem FR3

Ścieżka 4 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA utworzonego z białkiem FR3

Do wszystkich reakcji dodano heparyny o końcowym stężeniu około 1 mg/ml.

Reakcje transkrypcji ze znakowanym radioaktywnie promotorowym DNA nie dają jednak jednoznacznej odpowiedzi czy kompleksy binarne uzyskane odpowiednio z białkiem FR2 lub FR3 są rzeczywiście zdolne do zainicjowania transkrypcji. W przypadku obu białek po dodaniu statera ApUpC i nukleotydów wzrastała radioaktywność w pozycji istniejących już wcześniej prążków dolnych zawierających kompleksy binarne. Nie można zatem wykluczyć, że w przypadku białka FR2, że przy próbie inicjacji transkrypcji część kompleksów, a w przypadku białka FR3 wszystkie kompleksy binarne zostają zablokowane w nieaktywnej transkrypcyjnie formie przejściowej. W tej sytuacji konieczne było wyznakowanie radioaktywnie transkryptu, ponieważ tylko powstanie RNA może być jednoznacznym dowodem na tworzenie aktywnych kompleksów potrójnych.

W pierwszej kolejności do reakcji transkrypcji wykorzystywano radioaktywnie znakowany starterowy ApUpC. Dzięki temu udało się zaobserwować powstanie kompleksów prawdopodobnie potrójnych przy udziale białka FR2 (Fot. 28 A, ścieżka 4; Fot. 28 B, ścieżka 2).



Fot. 28 Analiza elektroforetyczna kompleksów binarnych holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA i holoenzymu utworzonego z białkami FR2 i FR3 z promotorem A1 oraz kompleksy potrójne holoenzymu typu dzikiego i holoenzymu zawierającego białka FR2 lub FR3. Promotorowe DNA znakowano radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej, ApUpC znakowano na końcu 5' nici. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących.

A Ścieżka 1 – kompleks binarny holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA – znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 2 – kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA - znakowane radioaktywnie ApUpC

Ścieżka 3 – kompleks binarny holoenzymu utworzonego z białkiem FR2 - znakowany radioaktywnie DNA

Ścieżka 4 – kompleks potrójny holoenzymu utworzonego z białkiem FR2 - znakowane radioaktywnie ApUpC

Ścieżka 5 – kompleks potrójny holoenzymu utworzonego z białkiem FR3 - znakowane radioaktywnie ApUpC.

B Ścieżka 1 – kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego - znakowane radioaktywnie ApUpC

Ścieżka 2 – kompleks potrójny holoenzymu utworzonego z białkiem FR2 - znakowane radioaktywnie ApUpC

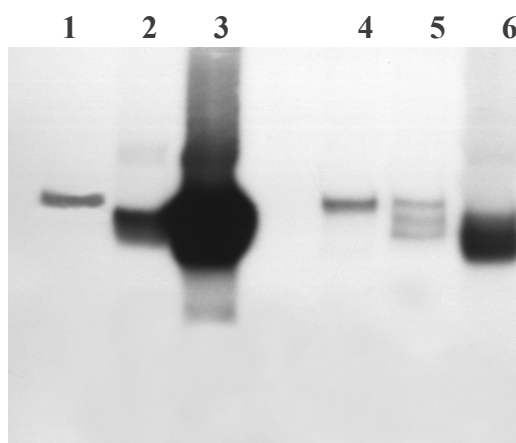
Ścieżka 3 – kompleks potrójny holoenzymu utworzonego z białkiem FR3 - znakowane radioaktywnie ApUpC

Do wszystkich reakcji dodano heparyny o końcowym stężeniu około 1 mg/ml.

Kompleksy te były bez porównania słabsze od kompleksów potrójnych dzięki polimerazy RNA (Fot. 28 A - ścieżka 2). Oprócz kompleksów potrójnych, które były tylko nieznacznie przesunięte względem kompleksu wzorcowego, na ścieżce 4 (Fot. 28A) i ścieżce 2 (Fot. 28 B) widoczny był dodatkowy prążek zlokalizowany niżej na poziomie niespecyficznego kompleksów binarnych (Fot. 28 A, ścieżki 3).

Nie udało się z kolei w przypadku białka FR3 zaobserwować prążka, który mógłby odpowiadać kompleksowi potrójnemu. Widoczne nieznaczne zaciemnienie kliszy na ścieżce 5 (Fot. 28 A) znajdowało się poniżej wzorcowego kompleksu potrójnego (Fot. 28 A - ścieżka 2, Fot. 28 B – ścieżka 1). W tym przypadku można było założyć, że kompleksy binarne utworzone z rdzenia, białka FR3 oraz promotora DNA nie były w stanie zainicjować transkrypcji. Po dodaniu substratów, nukleotydów i jonów magnezu kompleksy te ulegały rozpadowi.

Użycie znakowanego ApUpC umożliwiło wprowadzenie zaobserwowanie transkryptu, ale ponieważ radioaktywnie wyznakowany był tylko koniec 5' nowo syntetyzowanego RNA, a ilość kompleksów potrójnych, z wyjątkiem holoenzymu typu dzikiego, była niewielka, pozostawała pewna wątpliwość co do skuteczności transformacji kompleksów binarnych w potrójne. Nawet w przypadku kompleksów z białkiem FR2 prążki odpowiadające kompleksom potrójnym były stosunkowo słabe. Tym bardziej, że z małą wydajnością sam rdzeń polimerazy RNA łącząc się z sekwencją promotora w obecności substratów może zainicjować transkrypcję na bardzo niskim poziomie (Fot. 30, ścieżka 8). Dlatego też wykonano transkrypcję przy użyciu GTP znakowanego radioaktywnie w pozycji α [α ^{32}P GTP]. W powstającym 11-merze na matrycy promotora A1 nukleotyd ten wbudowywany zostanie aż w 5 pozycjach, dzięki temu transkrypt uzyska wysoki poziom radioaktywności. Doskonale można było to zaobserwować na przykładzie kompleksów potrójnych dzikiego holoenzymu porównując na fotografii 29 transkrypcję ze znakowanym matrycowym DNA ze ścieżki 2 z kompleksem potrójnym, w którym transkrypt znakowano radioaktywnie za pomocą GTP (ścieżka 3).



Fot. 29 Analiza elektroforetyczna kompleksów binarnych holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA i holoenzymu zawierającego białko FR2 z promotorem A1 znakowanym radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej oraz kompleksy potrójne holoenzymu typu dzikiego i utworzonego z białkiem FR2 z znakowanym radioaktywnym ^{32}P GTP w pozycji α lub z promotorem A1 znakowanym radioaktywnym ^{32}P na końcu 5'. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

Ścieżka 1 - kompleks binarny holoenzymu typu dzikiego - znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 2 - kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego - znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 3 - kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego - znakowane radioaktywnie GTP (transkrypt)

Ścieżka 4 - kompleks binarny holoenzymu utworzonego z białkiem FR2 - znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 5 - kompleks potrójny utworzonego z białkiem FR2 - znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 6 - kompleks potrójny utworzonego z białkiem FR2 - znakowane radioaktywnie GTP.

Do wszystkich reakcji dodano heparyny o końcowym stężeniu około 1 mg/ml.

Użycie do znakowania powstającego produktu RNA radioaktywnego GTP radykalnie zmienia intensywność prążka odpowiadającego kompleksom potrójnym utworzonym przez holoenzym zawierający fragment FR2 podjednostki σ^{70} (Fot. 29 - ścieżki 6, Fot. 30 ścieżki 6 i 7). Nie ulega też wątpliwości, że rekombinacyjny holoenzym zawierający fragment FR2 jest zdolny nie tylko do tworzenia specyficznych kompleksów binarnych lecz także do przejścia do produktywnej fazy transkrypcji.

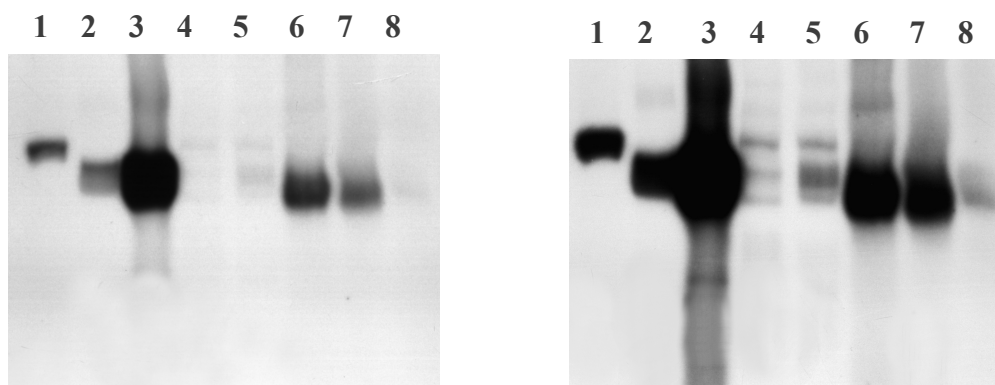
Analiza położenia prążków w ścieżkach 4, 5 i 6 (Fot. 29) oraz 4, 5 i 6 (Fot. 30) wskazuje ponadto, że potrójny kompleks transkrybujący znajduje się dokładnie w pozycji odpowiadającej najniżej zlokalizowanemu prążkowi utworzonemu przez kompleksy binarne holoenzymu rekombinacyjnego zawierającego FR2.

W reakcji transkrypcji z kompleksami potrójnymi białka FR2 i wyznakowanym radioaktywnie matrycowym DNA A1 (Fot. 29, ścieżka 5) nadal widoczne były dwa kompleksy obserwowane we wcześniejszych doświadczeniach. Górny prążek

lokalizował się na wysokości kompleksu binarnego (ścieżka 4) i tak jak poprzednio dolny prążek znajdował się w przybliżeniu w pozycji wzorcowego kompleksu potrójnego (ścieżka 3 i 5). W tym doświadczeniu pojawiał się pomiędzy nimi dodatkowy trzeci prążek, którego wcześniej nie obserwowano.

Wynik uzyskany w reakcji transkrypcji z wyznakowanym radioaktywnie jednym z substratów ($\alpha^{32}\text{P}$ GTP) nie budził już żadnych wątpliwości (Fot. 29, ścieżka 6), otrzymywany prążek znajdował się dokładnie na poziomie wzorcowego kompleksu potrójnego (ścieżka 3). Ilość uzyskiwanego produktu była też znacznie większa niż przy reakcji transkrypcji prowadzonej z samym rdzeniem bez fragmentu FR2 podjednostki sigma (Fot. 29, ścieżka 8). Próba ta określa ilość produktu transkrypcji powstającego w sposób niespecyficzny, który stanowi tło właściwej reakcji.

W reakcjach transkrypcji, które ilustruje fotografia 29, heparyny dodawano już po reakcji transkrypcji. Oznacza to, że nawet kompleksy niespecyficzne pochodzące od rdzenia miały szansę zainicjować transkrypcję. Kompleksy potrójne są znacznie bardziej stabilne i mniej podatne na działanie heparyny. W celu pokazania jaki poziom transkrypcji w przypadku badanego białka FR2 powstaje w sposób niespecyficzny wykonano reakcję transkrypcji w której heparyny dodawano już na etapie tworzenia kompleksów binarnych (Fot. 30, ścieżka 7). Ilość uzyskiwanych kompleksów była nieco mniejsza niż w sytuacji, kiedy heparyny dodawano dopiero po reakcji transkrypcji (ścieżka 6), jednak kompleksy potrójne pochodzące od samego rdzenia, które przetrwały działanie heparyny stanowiły tylko znikomy ich ułamek (ścieżka 8).



Fot. 30 Autoradiografia przedstawia analizę elektroforetyczną kompleksów binarnych holoenzymu typu dzikiego polimerazy RNA i holoenzymu utworzonego białkiem FR2 z promotorem A1 znakowanym radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej oraz kompleksy potrójne dzikiego holoenzymu i utworzonego z białkiem FR2 ze znakowanym radioaktywnym ^{32}P GTP w pozycji α , lub z promotorem A1 znakowanym radioaktywnym ^{32}P na końcu 5'. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących:

Ścieżka 1 – kompleks binarny holoenzymu typu dzikiego - znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 2 – kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego - znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 3 – kompleks potrójny holoenzymu typu dzikiego - znakowane radioaktywnie GTP

Ścieżka 4 – kompleks binarny holoenzymu utworzonego z białkiem FR2, znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 5 – kompleks potrójny holoenzymu utworzonego z białkiem FR2 - znakowane radioaktywnie DNA

Ścieżka 6 – kompleks potrójny holoenzymu utworzonego z białkiem FR2, znakowane radioaktywnie GTP

Ścieżka 7 – kompleks potrójny holoenzymu z białkiem FR2 - znakowane radioaktywnie GTP

Ścieżka 8 – kompleks potrójny rdzenia polimerazy RNA - znakowane radioaktywnie GTP.

Do wszystkich reakcji dodano heparyny o końcowym stężeniu 1 mg/ml, przy czym do próby widocznej na ścieżce 6 heparyny po reakcji transkrypcji, w pozostałych na etapie tworzenia kompleksów binarnych.

6. Dyskusja

W procesie inicjacji transkrypcji podjednostka sigma odgrywa kluczową rolę, i chociaż zarówno rdzeń jak i holoenzym polimerazy RNA mogą łączyć się niespecyficznie z DNA, to jednak tylko holoenzym jest zdolny do specyficznego rozpoznawania promotora. Za tą własność holoenzymu odpowiada podjednostka sigma. Niespecyficzne oddziaływanie enzymu z DNA są jednak również istotne dla funkcjonowania aparatu transkrypcyjnego ponieważ są niezbędne do zlokalizowania promotora w przestrzeni trójwymiarowej w przedinicjacyjnej fazie transkrypcji /219/. Kluczowa rola podjednostki sigma w wiązaniu się holoenzymu z promotorem wynika z faktu, że tylko podjednostka sigma, dzięki swoim silnie konserwowanym ewolucyjnie domenom 2 i 4, jest w stanie rozpoznać konsensusowe sekwencje heksamerów -10 i -35 promotora.

Kolejna funkcja, którą w części można by było przypisać podjednostce sigma ma związek ze zmianami topologicznymi i rozplataniem komplementarnych nici DNA. W modelu, który zaproponowali Helmann i DeHaseth /43/ polimeraza RNA wiążąc się z heksamerami promotora, które rzutowane na powierzchnię cylindra są skrócone o kąt 68° , powoduje deformację DNA i zmianę wzajemnej orientacji tych sekwencji. Naprężenia w DNA zostają użyte do otwierania DNA w regionie heksameru -10, a podjednostka sigma bierze udział w stabilizacji otwartej pętli transkrypcyjnej (aromatyczne aminokwasy domen 2,3-2,4 oddziałują z zasadami w pozycjach -9, -10, -11 i -12 jednoniciowego fragmentu niematrixowej nici DNA) /112, 142/.

Hernandez i wsp. /91/ wykazali ponadto, że mutacje w regionie 3.2 wpływają na syntezę produktów abortywnych, a tworzenie krzyżowych wiązań kowalencyjnych z pierwszymi nukleotydami tworzącego się RNA może świadczyć o tym, że podjednostka sigma ma wpływ na syntezę RNA /190/. Wreszcie opisane kompleksy elongacyjne zawierające podjednostkę sigma (p. wstęp) mogą sugerować jej udział w procesach pauzowania (ang. σ^{70} dependent proximal pausing) /170, 171/ czy też terminacji transkrypcji.

Jeśli podjednostce sigma przypisuje się tyle funkcji, w tym również to, że jest celem dla aktywatorów /132/, to oczywiste jest, że nie mogą być one realizowane równocześnie. Funkcje te muszą być pełnione sekwencyjnie i ograniczać się tylko do pewnych domen podjednostki sigma. Są więc one rozdzielone w czasie i przestrzeni.

Do wypełniania wszystkich funkcji, które pełni podjednostka σ w cyklu transkrypcyjnym niezbędne są wszystkie domeny podjednostki sigma. Ale prawdopodobne jest, że część z tych funkcji może być pełniona przez fragmenty białkowe zawierające ograniczoną liczbę domen. Dlatego też głównym celem pracy było stwierdzenie czy fragment podjednostki sigma zawierający tylko jedną lub kilka domen będzie w stanie wypełnić którąkolwiek z funkcji natywnej podjednostki sigma. Dotyczy to zwłaszcza procesu rozpoznawania promotora i innych etapów inicjacji transkrypcji.

Aby zrealizować ten cel należało skonstruować takie fragmenty podjednostki sigma, które zawierałyby izolowane domeny, zwłaszcza domeny 2 i 4 odpowiedzialne za rozpoznawanie heksamerów -10 i -35.

Projektując fragmenty podjednostki sigma wykorzystano informacje o domenowej budowie i funkcjonowaniu podjednostki, oddziaływaniu z rdzeniem i znanych kontaktach na poziomie DNA. Konstruowane fragmenty nie mogły też zawierać wyłącznie najlepiej zdefiniowanych domen wiążących DNA 2.4 i 4 lecz także inne, sąsiadujące sekwencje aminokwasowe. Zawierają one np. łączniki między poszczególnymi domenami czy też sekwencje oddziałujące z rdzeniem.

Zaprojektowano i sklonowano pięć fragmentów podjednostki σ^{70} : FR1 (zawierający całe domeny 1 i 2), FR2 (całe domeny 2 i 3), FR3 (całe domeny 3 i 4), FR4 (część domeny 3 i całą 4), FR5 (tylko całą domenę 4) (Ryc. 11). Można sądzić, że najsilniej z rdzeniem powinny oddziaływać białka FR1 i FR2, zawierające główny region odpowiedzialny za wiązanie się z rdzeniem - domenę CB (ang. *Core binding*) w regionie 2.1 (reszty aminokwasowe 361- 390) (128). Jednak liczne dodatkowe miejsca połączenia z rdzeniem zmapowano w innych regionach podjednostki sigma: 2.2, 3.1, 4.1 i 4.2 /109, 110/, dlatego założono, że pozostałe fragmenty białkowe mają również szansę na tworzenie holoenzymu.

Otrzymane w reakcji PCR, przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych starterów, DNA kodujące poszczególne fragmenty podjednostki sigma zostały w procesie ligacji połączone z wektorem ekspresyjnym pET16b (Wyniki 5.2). Wektor ten jest elementem składowym systemu ekspresyjnego wykorzystującego polimerazę RNA faga T7 (Ryc. 14 i 15). Dzięki temu zabiegowi uzyskano wydajną i łatwą w regulacji ekspresję wszystkich klonowanych białek indukowaną poprzez dodanie do hodowli niemetabolicznego induktora, IPTG. Dodatkowo użyty wektor pozwolił na wprowadzenie

do N-terminalnych końców białek 10 reszt histydyny, umożliwiając szybkie i efektywne oczyszczanie białka z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na złożu NiNTA. Metoda ta okazała się bardzo wydajna i skuteczna. Pozwoliła uniknąć długiej i złożonej procedury oczyszczania białka /215/. Białka oczyszczone z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na złożu NiNTA zachowują swoją aktywność enzymatyczną /114, 142/. W przypadku wszystkich pięciu białek FR1, FR2, FR3, FR4 i FR5 uzyskano preparaty fragmentów podjednostki σ z ponad 90 % czystością (odpowiednio fot. 8, 9, 10, 11, 12 i 14). W porównaniu z tradycyjnymi metodami oczyszczania podjednostki sigma /135, 212, 215/ użyta procedura okazała się znacznie mniej pracochłonna. Jednak nie udało się uniknąć, podobnie jak we wcześniej opracowanych metodach, lokowania nadprodukowanego w komórkach bakteryjnych białka w ciałach inkluzyjnych. Początkowe próby oczyszczania białek z fazy rozpuszczalnej były nieskuteczne, a we frakcjach wyłukiwanych z kolumny 250 mM imidazolem obecne były głównie zanieczyszczenia (Fot. 8). Dlatego też do oczyszczania białka należało wykorzystać osad, w którym znajdowały się ciała inkluzyjne. Oznaczało to, że do odzyskania białka trzeba było użyć silnego czynnika denaturującego – 8M mocznika. Skracanie podjednostki sigma od N-końca (FR2, FR3, FR4) nie poprawiło rozpuszczalności klonowanych białek, a wprowadzony „ogon” polihistydynowy był zbyt małą domeną aby poprawić ten parametr. Nie sprawdziło się również obniżanie temperatury indukowanej hodowli bakteryjnej czy też obniżenie ilości nadprodukowanego białka poprzez zmniejszenie stężenia induktora. Jedną z zalet metody odzyskiwania białka z ciał inkluzyjnych jest wysoka czystość takiego preparatu, ale wiązało się to z dodatkowym etapem, w którym należało odtworzyć natywną, prawidłową konformację klonowanych białek. Najskuteczniejszą metodą renaturacji białka okazała się wielogodzinna dializa rozcieńczonego preparatu białkowego (10 - 50 $\mu\text{g/ml}$) wobec buforu do rekonstrukcji z dodatkiem inhibitora proteaz serynowych PMSF. Ostatecznie po etapie dializy i zateżenia w przypadku czterech białek FR2, FR3, FR4 i FR5 uzyskano odpowiednio stężone (1-2 mg/ml), bez znacznej degradacji, preparaty białkowe (Fot. 15).

Niezadowalający efekt uzyskano w przypadku białka FR1, które w procesie dializy i zateżenia ulegało silnej degradacji. Zmiana metody zateżenia (przy zateżaniu pozostałych białek użyto zestawu MICROCON[®] - Centrifugal Filter Devices (Millipore)) [Metody 4.16] na wysalanie białka z roztworu siarczanem amonu, również nie przyniosła

zadowalającego efektu. Dlatego zdecydowano o nie wykorzystywaniu białka FR1 w dalszych analizach.

W procesie renaturacji białko może przybrać różne formy konformacyjne, część z nich nie gwarantuje przywrócenia pierwotnych właściwości białka. Tym bardziej, że klonowane białka różniły się znacznie od formy typu dzikiego. Ważne jest aby aktywna, natywna forma białka była strukturą dominującą ilościowo w oczyszczonym preparacie, dlatego też ten etap mógł się okazać najbardziej newralgiczny w całej pracy. Konieczne było znalezienie skutecznej metody na sprawdzenie specyficznego aktywności fragmentów podjednostki sigma, zanim przystąpi się do dalszych etapów pracy tj. rekonstrukcji holoenzymu i tworzenia kompleksów z promotorowym DNA. W przypadku oczyszczania i renaturacji enzymów miarą skuteczności procesu renaturacji jest oznaczanie aktywności enzymatycznej preparatu białka. W odniesieniu do podjednostki sigma, która sama nie wykazuje aktywności enzymatycznej nie dysponujemy skutecznym sposobem oceny procesu renaturacji. Aktywność enzymatyczną wykazuje jedynie holoenzym polimerazy RNA, którego niezbędnym składnikiem jest podjednostka sigma. Dlatego też opracowano zastępczy sposób oceny aktywności białka rekombinacyjnego otrzymanego w procesie oczyszczania i renaturacji. Wykazano wcześniej, że izolowana, natywna podjednostka σ nie jest zdolna do wiązania DNA. Jednak po usunięciu domeny 1.1 podjednostka sigma wykazuje tendencję do specyficznego rozpoznawania sekwencji promotorowej. Otrzymane w tej pracy fragmenty podjednostki sigma, z wyjątkiem fragmentu FR1, nie zawierały domeny 1.1, powinny być więc zdolne do rozpoznawania promotora. Istotą metody była immobilizacja kompleksów białka (fragmenty podjednostki sigma) ze znakowanym radioaktywnie promotorowym DNA na nitrocelulozowych filtrach membranowych. Wolny, niezwiązany w kompleksie DNA przechodzi do przesączu, natomiast kompleksy są zatrzymywane na filtrach. Wykazano w ten sposób, że fragmenty FR2 i FR3 wiążą DNA, natomiast fragment FR1 charakteryzuje się znacznie niższą efektywnością tworzenia kompleksów (Fot. 16). Podobną metodę zastosowali Dombroski i wsp. /49/ w odniesieniu do fuzyjnych fragmentów podjednostki sigma z GST. Aby wykazać, że wiązanie to miało charakter specyficzny wykonano kolejne eksperymenty, w których użyto dwóch fragmentów DNA. Jeden zawierał promotor A1 bakteriofaga T7, drugi pozbawiony był sekwencji promotorowej. Mieszaninę obu fragmentów DNA znakowanych radioaktywnie inkubowano z fragmentem FR3 podjednostki σ , a następnie sączono przez filtr

membranowy. DNA wyeluowane z kompleksów zatrzymanych na filtrze poddano elektroforezie w żelu poliakrylamidowym. Autoradiografia żelu (Fot. 17) pozwoliła stwierdzić, że fragment FR3 podjednostki σ specyficznie wiąże się z DNA zawierającym sekwencję promotorową. Praktycznie nie wiąże się natomiast z DNA pozbawionym promotora. Słabe wiązanie z niepromotorowym DNA (6% w stosunku do DNA zawierającego promotor) może być miarą niespecyficznego oddziaływania fragmentu podjednostki σ z DNA. W eksperymentach tych wykazano, że przyjęta procedura oczyszczania i renaturacji fragmentów podjednostki σ była skuteczna. Wynik ten jest znacznie lepszy od rezultatów otrzymanych przez Dombroski i wsp /49/, które wskazywały na silne oddziaływania niespecyficzne i silną tendencję białka do agregacji co uniemożliwiało bardziej zaawansowane analizy inicjacji transkrypcji.

Kolejnym etapem pracy były analizy, które miały na celu stwierdzenie czy oddziaływania uzyskanych fragmentów podjednostki sigma z rdzeniem polimerazy RNA doprowadzą do tworzenia holoenzymu specyficznie łączącego się z sekwencją promotora. Severinova i wsp. /191/ analizowali oddziaływanie fragmentu sigmy, σ_2^{70} (104-448 aa), z rdzeniem polimerazy RNA *E. coli*. Rdzeń polimerazy w tych eksperymentach zawierał zmodyfikowaną podjednostkę β' . Obecność polihistydynowego rozszerzenia w C-terminalnej części podjednostki β' umożliwiała immobilizację rdzenia na NiNTA agarozie. W eksperymentach tych fragment σ_2^{70} (104-448 aa) wiązał się z rdzeniem polimerazy RNA. W przypadku tej pracy do doświadczeń wykorzystywano komercyjny rdzeń i holoenzym firmy EPICENTRE® (USA), nie zawierające „ogona” polihistydynowego (Fot. 18). Dlatego też pominięto etap analizy oddziaływań rdzenia polimerazy RNA z fragmentami sigma i od razu przystąpiono do badania kompleksów binarnych HoloFR (Holoenzym polimerazy RNA i rekombinacyjnego fragmentu podjednostki sigma) z DNA. Użyto w tym celu metody opóźnienia migracji kompleksów w natywnym żelu poliakrylamidowym (ang. *gel retardation*) /61, 63, 92/. Jeżeli któreś z badanych białek uformuje z rdzeniem kompleks (np. HoloFR2) zdolny do oddziaływania z promotorowym DNA, to powinien on opóźnić migrację DNA w żelu, podobnie jak to robi holoenzym typu dzikiego (Fot 19, ścieżka 3). W celu osłabienia oddziaływań niespecyficznych polimerazy z DNA w tych doświadczeniach użyto heparyny. W przypadku białek FR2 (Fot. 19 – ścieżki 5 i 6) i FR3 (Fot. 22 ścieżki 4-7) uzyskano kompleksy binarne, jednak były one znacznie słabsze od kompleksów binarnych tworzonych przez holoenzym typu

dzikiego. W obu przypadkach pojawiał się dodatkowy, dolny prążek. W kompleksach HoloFR3-DNA dolny prążek miał nawet większą intensywność od prążka górnego. Dodawanie większej ilości białka, fragmentu podjednostki σ , powodowało tylko wzmocnienie prążka dolnego (Fot. 19 ścieżki 5 i 6, Fot. 22 ścieżki 4-7). Do kompleksu HoloFR2 użyto białka FR2 w stosunku do rdzenia 1:16. Białka FR3 użyto w ogromnym stechiometrycznym nadmiarze 1:20. Użycie większego stężenia heparyny w kompleksach HoloFR2 również nie poprawiało natężenia prążków górnych najprawdopodobniej odpowiadających właściwym kompleksom binarnym (porównaj Fot. 19 ścieżka 5 i Fot. 20 ścieżka 2). Tak jak przypuszczano, intensywność prążków uzyskanych dla kompleksów z białkiem FR2, które zawierało domenę CB - główny region oddziaływania z rdzeniem polimerazy, była większa od tych z białkiem FR3 (domena 3 i 4). Jednak nie dorównywały intensywności kompleksom z holoenzymem dzikiego typu. Oddziaływania stabilizujące kompleks z udziałem domeny CB są tylko częścią wszystkich oddziaływań podjednostki sigma z rdzeniem polimerazy. W przypadku fragmentów FR2 i FR3 brak tych oddziaływań powoduje, że kompleksy fragmentu podjednostki sigma z rdzeniem, a następnie z promotorowym DNA powstają ze znacznie mniejszą wydajnością. Wykazano, że brak domeny 4.2 w podjednostce σ^{70} /120, 121/, i domeny 3 w σ^{32} /244/, znacznie redukuje powinowactwo tych podjednostek do rdzenia polimerazy RNA. W przypadku fragmentu σ_2^{70} oddziaływanie z rdzeniem było 30 razy słabsze niż dzikiej podjednostki sigma /191/. W odniesieniu do fragmentów FR4 i FR5 różnica między holoenzymem utworzonym z fragmentem podjednostki sigma a holoenzymem typu dzikiego była znacznie większa. Intensywność prążków odpowiadających kompleksom binarnym zawierającym fragmenty podjednostki sigma była tak mała, że detekcja kompleksów w żelach poliakrylamidowych była problematyczna. Zmuszało to do rezygnacji z analiz procesu inicjacji transkrypcji z udziałem tych fragmentów.

Interesujące jest, że fragmenty podjednostki sigma FR2 lub FR3 tworzą dwa rodzaje kompleksów różniące się ruchliwością elektroforetyczną. Jeśli przyjąć, że górny prążek odpowiada właściwemu kompleksowi binarnemu to kompleksy zlokalizowane w dolnym prążku o większej ruchliwości elektroforetycznej muszą odpowiadać holoenzymowi, w którym fragment podjednostki sigma jest silnie związany z rdzeniem, jednak w nieprawidłowy sposób. Nieprawidłowa lokalizacja fragmentu podjednostki sigma w kompleksie z rdzeniem w dolnym prążku, powoduje w konsekwencji funkcjonalne

upośledzenie tego kompleksu. Charakterystyczna ruchliwość elektroforetyczna kompleksu binarnego holoenzymu typu dzikiego z promotorem uwarunkowana jest nie tylko masą cząsteczkową, ale też strukturą załamanej DNA w kompleksie /226/. Można sądzić, że kompleks zlokalizowany w górnym prążku (Fot. 19 ścieżki 5 i 6) zawierający fragment FR2, który ma taką samą ruchliwość jak kompleks utworzony z holoenzymu typu dzikiego wywołuje podobną zmianę struktury DNA. Holoenzym zawierający nieprawidłowo związany z rdzeniem fragment FR2 nie wywołuje takiej zmiany w strukturze DNA. Ruchliwość elektroforetyczna tego kompleksu dokładnie odpowiada ruchliwości kompleksu rdzenia z DNA o stechiometrii 1:1 (Fot. 21 ścieżka 2), który nie załamuje DNA /93/. Jednak kompleks samego rdzenia z DNA całkowicie rozpada się po dodaniu heparyny (Fot. 18 ścieżki 1 i 2, Fot. 21 ścieżki 1 i 2). Trwałość w obecności heparyny kompleksu tworzącego dolny prążek świadczy o tym, że analizowane fragmenty podjednostki sigma mają decydujący wkład w stabilność tak otrzymanych kompleksów. Najprawdopodobniej blokują dostęp heparyny do odpowiednich domen podjednostki β' . Należało również wykluczyć możliwość, że dolny prążek powstaje w wyniku oddziaływania samego fragmentu podjednostki sigma z promotorowym DNA. Wcześniej takie oddziaływania badano jedynie na filtrach membranowych, w których badane białka FR2 i FR3 wykazały specyficzne oddziaływanie z DNA. W przypadku białka FR2 w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym nie zaobserwowano kompleksu (Fot. 18 ścieżka 4), oznaczało to, że rozpadał się on trakcie długotrwałego rozdzielania elektroforetycznego. Dla białka FR3 zaobserwowano pewne opóźnienie migracji promotorowego DNA w żelu, świadczące o oddziaływaniu tych dwóch komponentów, na tyle mocne aby przetrwać elektroforezę (Fot. 22 ścieżka 3). Jednak kompleks ten ma tak małą masę cząsteczkową, że migruje w żelu znacznie szybciej niż dolny, niezidentyfikowany prążek tworzony przez HoloFR2-DNA (porównaj ścieżki 3 i 5 Fot. 22). Udowodniono również, że górny prążek zawiera kompleks rdzenia z białkiem FR2 (Fot. 20 ścieżka 3) i nie zawiera nawet minimalnej ilości podjednostki sigma typu dzikiego. Prążek ten oczywiście nie zawiera również samego rdzenia, ponieważ kompleks taki w obecności heparyny ulega dysocjacji.

Kolejną możliwością sprawdzenia sugestii, że górny prążek w kompleksach HoloFR2 jak i HoloFR3 to właściwe kompleksy transkrypcyjne jest dodatkowa kontrola ich specyficzności w oddziaływaniu z odpowiednimi dla nich elementami promotora.

W tym celu do reakcji tworzenia kompleksów binarnych obok dzikiego typu promotora A1 faga T7, użyto promotora A1 ze zmodyfikowaną odpowiednio sekwencją -10 (A1_(A-10)) lub sekwencją -35 (A1_(A-35)) (Ryc. 11). Sekwencje te w wyniku modyfikacji całkowicie traciły swój konsensusowy charakter. Interpretując wyniki tych doświadczeń dla białka FR2 (Fot. 24), należy zauważyć, że zawiera ono domenę 2.4 dzikiej podjednostki σ^{70} odpowiedzialną za specyficzne rozpoznanie sekwencji -10 promotora, nie posiada zaś domeny 4.2 odpowiedzialnej za rozpoznanie sekwencji -35. FR2 z rdzeniem polimerazy RNA tworzy holoenzym, który specyficznie rozpoznaje odpowiedni dla niego element promotora – heksamer -10. Zrozumiałe jest, że jeśli użyje się sekwencji promotora pozbawionej heksameru -10 (A1_(A-10)) to HoloFR2 nie może utworzyć specyficznego kompleksu z promotorem zatem osłabieniu powinien ulec specyficzny kompleks binarny (prążek górny, Fot. 24, porównaj ścieżki 3 i 5). Kompleksy przedstawione na ścieżkach 3 i 4 fotografii 24 nie wykazują istotnych różnic ponieważ obie sekwencje promotorowe A1 i A1_(A-35) zawierają niezmienny heksamer -10.

Jeszcze bardziej jednoznaczny efekt można było zaobserwować w przypadku białka FR3, które zawiera domenę 4.2 odpowiedzialną za rozpoznanie sekwencji -35 promotora. Użycie do tworzenia kompleksów z HoloFR3 DNA z całkowicie zmienioną sekwencją -35 (A1_(A-35)) spowodowało, że pojawił się jedynie dolny prążek, co można było uznać za ewidentny dowód na niespecyficzność tego kompleksu. Właściwy, funkcjonalny kompleks binarny (prążek górny) powstaje tylko wówczas, gdy holoenzym wiąże promotorowe DNA zawierające heksamer -35.

Ostatecznym testem rozstrzygającym czy otrzymane kompleksy to transkrypcyjne kompetentne kompleksy otwarte mogło być przeprowadzenie przez nie transkrypcji po dodaniu limitowanej ilości substratów, startera ApUpC oraz dwóch nukleotydów ATP i GTP, której finalnym produktem będzie utworzenie 11-meru (Ryc. 21). Zdolność taką wykazują kompleksy otwarte, w których DNA jest rozplecione w obszarze pętli transkrypcyjnej. Kompleksy takie charakteryzuje duża stabilność i oporność na działanie wysokich stężeń heparyny. Analizowane w pracy kompleksy binarne są stabilne wobec heparyny, zatem być może przynajmniej niektóre z nich są kompleksami otwartymi. W takim przypadku kompleksy w obecności odpowiednich nukleotydów powinny być zdolne do syntezy produktu RNA. Niska efektywność tworzenia kompleksów binarnych przez holoenzym może stanowić jednak istotną trudność analiz procesu

transkrypcji.

Efektywność transkrypcji analizowano w warunkach limitowania substratów stosując starterowy ApUpC i nukleotydy ATP i GTP. W takich warunkach powstający produkt ma długość 11 nukleotydów i utrzymuje się w bardzo stabilnym kompleksie elongacyjnym, który wykazuje większą ruchliwość elektroforetyczną w porównaniu z kompleksem binarnym. Prowadząc transkrypcję w opisany sposób można śledzić przekształcanie się kompleksu binarnego w kompleks potrójny i oceniać ten proces ilościowo. Można w ten sposób odróżnić transformację kompleksów binarnych w potrójne od rozpadu (dysocjacji) kompleksów binarnych przy próbie transkrypcji /216/, albo też określić ilościowo udział kompleksów nietranskrybujących w całej puli kompleksów binarnych /29/. Gdyby prowadzono transkrypcję typu "run off" elongacyjne kompleksy transkrybujące osiągnęłyby koniec 3' matrycy i uległy dysocjacji. W ten sposób znaczna część informacji o naturze kompleksów inicjacyjnych byłaby stracona.

Reakcje transkrypcji ze znakowanym radioaktywnie promotorem DNA nie dawały jednoznacznej odpowiedzi czy kompleksy binarne uzyskane odpowiednio z białkiem FR2 (Fot. 26 ścieżki 3 i 4) lub FR3 (Fot. 27 ścieżki 3 i 4) zdolne są do zainicjowania transkrypcji. W przypadku obu białek po dodaniu startera ApUpC i nukleotydów wzrastała radioaktywność w pozycji istniejących już wcześniej prążków dolnych będących niespecyficznymi kompleksami binarnymi. Kompleks potrójny typu dzikiego (Fot. 27 ścieżka 2), znacznie silniejszy niż kompleks binarny (ścieżka 1), lokalizował się nieznacznie wyżej niż wzmocnione w wyniku „transkrypcji” dolne, niespecyficzne kompleksy binarne HoloFR2 jak i HoloFR3. Nie można zatem wykluczyć, że przy próbie inicjacji transkrypcji w przypadku białka FR2 część kompleksów, a białka FR3 wszystkie kompleksy binarne zostają zablokowane w nieaktywnej transkrypcyjnie formie przejściowej. W tej sytuacji konieczne było radioaktywne wyznaczenie transkryptu, ponieważ tylko powstanie RNA może być jednoznacznym dowodem na tworzenie aktywnych kompleksów potrójnych. W tym celu na końcu 5' wyznakowano radioaktywnie krótki starterowy fragment RNA, ApUpC. Po dodaniu znakowanego ApUpC i pozostałych substratów ATP i GTP do binarnego kompleksu HoloFR2, zniknął całkowicie górny prążek kompleksu otwartego i pojawiał się niżej potrójny kompleks transkrybujący (Fot. 28 A ścieżka 3). Wydaje się, że był on nieznacznie przesunięty w dół względem kompleksu potrójnego typu dzikiego (Fot. 28A ścieżka 2), podobnie jak w

reakcjach transkrypcji ze znakowanym radioaktywnie promotorowym DNA. Radioaktywność tych kompleksów była znacznie słabsza niż kompleksów dzikiego typu, pojawił się też dodatkowy prążek zlokalizowany jeszcze niżej niż niespecyficzny kompleks binarny (porównaj ścieżki 3 i 4, Fot. 28B). Wyniki te pozwalają stwierdzić, że kompleks HoloFR2, w prawdzie z niską wydajnością, jest w stanie zainicjować transkrypcję. Aby rozwiązać ostatnie wątpliwości odnośnie tego kompleksu wykonano transkrypcję ze znakowanym radioaktywnie w pozycji α GTP [α 32 P GTP].

W powstającym 11 merze na matrycy promotora A1 nukleotyd ten wbudowany zostanie aż w 5 pozycjach. Wyniki eksperymentu przedstawione na fotografii 29 (ścieżka 6) pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że kompleks binarny HoloFR2 po dodaniu substratów jest w stanie przeprowadzić reakcję transkrypcji. Ilość uzyskanego produktu RNA jest, zgodnie z przewidywaniami, mniejsza w porównaniu z dzikim holoenzymem (Fot. 29 ścieżka 3). W tych samych warunkach transkrypcja przy udziale samego rdzenia miała charakter śladowy (Fot. 30 ścieżka 8).

Z kolei w reakcji transkrypcji ze znakowanym ApUpC dla HoloFR3, nie uzyskano kompleksu potrójnego (Fot. 28A ścieżka 4, Fot. 28B ścieżka 5). Na kliszach widoczny jest jedynie rozmyty słaby prążek, którego pozycji nie można odnieść do żadnego specyficznego kompleksu. Dalsze badania czy kompleks ten jest w stanie przeprowadzić reakcję transkrypcji były więc bezcelowe.

Charakterystyczną cechą kompleksów binarnych, uzyskanych gdy holoenzym zawierał fragment podjednostki sigma FR2 lub FR3, jest występowanie dwóch dobrze zdefiniowanych kompleksów. Jeden w pozycji odpowiadającej kompleksowi binarnemu typu dzikiego i drugi o większej ruchliwości elektroforetycznej. Analiza uzyskanych wyników świadczy, że właściwym kompleksem binarnym w tych przypadkach jest kompleks górny. W konsekwencji dolny prążek o większej ruchliwości elektroforetycznej musi być kompleksem funkcjonalnie upośledzonym. Analiza przyczyn takiego zachowania się kompleksów binarnych wskazuje kilka prawdopodobnych przyczyn. Jedną z nich jest możliwość, że jeden fragment podjednostki sigma może być związany z rdzeniem w różny sposób. Sytuacja taka jest bardziej prawdopodobna jeśli fragment podjednostki sigma zawiera kilka sekwencji aminokwasowych oddziaływających z rdzeniem. W takiej sytuacji fragmenty sigmy mogą wiązać się z rdzeniem w różny sposób w zależności od tego, która z domen wiążących podjednostki sigma będzie zaangażowana w wiązanie. W mieszaninie

reakcyjnej znajdują się więc fragmenty konkurujące o wiązanie z rdzeniem i tworzące populacje holoenzymu, zawierające sigmę i rdzeń połączone w odmienny sposób. Część uzyskanych form może być нефункциональна. Nie można wykluczyć również sytuacji, że rdzeń może związać więcej niż jedną cząsteczkę fragmentu podjednostki sigma. Możliwa jest również sytuacja, w której wiązanie jednego fragmentu podjednostki sigma w sposób prawidłowy, analogiczny do występującego w natywnej podjednostce σ powoduje, że inny fragment podjednostki zostanie związany w sposób nieprawidłowy. Mogło by spowodować to, że taki holoenzym wprawdzie wiąże się z promotorowym DNA ale nie jest w stanie przeprowadzić kolejnych faz inicjacji transkrypcji. Nieprawidłowy sposób połączenia podjednostki sigma z rdzeniem, jako przyczyna powstawania нефункциональных kompleksów binarnych, wydaje się być właściwym wyjaśnieniem zachowania się kompleksów binarnych o większej ruchliwości elektroforetycznej (prążki dolne). Wydaje się to tym bardziej prawdopodobne, że w przypadku całej podjednostki sigma duże rozmiary powierzchni oddziaływania i wiele miejsc wiążących rdzeń wymuszają spolaryzowaną orientację podjednostki sigma w holoenzymie. Ponadto obecność natywnej podjednostki sigma usuwa poprzez efekt kompetycyjny nieprawidłowo związane inne molekuly podjednostki sigma. Prawidłowość wiązania sigmy do rdzenia jest weryfikowana przez kolejne etapy wiązania (proces oddziaływania sigmy z rdzeniem jest wieloetapowy /77/). W przypadku fragmentu podjednostki sigma taka weryfikacja nie występuje i fragment podjednostki sigma może się wiązać z rdzeniem w sposób przypadkowy. Możliwe jest wówczas, że niektóre z tak otrzymanych kompleksów nie będą w stanie pełnić funkcji w dalszych etapach inicjacji. Gdyby rdzeń związał więcej niż jedną molekulę podjednostki sigma, mogłaby powstać przestrzenna zawada dla prawidłowego funkcjonowania holoenzymu. Na możliwość wiązania przez rdzeń więcej niż jednego fragmentu podjednostki sigma wskazuje fotografia 21, na której przedstawiono skład białkowy holoenzymu wyeluowanego z kompleksu z promotorowym DNA (HoloFR2) wykazującego ruchliwość elektroforetyczną w warunkach niedenaturujących zbliżoną do ruchliwości elektroforetycznej typu dzikiego (kompleks górny). W tym przypadku intensywność prążka odpowiadającego fragmentowi podjednostki sigma wskazuje na ponad stechiometryczny udział podjednostki w holoenzymie (Fot. 21). Za tym, że właściwym kompleksem binarnym utworzonym przez fragmenty podjednostki sigma w kompleksie z rdzeniem są górne prążki przemawia również fakt, że znajdują się one w

pozycji kompleksów z holoenzymem typu dzikiego. Ruchliwość elektroforetyczna kompleksów transkrypcyjnych jest nie tylko funkcją masy cząsteczkowej kompleksu, lecz również topologii DNA w kompleksie. Załamanie DNA jest charakterystyczną cechą inicjacyjnych kompleksów otwartych zawierających podjednostkę sigma /93/. Elongacyjne kompleksy transkrybujące pozbawione podjednostki sigma wykazują zwiększoną ruchliwość elektroforetyczną, a sam rdzeń polimerazy RNA nie załamuje DNA. Większa ruchliwość elektroforetyczna niefunkcjonalnych kompleksów binarnych (prążki dolne) mogłaby więc świadczyć, że są to kompleksy, w których nie występuje załamanie DNA. Pozbawione są zatem jednej z cech kompleksów otwartych zdolnych do zapoczątkowania syntezy RNA. Porównując zachowanie się fragmentów FR2 i FR3 podjednostki sigma na etapie tworzenia kompleksów binarnych i ich zdolność do przechodzenia do produktywnej fazy transkrypcji można stwierdzić, że do skutecznej inicjacji transkrypcji wystarczy obecność fragmentu rozpoznającego heksamer -10. Fragment zawierający domenę wiążącą heksamer -35, lecz pozbawiony domeny 2.4, nie jest w stanie utworzyć funkcjonalnego kompleksu binarnego i przejść do kolejnych etapów inicjacji transkrypcji.

Na większą rolę w procesie transkrypcji oddziaływań podjednostki sigma z heksamerem -10 wskazywały również wyniki z wykorzystaniem zmodyfikowanych sekwencji promotorowych /216/. Promotor pozbawiony heksameru -35 był zdolny do tworzenia otwartego kompleksu inicjacyjnego, jednak przy próbie transkrypcji ulegał rozpadowi.

Eksperymenty z wykorzystaniem oligonukleotydu (oligo1), który zawiera fragment sekwencji (-18 do +1) [Materiały 3.7] nici niematrixowej wskazują, że holoenzym zawierający fragment FR2 podjednostki sigma, chociaż w wielu aspektach zachowuje się jak holoenzym typu dzikiego, to jednak różni się od niego znacząco - nie jest w stanie w przeciwieństwie do holoenzymu typu dzikiego związać oligo1.

Interesujący aspekt dotyczący tworzenia i natury kompleksów binarnych wynika z analizy fotografii 20, na której przedstawiono kompleksy binarne tworzone przez fragment FR2 z rdzeniem pochodzącym z innego źródła (ścieżka 5). W tym przypadku rozkład intensywności prążków odpowiadających różnym typom kompleksów, sugeruje że dla wyników eksperymentów może mieć znaczenie pochodzenie enzymu jego aktywność właściwa, czy skład białkowy (obecność śladowych ilości czynników transkrypcyjnych). Próby tworzenia kompleksów binarnych z równoczesnym udziałem dwóch

rekombinowanych fragmentów podjednostki sigma (FR2 i FR3) nie wpływa znacząco na efekty tworzenia kompleksów transkrypcyjnych (Fot. 20 ścieżka 4).

7. Streszczenie

Podjednostka σ^{70} *Escherichia coli* łącząc się z rdzeniem polimerazy RNA ($\beta\beta'\alpha_2\omega$) tworzy holoenzym zdolny do zainicjowania transkrypcji. Pełni ona kluczową rolę nie tylko specyficznym rozpoznając sekwencje promotora, ale również promuje duże zmiany konformacji całego enzymu. Bierze bezpośredni udział w rozdzielaniu komplementarnych nici DNA podczas tworzenia kompleksu otwartego, stabilizuje ten kompleks i wpływa na wczesne etapy syntezy RNA. Jest również, na etapie inicjacji, celem działania niektórych aktywatorów i represorów transkrypcji. Wreszcie przypisuje się podjednostce sigma również wpływ na proces elongacji, pauzowania a nawet terminacji transkrypcji. Tak liczne i złożone funkcje podjednostka σ może pełnić dzięki złożonej multidomenowej budowie białka, przy czym funkcje muszą być realizowane sekwencyjnie i przypisane do różnych domen podjednostki sigma. Jednym z kluczowych pytań tej pracy było czy możliwe jest uzyskanie rekombinacyjnych fragmentów podjednostki sigma, które zawierałyby oddzielne domeny strukturalne białka i zachowały niektóre z funkcji natywnej podjednostki σ . Dotyczy to w szczególności fragmentów podjednostki sigma zawierających domeny drugą i czwartą rozpoznające konsensusowe sekwencje promotora. Etap rozpoznania sekwencji promotorowej jest kluczowy i limituje wszystkie następne fazy inicjacji transkrypcji. Istotne jest również czy takie fragmenty podjednostki sigma w strukturze holoenzymu będą w stanie spowodować przejście kompleksów inicjacyjnych do produktywnej fazy transkrypcji. Aby odpowiedzieć na te pytania zaprojektowano i skonstruowano pięć białek rekombinacyjnych, fragmentów podjednostki σ^{70} *E. coli* zawierających: FR1 – domeny 1 i 2, FR2 – domeny 2 i 3, FR 3 – domeny 3 i 4, FR4 – część domeny 3 i domenę 4 oraz FR5 – domenę 4. Fragmenty te wklonowano do ściśle kontrolowanego systemu ekspresyjnego, który do transkrypcji wykorzystuje polimerazę RNA bakteriofaga T7. System ten umożliwił uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji klonowanych białek, które dodatkowo na N-końcu zawierały rozszerzenie polihistydynowe, co znacznie uproszczało proces oczyszczania białka z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa.

Oczyszczanie fragmentów rekombinacyjnych podjednostki σ prowadzono w warunkach denaturujących, ponieważ w całości były one lokowane w ciałach

inkluzyjnych. W wyniku zastosowania metody oczyszczania białka z wykorzystaniem chromatografii na Ni-NTA agarozie z użyciem 8M mocznika, otrzymano wysoko oczyszczone preparaty białka. Istotną komplikacją procesu oczyszczania stanowiła jednak konieczność opracowania metody renaturacji białka, a następnie weryfikacji czy klonowane białka przyjęły właściwą natywną konformację. Wykorzystano w tym celu metodę sączenia kompleksów otrzymanych białek rekombinacyjnych z promotorowym DNA przez filtry membranowe z nitrocelulozy. Wykazano, że opracowana metoda renaturacji była skuteczna, i że dwa z klonowanych fragmentów FR2 i FR3, rozpoznające sekwencje -10 i -35 promotora, zdolne są do tworzenia kompleksów z promotorowym DNA. Odpowiedni test kompetycyjny z wykorzystaniem mieszaniny promotorowego DNA i DNA nie zawierającego sekwencji promotorowej świadczy, że wiązanie to było specyficzne. Wykazano również, że otrzymane fragmenty rekombinacyjne podjednostki sigma FR2 i FR3 tworzą z rdzeniem polimerazy RNA holoenzymem zdolny do wiązania promotorowego DNA i tworzenia kompleksów binarnych o ruchliwości elektroforetycznej i topologii DNA w kompleksie podobnej do kompleksów binarnych typu dzikiego. Wysoka stabilność tych kompleksów w obecności heparyny może sugerować, że są to najprawdopodobniej kompleksy otwarte. W przypadku kompleksów binarnych, które tworzy holoenzym zawierający fragment FR2 podjednostki σ stwierdzono, że dodanie odpowiednich substratów, tj. starterowego ApUpC i nukleotydów ATP i GTP w warunkach limitowanej transkrypcji, kompleksy te ulegą transformacji w kompleksy potrójne syntetyzujące RNA. Transformacji takiej nie ulegają kompleksy binarne utworzone z udziałem fragmentu FR3 rozpoznającego heksamer -35 promotora.

8. Dodatek

Objaśnienia skrótów:

A1 – silny promotor bakteriofaga T7

Ø – fragment DNA pozbawiony sekwencji promotorowej

oligo1 – oligonukleotyd, który zawiera fragment sekwencji (-18 do +1) nici niematrixowej promotora

HoloFR2 – holoenzym polimerazy RNA uformowany z rdzenia i białka FR2 (fragmentu podjednostki σ^{70})

HoloFR3 – holoenzym polimerazy RNA uformowany z rdzenia i białka FR3 (fragmentu podjednostki σ^{70})

pz – par zasad

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

IPTG – izopropylo- β -D-tiogalaktopiranozyd

NTA – kwas nitrylotriacetylowy

PMSF – fenylometylosulfonylo fluorek

SDS – sól sodowa kwasu dodecylowego

TEMED – N,N,N',N' – tetrametylodiamina

9. Bibliografia

1. Arndt K. M., Chamberlin M. J., (1988) Transcription termination in *Escherichia coli*. Measurement of the rate of enzyme release from Rho-independent terminators. *J. Mol. Biol.*, **202**, 271-85.
2. Auble D. T., Allen, T. L. and deHaseth, P. L., (1986) Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase; Effects substitutions in the spacer DNA separation the -10 and -35 regions. *J. Biol. Chem.*, **261**, 11202-11206.
3. Baldwin N. E., Domrowski A. J., (2001) Isolation and characterisation of mutations in region 1.2 of *Escherichia coli* σ^{70} . *Mol. Microbiol.*, **42**, 427-437.
4. Banner C., Moran C., Losick R., (1983) Deletion analysis of a complex promoter for a developmentally regulated gene from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, **168**, 351-65.
5. Baracchini E, Glass R, Bremer H., (1988) Studies *in vivo* on *Escherichia coli* RNA polymerase mutants altered in the stringent response. *Mol. Gen. Genet.*, **213**, 379-87.
6. Bar-Nahum G., Nudler E., (2001) Isolation and characterization of σ^{70} - retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*. *Cell*, **106**, 443-451.
7. Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J. W., Minchin, S. D., (1997) Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the 'extended - 10' motif at promoters. *EMBO J.*, **16**, 4034-4040.
8. Bellomio A., Vincent P. A., de Arcuri B. F., Farías R. N., Morero R. D., (2007) Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.*, **189**, 4180-6.
9. Blaterr E. E., Ross W., Tang H., Gourse R. L., Ebright R. H., (1994) Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell*, **78**, 889-96.
10. Borowiec J. A., Gralla J. D., (1987) All three elements of the lac ps promoter mediate its transcriptional response to DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.*, **195**, 89-97.
11. Borukhov S., Goldfarb A., (1993) Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunit and in vitro assembly. *Protein Expression and Purification*, **4**, 503-511.
12. Borukhov S., Lee J., (2005) RNA polymerase structure and function at *lac* operon. *C R Biologies*, **328**, 576-587.

13. Borukhov S., Lee J., Goldfarb A., (1991) Mapping of a contact for the RNA 3' terminus in the largest subunit of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23932-5.
14. Bowers Ch. W., McCracken A., Dombroski A. J., (2000) Effects of amino acid substitution conserved and acidic residues within region 1.1 of *Escherichia coli* σ^{70} . *J. Bacteriol.*, **182**, 221-224.
15. Bown J. A., Kolb A., Mears C. F., Ishihama A., Minchin S. D., Busby S. J. W., (2000) Positioning of region 4 the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit by transcription activator. *J. Bacteriol.*, **182**, 2982-2984.
16. Bown J. A., Owens J. T., Meares C. F., Fujita N., Ishihama A., Busby S. J.W., Minchin S. D., (1999) Organization of open complexes at *Escherichia coli* promoters. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2263-2270.
17. Bucle M., Buc H., (1994) On the mechanism of promoter recognition by *E. coli* RNA polymerase. In Conaway R.C. and Conaway J.W., (eds) *Transcription: mechanisms and regulation*, Raven Press, Ltd, New York, pp. 207-225.
18. Buckle M., Pemberton I. K., Jacquet M., (1999) The kinetics of sigma subunit directed promoter recognition by *E. coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **285**, 955-964.
19. Burgess R. R., Anthony L., (2001) How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Current Opinion In Microbiol.*, **4**, 126-131.
20. Burgess R. R., Arthur T. M., Pietz B. C., (1998) Interaction of *Escherichia coli* σ^{70} with core RNA polymerase. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **LXIII**, 277-287.
21. Burgess R. R., Travers A.A., Dunn J.J., Bautz E.K.F., (1969) Factor stimulating by RNA polymerase. *Nature*, **221**, 43-46.
22. Busby S., Ebright R. H., (1994) Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell*, **79**, 743-746.
23. Callaci S., Heyduk T., (1998) Conformation and DNA binding properties of a single-stranded DNA binding region of sigma 70 subunit from *Escherichia coli* RNA polymerase are modulated by an interaction with the core enzyme. *Biochemistry*, **37**, 3312-20.
24. Callaci S., Heyduk E., Heyduk T., (1998) Conformational changes of *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} factor induced by binding to the core enzyme. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32995-33001.
25. Callaci S., Heyduk E., Heyduk T., (1999) Core RNA polymerase from *E. coli* induces a major change in the domain arrangement of the sigma 70 subunit. *Mol Cell.*, **3**, 229-38.

26. Campell E. A., Muzzi O., Chlenov M., Sun J. L., Olson C. A., Weinman O., Trester-Zedlitz M. L., Darst S. A., (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity σ subunit. *Mol. Cell*, **9**, 527-539.
27. Campell E. A., Westblde L. F., Darst S. A., (2008) Regulation of bacterial RNA polymerase σ factor activity: a structural perspective. *Current Opinion of Microbiol.*, **11**, 121-127.
28. Chen B. P. C., Hai T., (1994) Expresion vectors for affinity purification and radidiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene*, **139**, 73-75.
29. Chrzanowska Barbara, (2007) Funkcjonalna Topografia pętli transkrypcyjnej w transkrypcyjnym kompleksie inicjacyjnym polimerazy RNA *Escherichia coli*". Rozprawa doktorska, Uniwersytet Medyczny w Gdańsku.
30. Colland F., Barth M., Hengge-Aronis R., Kolb A., (2000) σ factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors. *EMBO J.*, **19**, 3028-3037.
31. Conaway J. W., Conaway R. C., (1990) An RNA polymerase II transcription factor shares functional properties with *Escherichia coli* σ^{70} . *Science*, **248**, 1550-1553.
32. Craig M. L., Tsodikov O. V., McQuade K. L., Schlax P. E. Jr, Capp M. W., Saecker R. M., Record M. T .Jr, (1998) DNA footprints of the two kinetically significant intermediates in formation of an RNA polymerase-promoter open complex: evidence that interactions with start site and downstream DNA induce sequential conformational changes in polymerase and DNA. *J. Mol. Biol.*, **283**, 741-756.
33. Cui J., Ni L., Somerville R. L., (1993) ATPase activity of TyrR, a transcriptional regulatory protein for σ^{70} RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13023-13025.
34. Daniels D, Zuber P, Losick R., (1990) Two amino acids in an RNA polymerase sigma factor involved in the recognition of adjacent base pairs in the -10 region of a cognate promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8075-9.
35. Darst S. A., (2001) Bacterial RNA polymerase. *Curent Opinion In Structural Biology.*, **11**, 155-162.
36. Darst S. A., Kubalek E. W., Edwards A. M., Kornberg R. D., (1991) Two-dimensional and epitaxial crystallization of a mutant form of yeast RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.*, **22**, 347-57.
37. Darst S. A., Kubalek E. W., Kornberg R. D., (1989) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron crystallography. *Nature*, **340**, 730-2.

38. Darst S. A., Opalka N., Chacon P., Polyakov A., Richter C., Zhang G., Wriggers W., (2002) Conformational flexibility of bacterial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4296-4301.
39. Darst S. A., Richter C., Zhang G., (1998) Structural studies of Escherichia coli RNA polymerase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **63**, 269-276.
40. Daube S. S., Peter H. von Hippel, (1999) Interactions of *Escherichia coli* σ^{70} within the transcription elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8390-8395.
41. Davis C. A., Bingman C. A., Landick R., Record T., Seaker R. M., (2007) Real-time footprinting of DNA in the first kinetically significant intermediate in open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7833-7838.
42. Davis C. A., Capp M. W., Record M. T. Jr, Saecker R. M., (2005) The effects of upstream DNA on open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 285-90.
43. DeHaseth P.L., Helamnn J.D., (1995) Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **63**, 269-276.
44. Devi P. G., Campell E. A., Darst S. A., Nickels B. E., (2010) Utilization of variably spaced promoter – like elements by the bacterial RNA polymerase holoenzyme during early elongation. *Mol. Microbiol.*, **75**, 607-622.
45. Dombroski A. J., (1997) Recognition of the –10 promoter sequence by a partial polypeptide of σ^{70} *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3487-3494.
46. Dombroski A. J., Johnson B. D., Lonetto M., Gross C. A., (1996) The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8858-8862.
47. Dombroski A. J., Walter W. A., Gross C. A., (1993) Amino-terminal amino acids modulate σ -factor DNA-binding activity. *Genes & Development*, **7**, 2446-2455.
48. Dombroski A. J., Walter, W. A., Gross, C. A., (1993) The role of the sigma subunit in promoter recognition by RNA polymerase. *Cell. Mol. Biol. Res.*, **39**, 311-317.
49. Dombroski A. J., Walter W. A., Record M. T., Siegele D. A., Gross C. A., (1992) Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor σ^{70} exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell*, **70**, 501-512.
50. Ebricht R. H., Busby S., (1995) The Escherichia coli RNA polymerase α subunit: structure and function. *Current Opinion in Genetics and Development*, **5**, 197-203.

51. Eichenberger P, Déthiollaz S, Buc H, Geiselman J., (1997) Structural kinetics of transcription activation at the malT promoter of Escherichia coli by UV laser footprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 9022-7.
52. England P., Westblade L. F., Karimova V., Robbe-Saule F., Norel A., Kolb J., (2008) Binding of the unorthodox transcription activator, Crl, to the components of the transcription machinery. *J. Biol. Chem.*, **283**, 33455-64.
53. Epstein W. & Beckwith J. R., (1968) Regulation o gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **37**, 411-436
54. Estream S. T., Gaal T., Ross T. G., Gourse R. L., (1998) Identfyication of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9761-9766.
55. Fakuda R., Ishihama A., (1974) Subunits of RNA polymerase in function and structure. *J. Mol. Biol.*, **87**, 523-541.
56. Fenton M. S., Lee S. J., Gralla J. D., (2000) *Escherichia coli* promoter opening and -10 recognition: Mutational analysis of σ^{70} . *EMBO J.*, **19**, 1130-1137.
57. Fenton M. S., Gralla J. D., (2001) Function of the bacterial TATAAT -10 element as single-stranded DNA during RNA polymerase isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9020-9025.
58. Finn R. D., Orlova E., Gowen B., Buck M., van Heel M., (2000) *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures. *EMBO J.*, **19**, 6833-6844.
59. Fisher R., Blumenthal T., (1980) Analysis of RNA polymerase by tripsin cleavage. *J. Biol. Chem.*, **255**, 11056-11062.
60. Fredrick K., Helmann J. D., (1997) RNA polymerase sigma factor determines start- site selection but is not required for upstream promoter element activation on heteroduplex (bubble) templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4982-4987.
61. Fried M., Crothers D. M., (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic. Acids. Res.*, **9**, 6505-25.
62. Gardella T., Moye H., Susskind M. M., (1989) A mutant *Escherichia coli* σ^{70} subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Biol. Chem.*, **206**, 579-590.
63. Garner M. M., Revzin A., (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic. Acids Res.*, **9**, 3047-60.
64. Geszvain K., Landick R., The structure of bacterial RNA polymerase (2003) *The Bacterial Chromosome* (N. P. Higgins, ed.), American Society of Microbiology, Washington. www.bact.wisc.edu/landick

-
65. Geszvain K., Gruber T. M., Mooney R. A., Gross C. A., Landick R., (2004) A hydrophobic patch on the flap-tip helix of E.coli RNA polymerase mediates sigma (70) region 4 function. *J. Mol. Biol.*, **343**, 569-87.
66. Gilbert W., (1976) In: Losick, R. and Chamberlin, M. (eds.), RNA polymerase, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 193 -205.
67. Gill S. C., Weitzel S. E., von Hippel P. H., (1991) Escherichia coli sigma 70 and NusA proteins. I. Binding interactions with core RNA polymerase in solution and within the transcription complex. *J. Mol. Biol.*, **220**, 307-324.
68. Gopal V., Ma H., Kurman M. K. and Chatterji D., (1994) A point mutation at the junction of domain 2.3/2.4 of transcription factor σ^{70} abrogates productive transcription and restores its expected mobility on a denaturing gel. *J. Mol. Biol.*, **242**, 9-22.
69. Gourse R. L., Ross W., Gaal T., (2000) UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.*, **37**, 687-95.
70. Gourse R. L., Ross W., Rutherford S. T., (2006) General pathway for turning on promoters transcribed by RNA polymerases containing alternative sigma factors. *J. Bacteriol.*, **188**, 4589-91.
71. 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.
72. Greiner D. P., Hughes K. A., Gunasekera A. H., Meares C. F., (1996) Binding of the σ^{70} protein to the subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, studied iron-EDTA protein footprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 71-75.
73. Gribskov M., Burgess R. R., (1983) Overexpression and purification of the sigma factor of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene*, **26**, 109-118.
74. Gross C. A., Chan C., Dombrowski A., Gruber T., Sharp M., Tupy J., Young B., (1998) The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harbor Laboratory Press LXIII*, 141-155.
75. Gruber T. M., Bryant D. A., (1997) Molecular systematic studies of eubacteria, using σ^{70} – type sigma factors of group 1 and group 2. *J. Bacteriol.*, **179**, 1734-1747.
76. Gruber T. M., Gross C. A., (2002) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 441-466.
77. Gruber T. M., Markov D., Sharp M. M., Young B. A., Zhong H. J., Artsimovitch I., Geszvain K. M., Arthur T. M., Burgess R. R., Landick R., Severinov K., Gross C. A., (2001) Binding of the initiation factor σ^{70} to core RNA polymerase is multistep process. *Mol. Cell*, **8**, 21-31.

-
78. Guo Y., Gralla J. D., (1998) Promoter opening via a DNA fork junction binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11655-60.
79. Hampsey M., (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 465-503.
80. Hansen U. M., McClure W. R., (1979) A noncycling activity assay for the σ subunit *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5713-5717.
81. Hansen U. M., McClure W. R., (1980) Role of the sigma subunit *Escherichia coli* RNA polymerase in initiation. Release of sigma from ternary complexes. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9564-9570.
82. Haugen S. P., Berkmen M. B., Ross W., Gaal T., Ward Ch., (2006) rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of σ region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, **125**, 1069-1082.
83. Haugen S. P., Ross W., Gourse R. L., (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature Rev. Microbiol.*, **6**, 507-19.
84. Hawley D. K., McClure W. R., (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2237-2255.
85. Harley C. B., and Reynolds R. P., (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2343-2361.
86. Heil A., Ziling W., (1970) Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunit as tool for the elucidation of the role of subunits in transcription. *FEBS LETTERS*, **11**, 165-168.
87. Helmann J. D., (1991) Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.*, **5**, 2875-2882.
88. Helmann J. D., (1999) Anti-sigma factors. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 135-41.
89. Helmann J. D., Chamberlin M. J., (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 839-872.
90. Hernandez V. J., Cashel M., (1995) Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* σ^{70} mediate ppGpp-dependent function *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, **252**, 536-549.
91. Hernandez V. J., Hsu L. M., and Cashel M., (1996) Conserved region 3 of *Escherichia coli* σ^{70} is implicated in the process of abortive transcription. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18775-18779.
92. Heumann, H., Metzger, W., and Niehorester, M., (1986) Visualization of intermediary transcription states in the complex between *Escherichia coli* DNAdependent RNA

- polymerases and a promoter-carrying DNA fragment using the gel retardation method. *Eur. J. Biochem.*, **158**, 675-679.
93. Heumann H., Ricchetti M., Werel W., (1988) DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* induces bending or an increased flexibility of DNA by specific complex formation. *EMBO J.*, **7**, 4379-81.
94. Heyduk E., Heyduk T., (1999) Architecture of a complex between the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase and nontemplate strand oligonucleotide. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3315-3322.
95. Heyduk T., Heyduk E., Severinov K., Tang H., Ebright R. H., (1996) Determinants of RNA polymerase alpha subunit for interaction with beta, beta', and sigma subunits: hydroxyl-radical protein footprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10162-10166.
96. Hinton D. M., Molecular gymnastics: distortion of an RNA polymerase σ factor. (2005) *Trends in Microbiol.*, **13**, 140-143.
97. Hook-Bernard I. G., Hinton D. M., (2009) The promoter spacer influences transcription via σ^{70} region 1.1 *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 737-742.
98. Igarashi K., Fujita N., Ishihama A., (1991) Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **218**, 1-6.
99. Ishihama A., (1981) Subunit of assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Adv. Biophys.*, **14**, 1-35.
100. Ishihama A., (1986) Transcription signals and factors in *Escherichia coli*. *Adv. Biophys.*, **21**, 163-173.
101. Ishihama A., (1988) Promoter selectivity of prokaryotic RNA polymerases. *Trends Genet.* **4**, 282-6.
102. Ishihama A., (1990) Molecular assembly and functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Adv. Biophys.* **26**, 19-31.
103. Jacob L., (1996) Chromatografia powinowactwa z udziałem chelatowo związanych jonów metali. *GIT (Wydanie polskie)*, **177**, 36-39.
104. Jeon Y. H., Yamazaki T., Otomo T., Ishihama A., Kyogoku Y., (1997) Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. *J. Mol. Biol.*, **267**, 953-62.
105. Jin D. J., Gross C. A., (1988) Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.*, **202**, 45-58.

106. Jin R., Sharif K. A., Krakow J. S., (1995) Evidence for contact between the cyclic AMP receptor protein the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19213-19216.
107. Jishage M., Ishihama A., (1998) A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4953-4958.
108. Jones C. H., Moran C. P. Jr., (1992). Mutant σ factor blocks transition between promoter binding and initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1958-1962.
109. Joo D. M., Ng N., Calendar R., (1997) A σ^{32} mutant with a single amino acid change in the highly conserved region 2.2 exhibits reduced core RNA polymerase affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4907-4912.
110. Joo D. M., Nolte A., Calendar R. Zhou Y. N., Jin D. J., (1998) Multiple regions on the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} determine core RNA polymerase binding specificity. *J. Bacteriol.*, **180**, 1095-102.
111. Juang Y. L., Helmann J. D., (1994) A promoter melting region in the primary sigma factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic amino acids. *J. Mol. Biol.*, **235**, 1470-88.
112. Juang Y. L., Helmann J. D., (1994) The delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. An allosteric effector of the initiation and core-recycling phases of transcription. *J. Mol. Biol.*, **239**, 1-14.
113. Karow M. L., Glaser P., Piggot P. J., (1995) Identification of a gene, *spoIIR*, that links the activation of σ^E to transcriptional activity of σ^F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2012-2016.
114. Kashlev M., Martin E., Polyakov A., Severinov K., Nikiforov V., Goldfarb A., (1993) Histidine-tagged RNA polymerase: dissection of the transcription cycle using immobilized enzyme. *Gene*, **130**, 9-14.
115. Kobayashi M., Nagata K., Ishihama A., (1990) Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: effect of base substitutions in the promoter -35 region on promoter strength. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7367-7372.
116. Kolasa I. K., Łoziński T., Wierzchowski K. L., (2003) Effects of distortions by A-tracts of promoter B-DNA spacer region on the kinetics of open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Acta. Biochim. Pol.*, **50**, 909-20.
117. Kroos L., Yu Y. T., (2000) Regulation of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* development. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 553-560.

118. Krummel B., Chamberlin M. J., (1989) RNA chain initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Structural transitions of the enzyme in early ternary complexes. *Biochemistry*, **28**, 7829-42,
119. Kudo T., Doi R. H., (1981) Free σ factor of *Escherichia coli* RNA polymerase can bind to DNA. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9778-9781.
120. Kumar A., Grimes B., Fujita N., Makino R. A., Hayward R. S., Ishihama A., (1994) Role of the sigma 70 subunit *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription activation. *J. Mol. Biol.*, **235**, 405-413.
121. Kumar A, Malloch R. A., Fujita N., Smillie D. A., Ishihama A., Hayward R. S., (1993) The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J Mol Biol.*, **232**, 406-18.
122. Kurabachew M., Lu S. H., Krastel P., Schmitt E. K., Suresh B. L., Goh A., Knox J. E., Ma N. L., Jiricek J., Beer D., Cynamon M., Petersen F., Dartois V., Keller T., Dick T., Sambandamurthy V. K., (2008) Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **62**, 713-719.
123. Kusano S., Ding Q., Fujita N., Ishihama A., (1996) Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ holoenzymes. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1998-2004.
124. Kuznedelov K., Korzheva, N., Mustaev, A., and 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.
125. Kuznedelov K., Minakhin L., Niedziela-Majka A., Dove S. L., Rogulja D., Nickels B. E., Hochschild A., Heyduk T., Severinov K., (2002) A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the sigma subunit in promoter recognition. *Science*, **295**, 855-7.
126. Lambert L. J., (2004) T4 AsiA blocks DNA recognition by remodeling sigma (70) region 4. *EMBO J.*, **23**, 2952-2962.
127. Landick R, Stewart J, Lee D. N., (1990) Amino acid changes in conserved regions of the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase alter transcription pausing and termination. *Genes Dev.*, **4**, 1623-36.
128. Lesley S. A., Burgess R. R., (1989) Characterization of the *Escherichia coli* transcription factor σ^{70} : localisation of a region involved in the interaction with core RNA polymerase. *Biochemistry*, **28**, 7728-7734.

129. Li M., Moyle H., Susskind M. M., (1994) Target of the transcriptional activation function of phage lambda cI protein. *Science*, **263**, 75-77.
130. Lisser S., Margalit H., (1997) Compilation of E. coli mRNA promoter sequences. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1507-1516.
131. Lonetto M., Gribskov M., Gross C. A., (1992) The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationship. *J. Bacterol.*, **174**, 3843-3849.
132. Lonetto M. A., Rhodius V., Lamberg K., Kiley P., Busby S., Gross C., (1998) Identification of contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit. *J. Mol. Biol.*, **284**, 1353-1365.
133. López de Saro F. J., Woody A. Y., Helmann J. D., (1995) Structural analysis of the *Bacillus subtilis* delta factor: a protein polyanion which displaces RNA from RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **252**, 189-202.
134. Losick R., Pero J., (1981) Cascades of sigma factors. *Cell*, **25**, 582-584.
135. Lowe P.A., Hager D.A., Burgess R.R., (1979) Purification and properties of the σ subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase. *Biochemistry*, **18**, 1344.
136. Łozinski T., Markiewicz W. T., Wyrzykiewicz T. K., Wierzchowski K. L., (1989) Effect of the sequence-dependent structure of the 17 bp AT spacer on the strength of consensuslike *E. coli* promoters in vivo. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3855-63.
137. Łozinski T., Adrych-Rożek K., Markiewicz W. T., Wierzchowski K. L., (1991) Effect of DNA bending in various regions of a consensus-like *Escherichia coli* promoter on its strength in vivo and structure of the open complex in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **19** (11), 2947-53.
138. Łoziński T., Wierzchowski K. L., (1996) Effect of reversed orientation and length of An.Tn DNA bending sequences in the -35 and spacer domains of a consensus-like *Escherichia coli* promoter on its strength in vivo and gross structure of the open complex in vitro. *Acta. Biochim. Pol.*, **43**, 265-79.
139. MacClure W. R., (1980) Rate-limiting steps in RNA chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5634-8.
140. MacClure W. R., (1985) Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 171-204.
141. Magnusson L. U. Farewell A., Nyström T., (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiol.*, **13**, 236-242.
142. Malhotra A., Severinova E., Darst S. A., (1996) Crystal structure of σ^{70} subunit fragment from *E. coli* RNA polymerase. *Cell*, **87**, 127-136.

143. Markov D., Naryshikina T., Mustaev A., Severinov K., (1999) A zinc-binding site in the largest subunit of DNA -dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes Dev.*, **13**, 2439-2448.
144. Marr M. T., Roberts J. W., (1997) Promoter recognition as measured by binding of polymerase to nontemplate strand oligonucleotide. *Science*, **276**, 1258-60.
145. Mathew R., Chatterji D., (2006) The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends in Microbiol.*, **14**, 450-455.
146. Mecsas J., Cowing D. W., Gross C. A., (1991) Development of RNA polymerase-promoter contacts during open complex formation. *J. Mol. Biol.*, **220**, 585-97.
147. Mekler V., Kortkhonjia E., Mukhopadhyay J., Knight J., Revyakin A., Kapanidis N., Niu W., Ebright Y. W., Levy R., and Ebright R. H., (2002) Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*, **108**, 599-614.
148. Merrick M. J., (1993) In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol. Microbiol.*, **10**, 903-909.
149. Metzger W., Schickor P., Meier T., Werel W., Heumann H., (1993) Nucleation of RNA chain formation by Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **232**, 35-49.
150. Minakhin L., Bhagat S., Brunning A., Campbell E. A., Darst S. A., Ebright R. H., Severinov K., (2001) Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 892-7.
151. Mooney R. A., Darst S. A., Landick R., (2005) Sigma and RNA polymerase an on-again, off -again relationship? *Mol. Cell*, **20**, 335-345.
152. Mukherjee K, Chatterji D., (1997) Studies on the omega subunit of Escherichia coli RNA polymerase--its role in the recovery of denatured enzyme activity. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 884-9.
153. Mukhopadhyay J., Kapanidis A. N., Mekler V., Kortkhonjia E., Ebright Y. W., Ebright R. H., (2001) Translocation of σ^{70} with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. *Cell*, **106**, 453-463.
154. Murakami K. S, Darst S. A., (2003) Bacterial RNA polymerases: the whole story, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 31-39.
155. Murakami K. S., Masuda S., Campbell E. A., Muzzin O., Darst S., (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, **296**, 1285-1290.

156. Murakami K. S., Masuda S., Darst S., (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science*, **296**, 1280-1284.
157. Mustaev A., Zaychikov E., Severinov K., Kashlev M., Polyakov A., Nikiforov V., Goldfarb A., (1994) Topology of the RNA polymerase active center probed by chimeric rifampicin-nucleotide compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12036-40.
158. Nagai H., Shimamoto N., (1997) Regions of the *Escherichia coli* primary sigma factor σ^{70} that are involved in interaction with RNA polymerase core enzyme. *Genes cell*, **2**, 725.
159. Naryshin N., Revyakin A., Kim Y., Mekler V., Ebright R. H., (2000) Structural organization of the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*, **101**, 601-11.
160. Nechaev S., Severinov K., (2008) RepA: completing the transcription cycle? *Structure*, **16**, 1294-1295
161. Negre D., Bonod-Bidaud Ch., Oudot Ch., Prost J-F., Kolb A., Ishihama A., Cozzone A. J., Cortay J-C., (1997) DNA Flexibility of the UP element is a major determinant for transcriptional activation at the *Escherichia coli* acetate promoter. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 713-718.
162. Nickels B. E., Garrity S. J., Mekler V., Minakhin L., Severinov K., Ebright R. H., Hochschild A., (2005) The integration between σ^{70} and the β – flap of *Escherichia coli* RNA polymerase inhibits extension of nascent RNA during early elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4488-4493.
163. Niedziela-Majka A., Heyduk T., (2005) *Escherichia coli* RNA polymerase contacts outside the -10 promoter element are not essential for promoter melting. *J. Biol. Chem.*, **280**, 38219-38227.
164. Owens J. T., Chmura A. J., Murakami K., Fujita N., Ishihama A., Meares C. F., (1998) Mapping the promoter DNA sites proximal to conserved regions of sigma 70 in an *Escherichia coli* RNA polymerase-lacUV5 open promoter complex. *Biochemistry*, **37**, 7670-5.
165. Owens J. T., Miyake R., Murakami K., Chmura A. J., Fujita N., Ishihama A., Meares C., (1998). Mapping the σ^{70} subunit contact sites on *Escherichia coli* RNA polymerase with a σ^{70} - conjugated chemical protease. *Proc. Natl. Sci. USA*, **95**, 6021-6026.
166. Qiu J., Helmann J. D., (1999) Adenines at -11, -9 and -8 play a key role in the binding of *Bacillus subtilis* σ^{70} RNA polymerase to -10 region single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4541-4546.
167. 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**, 757-67.

168. Patikoglou G. A., Westblade L. F., Campell E. A., Lamour V., Lane W. J., Darst S. A., (2007) Cristal structure of the Escherichia coli regulator σ^{70} , Rsd, in complex with σ^{70} domain 4. *J. Mol. Biol.*, **372**, 649-659.
169. Pati U. K., (1994) Human RNA polymerase II subunit hRPB14 is homologous to yeast RNA polymerase I, II, and III subunits (AC19 and RPB11) and is similar to a portion of the bacterial RNA polymerase alpha subunit. *Gene*, **145**, 289-92.
170. Perdue S. A., Roberts J. W., (2010) A backtrack-inducing sequence is an essential component of Escherichia coli $\sigma(70)$ -dependent promoter-proximal pausing. *Mol. Microbiol.*, **78**, 636-50.
171. Perdue S. A., Roberts J. W., (2011) $\Sigma(70)$ -dependent transcription pausing in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, **412**, 782-92.
172. Pribnow D., (1975) Bacteriophage T7 early promoters: Nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. *J. Mol. Biol.*, **99**, 419-426.
173. Pribnow D., (1975) Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc. Natl. Sci. USA*, **72**, 784-788.
174. Reppas N. B., Wade J. T., Chruch G., Struhl K., (2006) The transition between transcriptional initiation and elongation in E. coli is often rate-limiting, variable, and associated with rapid release of σ^{70} . *Mol. Cell*, **24**, 747-757.
175. Roberts J., Park J. S., (2004) Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 120-5.
176. Roberts C. W., Roberts J. W., (1998) Base-specific recognition o the nontemplate strand of promoter DNA by E. coli RNA polymerase. *Cell*, **86**, 495.
177. Ross W., Aiyar S. E., Salomon J., Gourse R. L., (1998) Escherichia coli promoters with UP elements of different strength: modular structure of bacterial promoters. *J. Bacteriol.*, **180**, 5375-5383.
178. Ross W., Gosink K. K., Salomon J., Igarashi K., Zou C., Ishihama A., Severinov K., Gourse R. L., (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science*, **262**, 1407-1413.
179. Saecker R. M., Tsodikov O. V., McQuade K. L., Schlax P. E. Jr., Capp M. W., Record M. T. Jr., (2002) Kinetic studies and structural models of the association of E. coli sigma(70) RNA polymerase with the lambdaP(R) promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates. *J. Mol. Biol.*, **319**, 649-671.
180. Saecker R. M., Davis C. A., Record M. T. Jr., (2006) Do sigma factors need help with a meltdown? *Cell*, **127**, 256-8.

181. Saecker R. M., Record M. T. Jr., deHaseth P. L., (2011) Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase – promoter binding, isomerization to initiation - competent open complexes, and initiation of RNA synthesis. *J. Mol. Biol.*, **412**, 754-771.
182. Savery N. J., (2007) The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends in Microbiol.*, **15**, 326-333.
183. Schickor P., Metzger W., Werel W., Lederer H., Heumann H., (1990) Topography of intermediates in transcription initiation of *E. coli*. *EMBO J.*, **9**, 2215-20.
184. Schroeder L. M., Karpen M. E., deHaseth P. L., (2008) Threonine 429 of *Escherichia coli* σ^{70} is a key participant in promoter DNA melting by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **376**, 153-165.
185. Sclavi B., Zaychikov E., Rogozina A., Walther F., Buckle M., Heumann H., (2005) Real-time characterization of intermediates in the pathway to open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase at the T7A1 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4706-11.
186. Sen R., Nagai H., Hernandez V. J., Shimamoto N., (1998) Reduction in abortive transcription from the lambdaPR promoter by mutations in region 3 of the sigma70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 9872-7.
187. Serizawa H., Conaway J. W., Conaway R. C., (1994) Transcription initiation mammalian RNA polymerase II. In R.C. Conaway and J.W. Conaway (eds) *Transcription: Mechanisms and Regulation*. Raven Press, Ltd., New York.
188. Severinov K., (2000) RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opinion of Microbiol.*, **3**, 118-125.
189. Severinov K., Fenyö D., Severinova E., Mustaev A., Chait B. T., Goldfarb A., Darst S. A., (1994) The σ subunit conserved region 3 is part of “5’-face” of active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20826-20828.
190. Severinov K., Markov D., Severinova E., Nikiforov V., Landick R., Darst S. A., Goldfarb A., (1995) Streptolydigin-resistant mutants in an evolutionarily conserved region of the beta' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23926-9.
191. Severinova E., Severinov K., Fenyö D., Marr M., Brody E. N., Roberts J. W., Chait B. T., and Darst S. A., (1996). Domain organization of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit. *J. Mol. Biol.*, **263**, 637-647.
192. Sevostyanova A., Fekllstov A., Barinova N., Heyduk E., Bass I., Kllmašauskas, Heydu T., Kulbachlnskly A., (2007) Specific recognition of the -10 promoter element by the free RNA polymerase σ subunit. *J. Biol. Chem.*, **282**, 22033-22039.

193. Shaner S. L., Piatt D. M., Wensley C. G., Yu H., Burgess R. R., Record M. T. Jr., (1982) Aggregation equilibria of *Escherichia coli* RNA polymerase: evidence for anion-linked conformational transitions in the promoters of core and holoenzyme. *Biochemistry*, **21**, 5539-5551.
194. 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
195. Shimamoto N., Kamigochi T., Utiyama H., (1986) Release of the subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase depends mainly on time elapsed after the start of initiation, not on length of product RNA. *J. Biol. Chem.*, **261**, 11859-11865.
196. Shuler M. F., Tatti K. M., Wade K. H., Moran C. P. Jr., (1995) A single amino acid substitution in σ^E affects its ability to bind core RNA polymerase. *J. Bacteriol.*, **177**, 3687-3694.
197. Siebenlist, U., and Gilbert, W., (1980) Contacts between *Escherichia coli* RNA polymerase and early promoter of phage T7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 122- 126.
198. Siegele D. A., Hu J. C., Walter W. A., Gross C. A., (1989) Altered promoter recognition by mutant forms of the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 591-603.
199. Staroń A., Grabowska A., Jagusztyn-Krynicka E. K., (2008) Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek w komórkach *Escherichia coli*. *Post. Mikrobiol.*, **47**, 83-95.
200. Stefano J. E., Gralla J. D., (1982) Spacer mutations in the lac p^S promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1069-1072.
201. Stragier P., Losick R., (1990) Cascades of sigma factors revisited. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1801-1806.
202. Straney D. C., Crothers D. M., (1987) A stressed intermediate in the formation of stably initiated RNA chains at the *Escherichia coli* lac UV5 promoter. *J. Mol. Biol.*, **193**, 267-278.
203. Strickland M. S., Thompson N. E., Burgess R. R., (1988) Structure and function of *Escherichia coli* RNA polymerase. Monoclonal antibodies: localization of epitopes by peptide mapping and effects on transcription. *Biochemistry*, **27**, 5755-5762.
204. Sweetser D., Nonet M., Young R. A., (1987) Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1192-6.
205. Svejstrup J. Q., (2002) Transcription repair coupling factor: a very pushy enzyme. *Mol. Cell*, **9**, 1151-1160.

206. Svetlov V., Nolan K., Burgess R. R., (1998) Rpb3, stoichiometry and sequence determinants of the assembly into yeast RNA polymerase II in vivo. *J. Biol. Mol.*, **273**, 10827-30.
207. 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
208. Szoke A. P., Allen T. L., and deHaseth P. L., (1987) Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase: effects of base substitution in the -10 and -35 regions. *Biochemistry*, **26**, 6188-6194.
209. Tachibana H., Ishihama A., (1985) Correlation between the rate of productive transcription initiation and the strand-melting property of *Escherichia coli* promoters. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 9031-42.
210. Tatti K. M., Moran C. P. Jr., (1995) σ^E to σ^B specificity by amino acid substitutions in its -10 binding region. *J. Bacterol.*, **177**, 6506-6509.
211. Tatti K. M., Shuler M. F., Moran C. P. Jr., (1995) Sequence-specific interactions promoter DNA and the RNA polymerase sigma factor E. *J. Mol. Biol.*, **253**, 8-16.
212. Tang H., Severinov K., Goldfarb A., Ebright R., (1995) Rapid RNA polymerase genetics: one-day, no-column preparation of reconstituted recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Sci. USA*, **92**, 4902-4906.
213. Tedin K, Bremer H., (1992) Toxic effects of high levels of ppGpp in *Escherichia coli* are relieved by rpoB mutations. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2337-44.
214. Tomsic M., Tsujikawa L., Panaghie G., Wang Y., Azok J., deHaseth P. L., (2001) Different roles for basic and aromatic acids in conserved region 2 of *Escherichia coli* σ^{70} in the nucleation and maintenance of the single-stranded bubble in open RNA polymerase-promoter complexes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31891-31896.
215. Travers A. A, Burgess R. R., (1969) Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature*, **222**, 537-40.
216. Turecka Katarzyna, (2006) Analiza oddziaływań zmodyfikowanych w regionach -35 i -10 sekwencji promotora A1 faga T7 z polimerazą RNA *E. coli* w procesie inicjacji transkrypcji. Uniwersytet Medyczny w Gdańsku.
217. Vassylyev D. G., Sekine S., Laptenko O., Jookyung L., Vassylyeva M. N., (2002) Crystal structure of bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, **417**, 712-719.
218. Vendeville A., (2011) Spatial organization in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, **35**, 395-414.

219. von Hippel P. H., Bear D. G., Morgan W. D., McSwiggen J. A., (1984) Protein-nucleic acid interactions in transcription. *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 389-446.
220. von Hippel P. H., Bear, D. G., Winter R. B., Berg O. G., (1983) Molecular aspects of promoter function: an overview. In Rodriguez R.L. And Chamberlin M.J. (eds) Promoters: structure and function. Praeger Publishers, New York, pp. 3-33.
221. Voskuil M. I., Voepel K., Chambliss G. H., (1999) The -16 region, a vial sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **17**, 271-279.
222. Wade J. I, Struhl K., (2008) The transition from transcriptional initiation to elongation. *Current opinion in genetics & development*, **18**,130-136.
223. Wagner R., (2000) Transcription regulation in prokaryotes. Oxford University Press. Inc., New York.
224. Waldburger C., Gardella T., Wong R., Susskind M. M., (1990) Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* σ^{70} affecting promoter recognition. *J. Mol. Biol.*, **215**, 267-276.
225. Weilbaecher R., Hebron C., Feng G., Landick R., (1994) Termination-altering amino acid substitutions in the beta' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase identify regions involved in RNA chain elongation. *Genes Dev.*, **8**, 2913-27.
226. Werel W., Schickor P., Heuman H., (1991) Flexibility of the DNA enhances promoter affinity of *Escherichia coli* RNA polymerase. *EMBO J.*, **10**, 2589-2594.
227. Werner F., Grohmann D., (2011) Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life . *Microbiology*, **9**, 85-98.
228. Wigneshweraraj S. R., Fujita N., Ishihama A., Buck M., (2000) Conservation of sigma-core RNA polymerase relationships between the enhancer-independent sigma classes. *EMBO J.*, **19**, 3038-3048.
229. Wigneshweraraj S. R., Bose D., Burrows P. C., Joly N., Schumacher J., Rappas M., Pape T., Zhang X., Stockley P., Severinov K., Buck M., (2008) Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor. *Mol. Microbiol.* **68**, 538-546.
230. Wilson C., Dombroski A. J., (1997) Region 1 of σ^{70} is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **267**, 60-74.
231. Wösten M. M. S. M., (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS*, **22**, 127-150.

232. Wu F. Y.-H., Yarbrough L. R., Wu Ch.-W., (1976) Conformational transition of *Escherichia coli* RNA polymerase induced by interaction of σ subunit with core enzyme. *Biochemistry*, **15**, 3254-3258.
233. Xu J., McCabe B. C., Koudelka G. B. (2001) Function-based selection and characterisation of base-pair polymorphisms in a promoter of *Escherichia coli* RNA polymerase- σ^{70} . *J. Bacterol.*, **183**, 2866-2873.
234. Yager T. D., von Hippel P. H., (1987) Transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology* (eds). F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger, pp. 1241-1275. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
235. Yang B. A., Price C. W., (1995) Streptolydigin resistance can be conferred by alterations to either the beta or beta' subunits of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23930-23933.
236. Young B. A., Anthony L. C., Gruber T. M., Arthur T. M., Heyduk E., Burgess R. R., Gross C. A., (2001) A coiled-coil from RNA polymerase β' subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by σ^{70} . *Cell*, **105**, 935-944.
237. Young B. A., Gruber T. M., Gross C. A., (2002) View of transcription initiation. *Cell*, **109**, 417-420.
238. Zalenskaya K., Lee J., Gujuluva C.N., Shin Y. S., Slutsky M., Goldfarb A., (1990) Recombinant RNA polymerase: inducible overexpression, purification and assembly of *Escherichia coli* rpo gene products. *Gene*, **89**, 7-12.
239. Zaychikov E., Denissova L., Heumann H., (1995) Translocation of the *Escherichia coli* transcription complex observed in the registers 11 to 20: "jumping" of RNA polymerase and asymmetric expansion and contraction of the "transcription bubble". *Proc. Natl. Sci. USA*, **92**, 1739-1743.
240. Zaychikov E., Denissova L., Meier T., Götte M., Heumann H., (1997) Influence of Mg^{2+} and temperature on formation of the transcription bubble. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2259-2267.
241. Zenkin N., Kulbachinsky A., Yuzenkova Y., Mustaev A., Bass I., Severinov K., Brodolin K., (2007) Region 1.2 of the RNA polymerase σ subunit controls recognition of the -10 promoter element. *EMBO J.*, **26**, 955-964.
242. Zhang G, Darst S. A., (1998) Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit amino-terminal domain. *Science*, **281**, 262-6.
243. Zhang G., Campbell E. A., Minakhin L., Richter C., Severinov K., Darst S. A., (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA at 3.3 Å resolution. *Cell*, **98**, 811-824.

244. Zhou Y. N., Walter W. A., Gross C. A., (1992) A mutant sigma 32 with a small deletion in conserved region 3 of sigma has reduced affinity for core RNA polymerase. *J Bacteriol.*, **174**, 5005-12.
245. Zuber P., Healy J., Carter H. L., Cutting S., Moran C. P., Losick R., (1989) Mutation changing the specificity of RNA polymerase sigma factor. *J. Biol. Chem.*, **206**, 605-614.