



*ACADEMIA MEDICA GEDANENSIS
FACULTAS PHARMACEUTICA*

Katarzyna Turecka

**Analiza oddziaływań zmodyfikowanych w regionach -35
i -10 sekwencji promotora A1 faga T7 z polimerazą RNA
E. coli w procesie inicjacji transkrypcji**

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem dr hab. Władysława Werela
w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej
Akademii Medycznej w Gdańsku

Gdańsk 2006

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi **dr hab. Władysławowi Werelowi** za pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy, opiekę naukową i cierpliwość.*

Dziękuję również mgr Agnieszce Konopackiej i Bartłomiejowi Konopackiemu, bez których praca ta nie powstałaby w takiej formie oraz wszystkim pracownikom Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej.

Grzegorzowi

Spis treści

1. WSTĘP.....	5
1.1. Struktura i funkcja polimerazy RNA <i>Escherichia coli</i>	7
1.2. Struktura i funkcja promotora.....	10
1.3. Inicjacja transkrypcji.....	16
1.4. Rola regionów -35 i -10 promotora w procesie inicjacji transkrypcji.....	26
1.5. Polimeraza RNA jako cel działania antybiotyków.....	30
2. CEL PRACY.....	33
3. MATERIAŁY.....	34
3.1. Szczepy bakteryjne.....	34
3.2. Plazmidy	34
3.3. Pożywki.....	34
3.4. Bufory stosowane do enzymów.....	35
3.5. Enzymy.....	36
3.6. Startery	36
3.7. Nukleotydy.....	37
3.8. Roztwory do lizy alkalicznej.....	37
3.9. Roztwory wykorzystane do wytrącania DNA.....	37
3.10. Roztwory wykorzystane do przygotowania komórek kompetentnych	37
3.11. Roztwory wykorzystane do transformacji.....	38
3.12. Roztwory wykorzystane do hodowli bakterii i oczyszczania polimerazy RNA.....	38
3.13. Roztwory stosowane do badania oddziaływań białko DNA.....	38
3.14. Elektroforeza agarozowa DNA.....	40
3.15. Elektroforeza poliakryloamidowa białek.....	40
3.16. Elektroforeza w żelach sekwencyjnych.....	41
3.17. Żele.....	42
3.18. Złoża chromatograficzne.....	44
3.19. Odczynniki.....	45
3.20. Aparatura.....	46
4. METODY.....	47
4.1. Otrzymywanie fragmentów DNA metodą PCR.....	47
4.2. Izolacja plazmidu metodą lizy alkalicznej	48
4.3. Oczyszczanie i wytrącanie DNA metodą fenol-chloroform/alkohol etylowy.....	49
4.4. Cięcie plazmidowego DNA oraz fragmentów DNA enzymami restrykcyjnymi.....	50
4.5. Defosforylacja plazmidowego DNA.....	50
4.6. Ligacja.....	50
4.7. Przygotowanie komórek kompetentnych.....	51
4.8. Transformacja.....	52
4.9. Analiza otrzymanych transformantów.....	52
4.10. Elektroforeza w żelu agarozowym	52
4.11. Elektroforeza w niedenaturującym żelu poliakryloamidowym.....	53
4.12. Hodowla bakterii <i>E. coli</i> R120 i BL21– otrzymywanie polimerazy RNA zawierającej rozszerzenie oligohistydynowe związane z podjednostką β' lub α	53
4.13. Oczyszczanie polimerazy RNA.....	53
4.14. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących.....	56
4.15. Barwienie żeli białkowych roztworem azotanu srebra	56
4.16. Znakowanie starterów za pomocą $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.....	56
4.17. Badanie oddziaływań DNA z polimerazą RNA - reakcja tworzenia kompleksów ..	57
4.18. Transkrypcja <i>in vitro</i>	58

4.19	Cięcie kompleksów binarnych enzymami restrykcyjnymi.....	58
4.20	Footprint z wykorzystaniem nadmanganianu potasu (KMnO ₄).....	59
4.21	Sekwencjonowanie	59
4.22	Autoradiografia.....	60
5.	WYNIKI.....	61
5.1	Konstrukcja zmienionych w obrębie regionów -35 i -10 sekwencji promotora A1 bakteriofaga T7	61
5.2	Analiza oddziaływań fragmentów O ₋₃₅ , O ₋₁₀ , O _{1/2-10} , O _{-35/-10} i O _{-35/1/2-10} z holoenzymem polimerazy RNA <i>E. coli</i>	84
6.	DYSKUSJA.....	113
7.	STRESZCZENIE.....	124
8.	DODATEK.....	127
8.1.	Pisownia i skróty.....	127
8.2.	Sekwencja plazmidu pDS1 z fragmentem A1 wstawionym w miejscu cięcia enzymu <i>Bam</i> HI.....	129
9.	BIBLIOGRAFIA.....	131

1. WSTĘP

Jednym z najważniejszych mechanizmów regulacyjnych występujących w żywych organizmach jest kontrola ekspresji genów, która decyduje o przemianach zachodzących w komórkach. Regulacja ekspresji genów opisywana jest jako zdolność komórki do zmiany wzoru syntezy produkowanych makrocząsteczek na drodze ilościowej i jakościowej. Regulacji może podlegać każdy etap na drodze od genu do funkcjonalnego białka. Jednakże u bakterii dominującą rolę odgrywa regulacja na poziomie transkrypcji, mająca największy wpływ na właściwości biochemiczne komórki. Transkrypcja jest procesem przepisania informacji zapisanej w sekwencji DNA na cząsteczkę RNA, czyli syntezy RNA na matrycy DNA, katalizowanym przez enzym polimerazę RNA zależną od DNA. Struktura i mechanizmy kierujące procesem transkrypcji mają uniwersalny charakter, jednakże wykazują również znaczne różnice u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Podstawową różnicę pomiędzy tymi organizmami stanowi obecność wyspecjalizowanych polimeraz RNA. U organizmów eukariotycznych występują trzy odmienne klasy enzymu polimerazy RNA, określane jako polimeraza RNA I, II i III, które są odpowiedzialne za syntezę cząsteczek RNA pełniących odmienne funkcje (tab. 1.1).

Tab. 1.1 Funkcje eukariotycznych polimeraz RNA I, II i III.

<i>Polimeraza</i>	<i>Transkrybowane geny</i>
Polimeraza RNA I	Geny kodujące 28S, 5,8S i 18S rRNA
Polimeraza RNA II	Geny kodujące białka; geny kodujące większość małych jądrowych RNA (snRNA)
Polimeraza RNA III	Geny kodujące tRNA, 5S rRNA, U6-sn-RNA, małe jądrowe RNA (snRNA) i małe cytoplazmatyczne RNA (scRNA)

U bakterii występuje jedna polimeraza RNA, która syntetyzuje różne rodzaje cząsteczek RNA. Dla organizmów tych charakterystyczny jest również brak wewnątrzkomórkowych barier, dlatego też wszystkie reakcje syntezy makrocząsteczek (replikacja, transkrypcja i translacja) zachodzą w komórce jednocześnie. W związku z tym każda reakcja replikacji, transkrypcji czy translacji wywiera bezpośredni wpływ na inne procesy. Powstające polipeptydy są syntetyzowane na rosnącym łańcuchu RNA, podczas gdy DNA jest replikowany. Opisany mechanizm, charakterystyczny dla organizmów prokariotycznych, zwany jest połączeniem transkrypcyjno – translacyjnym (TTP).

U organizmów eukariotycznych główne reakcje syntezy, takie jak: replikacja, transkrypcja czy translacja, zachodzą oddzielnie, ze względu na obecność barier w komórce. W związku z tym syntetyzowane cząsteczki mogą być transportowane lub przetwarzane zanim następny etap transferu informacji będzie osiągnięty. Z drugiej strony, organizmy prokariotyczne i eukariotyczne wykazują pewne podobieństwa. Istnieje wiele aspektów dotyczących mechanizmów transkrypcji mających uniwersalny charakter.

Transkrypcja, czyli synteza RNA na matrycy DNA, jest procesem wieloetapowym, obejmującym inicjację, elongację i terminację. W czasie **inicjacji** holoenzym polimerazy RNA rozpoznaje i wiąże się ze specyficznymi sekwencjami, zwanymi sekwencjami promotorowymi. **Elongacja** obejmuje stopniowe dodawanie przez polimerazę RNA monofosforanów rybonukleozydów do wolnej grupy OH, znajdującej na końcu 3' rosnącego łańcucha RNA. Każdej reakcji przyłączenia substratów towarzyszy uwalnianie pirofosforanu (PPi). Reakcja ta powtarzana jest wielokrotnie, aż do momentu, kiedy sekwencja odpowiedniej cząsteczki RNA jest kompletna. Rosnący łańcuch RNA ma sekwencję komplementarną do nici matrycowej DNA i identyczną z odpowiednią sekwencją nici niematrycowej z tym, że w miejscu tyminy wbudowany jest uracyl. **Terminacja** transkrypcji, określająca zakończenie procesu transkrypcji, następuje w momencie, kiedy polimeraza RNA osiągnie charakterystyczną sekwencję będącą sygnałem terminacji, w którym kompleks transkrypcyjny rozpada się i produkt RNA zostaje uwolniony /152, 155/.

Synteza RNA może być regulowana na wszystkich poziomach procesu transkrypcji, zarówno na poziomie lokalizacji promotora przez polimerazę RNA, jak i inicjacji, elongacji i terminacji. Regulacja na poziomie rozpoznania i wiązania promotora może być realizowana poprzez wprowadzenie zmian w topologii DNA lub jego konformacji, kontrolując w ten sposób siłę promotora. Siła promotora może być dalej modulowana przez wiązanie lub współzawodnictwo aktywatorów lub represorów w miejscach wiązania polimerazy do DNA. Także inne białka (np. różne czynniki sigma) mogą wiązać się bezpośrednio do rdzenia polimerazy i zmieniać względne powinowactwo holoenzymu polimerazy RNA do różnych promotorów. Natomiast regulacja na poziomie syntezy RNA może obejmować wiązanie różnych białek i małych cząsteczek ligandów efektorowych do transkrybującego kompleksu potrójnego, powodując w ten sposób: przedwczesne zakończenie procesu transkrypcji, antyterminację, spowolnienie lub oddziałuje w inny sposób na proces transkrypcji /50, 152/.

1.1. Struktura i funkcja polimerazy RNA *Escherichia coli*

Enzymem odpowiedzialnym za proces transkrypcji u *E. coli*, będącym głównym celem mechanizmów regulacyjnych na poziomie transkrypcji, jest **polimeraza RNA**. Enzym ten ma złożoną budowę i składa się z następujących podjednostek: α_2 , β , β' , ω oraz σ . Podjednostki α_2 , β , β' i ω tworzą tzw. **rdzeń polimerazy RNA** (masa cząsteczkowa 379 kDa), a rdzeń polimerazy RNA, wraz z podjednostką σ , stanowią **holoenzym polimerazy RNA** (masa cząsteczkowa 449 kDa), zdolny do zainicjowania procesu transkrypcji. Badania struktury enzymu wykorzystujące analizy krystalograficzne z zastosowaniem dyfrakcji elektronów pozwoliły na określenie wymiarów enzymu, wynoszących $\sim 150\text{\AA}$ (długość enzymu) \times $\sim 115\text{\AA}$ (wysokość) \times $\sim 100\text{\AA}$ (szerokość), a także jego kształtu przypominającego kleszcze kraba (ang. *crab claw*). Pomiędzy kleszczami znajduje się kanał o średnicy około 27\AA , w którego ścianie zlokalizowane jest centrum aktywne z zakotwiczonym jodem Mg^{2+} . Ten region polimerazy RNA zawiera aminokwasy najsilniej ewolucyjnie konserwowane wśród polimeraz RNA /26, 30, 32, 31, 32, 96, 97, 148, 166/. Jedną z domen podjednostki β' (domena $\beta'F$) wnika do kanału głównego i, współdziałając z domeną βG podjednostki β , wydziela mniejszy kanał (ang. *secondary channel*) o średnicy około $10\text{-}12\text{\AA}$, przez który prawdopodobnie wprowadzane są do centrum aktywnego trifosforany rybonukleozydów (NTP_s). Jedno ramię kleszczy i część podstawy kanału stanowi głównie **podjednostka β** (150 kDa) /107/, natomiast drugie ramię i pozostałą część podstawy kanału tworzy przede wszystkim podjednostka **β'** (155 kDa) (ryc. 1A). W ścianie kanału znajdują się reszty aminokwasów naładowanych dodatnio, natomiast zewnętrzna powierzchnia polimerazy RNA zawiera przewagę aminokwasów naładowanych ujemnie. **Podjednostka β'** odpowiedzialna jest także za wiązanie innych polianionów, m.in. heparyny. Charakterystyczna dla tej podjednostki jest także obecność domen wiążących dwa jony Zn^{2+} ($\beta'ZBD$, ang. *$\beta' \text{Zn}^{2+}$ Binding Domain*). Jedną z tych domen zlokalizowana jest na zewnątrz kanału i jest prawdopodobnie ważnym elementem w procesie przyjmowania właściwej struktury (ang. *folding*) przez podjednostkę β' /48/. Domena *clamp* (pokrywa) podjednostki β' , tworząca jedno z ramion kleszczy otaczających kanał główny, nie jest domeną sztywną i może zmieniać położenie, zmniejszając np. średnicę kanału głównego. Pozwala to na ściślejsze trzymanie DNA w kompleksie otwartym lub hybrydu DNA-RNA w kompleksie elongacyjnym, w kanale głównym. Drugie ramię kleszczy, utworzone przez podjednostkę β , stanowią dwie mobilne domeny, zwane *lobe* (płat) i *protrusion* (występ, uwypuklenie), których ruch może powodować

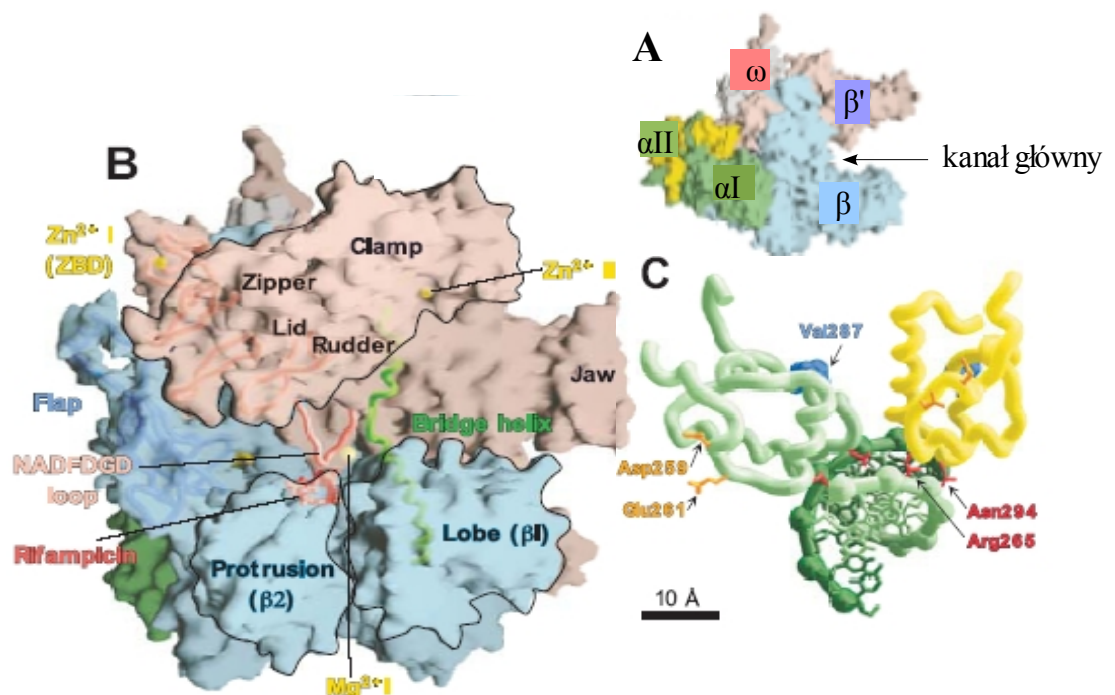
otwieranie i zamykanie kanału głównego. Kolejna domena podjednostki β , zwana domeną *flap* (klapa), częściowo przesłania kanał, przez który wychodzi syntetyzowane RNA /97, 166/. Miejsce wiążące dla antybiotyku rifampicyny znajduje się w ścianie kanału głównego, w odległości około 12 Å od centrum aktywnego. Przyłączenie antybiotyku do tak zlokalizowanego miejsca blokuje wzrost łańcucha RNA po zsyntetyzowaniu dwóch, trzech nukleotydów. *Bridge helix*, o strukturze α helisy, przechodzi przez kanał główny blisko centrum aktywnego łącząc ze sobą dwa ramiona kleszczy utworzone przez podjednostki β i β' . Zgodnie z modelem przedstawionym na ryc. 1B, powyżej miejsca wiązania antybiotyku rifampicyny znajduje się charakterystyczna domena białka, określana jako β' *rudder* (ster). Domena ta dzieli kanał główny na dwa inne kanały. Pierwszy z nich to kanał, przez który wychodzi syntetyzowane RNA (kanał dla produktu), a w drugim znajduje się nić matrycowa zmierzająca w kierunku miejsca hybrydyzacji z nicią niematrycową. Kanał ten jest utworzony przez domenę *lobe* (płat) podjednostki β i domenę *jaw* (szczęka) podjednostki β' (ryc. 1B) / 48/.

Dwie identyczne **podjednostki α** , tworzące dimer, oraz podjednostka ω zajmują w kompleksie z promotorowym DNA położenie dystalne w stosunku do kierunku transkrypcji. Podjednostka ω zlokalizowana jest w pobliżu C-końcowego fragmentu β' , szczególnie silnie oddziałując z konserwowanymi regionami D i G tej podjednostki (ryc. 1A). Jedna podjednostka α (αI) oddziałuje z podjednostką β , druga (αII) - z β' , podobnie jak ω , odpowiadając tym samym za montaż rdzenia polimerazy RNA, przebiegający według poniższego schematu.

- 1) $\alpha I + \alpha II \rightarrow \alpha_2$
- 2) $\alpha_2 + \beta \rightarrow \alpha_2 \beta$
- 3) $\alpha_2 \beta + \beta' \rightarrow \alpha_2 \beta \beta'$

Pierwszy tworzy się dimer podjednostek α , który kolejno przyłącza podjednostki β i β' /155/. Podjednostka α zawiera dwie funkcjonalne domeny: domenę C-końcową (αCTD ; ang. *C-terminal domain*) i domenę N-końcową (αNTD ; ang. *N-terminal domain*), połączone giętym łącznikiem o długości 14 aminokwasów, który prawdopodobnie pozwala C-końcowej domenie podjednostki α na elastyczne przyjmowanie określonej orientacji względem pozostałej części polimerazy /33, 46, 99/. C-końcowa domena podjednostki α odpowiedzialna jest za oddziaływania polimerazy RNA z sekwencją

promotora (tzw. element UP), znajdującą się w rejonie około od 40 do 60 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. W tym rejonie α CTD oddziałuje z grupami funkcyjnymi zasad ekspanowanymi do bruzdy mniejszej DNA oraz za oddziaływania z białkami regulującymi aktywność polimerazy RNA (aktywatory, represory), wykazującymi powinowactwo do sekwencji zlokalizowanych powyżej (ang. *upstream*) rdzenia promotora (ryc. 1C) /49, 121/. Natomiast N-końcowa domena odpowiada za dimeryzację podjednostek α oraz oddziaływania z podjednostkami β i β' /99, 167/. Wśród różnych **podjednostek σ** występujących u *Escherichia coli*, za transkrypcję większości genów w standardowych warunkach wzrostu przede wszystkim odpowiada σ^{70} . W podjednostce tej można wyróżnić cztery konserwowane ewolucyjnie regiony, mianowicie 1.1-1.2, 2.1-2.4, 3.0-3.2 i 4.1-4.2, połączone giętym łącznikiem /132, 17/. Regiony te są odpowiedzialne za oddziaływanie z rdzeniem polimerazy RNA, rozpoznanie i wiązanie sekwencji promotorowych, a także „topnienie” DNA.



Ryc. 1. Struktura rdzenia polimerazy RNA (model otrzymano w oparciu o analizę krystalograficzną przeprowadzoną dla holoenzymu *T. thermophilus* i rdzenia *T. aquaticus*) – (A) Model przedstawiający układ podjednostek α , β , β' i ω polimerazy RNA widoczny od dystalnej strony enzymu. Na rysunku dobrze widoczny jest charakterystyczny kształt szcęk kraba utworzonych przez β i β' ; (B) widok kanału głównego. Podjednostki przedstawiono w postaci jednolitych powierzchni z wyjątkiem domeny wiążącej Zn^{2+} (ZBD); Domeny podjednostki β' : wiążąca jony Mg^{2+} (*loop*), *rudder*, *lid* i *zipper* występują w postaci różowych pętli w częściowo przezroczystej powierzchni. Domenę *flap* podjednostki β przedstawiono w postaci ciemnoniebieskiej pętli w częściowo przezroczystej powierzchni, natomiast *bridge helix* w postaci zielonej pętli. Antybiotyk rifampicynę przedstawiono kolorem czerwonym (β – częściowo przezroczysta w celu odsłonięcia miejsca wiążącego antybiotyk). (C) Model oparty na krystalograficznej strukturze α CTD, DNA i białka CAP. Nić niematrycowa przedstawiona kolorem jasnozielonym, nić matrycowa ciemnozielonym. Dwie reszty aminokwasowe podjednostki α zaangażowane w rozpoznanie elementu UP (Arg256 i Asn294) pokazano w postaci czerwonych segmentów. Determinanty oddziałujące z białkiem CAP przedstawiono w postaci niebieskiej wypełnionej przestrzeni (Val287). Reszty aminokwasowe oddziałujące z regionem podjednostki σ (Asp259 i Glu261) przedstawiono w postaci segmentów pomarańczowych /48/.

1.2. Struktura i funkcja promotora

Jedną z najważniejszych sekwencji w DNA wszystkich organizmów, decydującą o ekspresji genu, jest promotor. Promotorem określane jest segment DNA zawierający sygnały odpowiedzialne za właściwe wiązanie, a następnie aktywację holoenzymu polimerazy RNA do formy zdolnej do inicjacji syntezy RNA /152/. W obrębie sekwencji promotora, lub w bliskim jego sąsiedztwie, mogą występować dodatkowe sekwencje odpowiedzialne za specyficzne wiązanie białek represorowych lub aktywatorowych, wpływających na aktywność promotora. Szacuje się, że genom *Escherichia coli* może zawierać około 2000 funkcjonalnych promotorów, które mogą współzawodniczyć o polimerazę i ją aktywować z różną efektywnością.

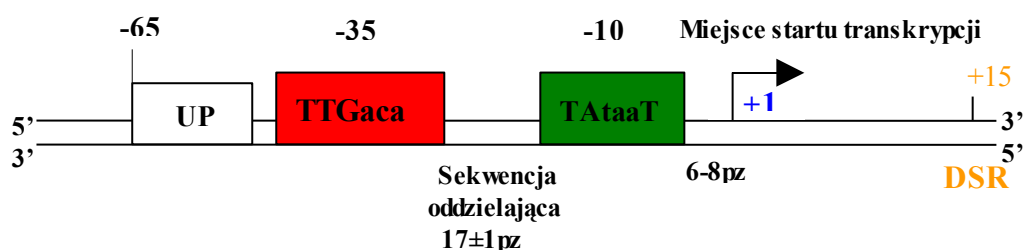
Względna transkrypcyjna efektywność różnych promotorów określana jest jako „siła promotora” /115/. Ten parametr charakteryzowany jest przez sekwencję promotora i jego konformację oraz przez dodatkowe białka (białka efektorowe - represory, aktywatory lub czynniki sigma), które poprzez wiązanie do matrycy DNA lub polimerazy RNA, mogą wpływać na siłę promotora /145/. Przy braku innych czynników, siłę promotora determinuje: struktura DNA określana przez sekwencję w obrębie regionów najwyższej zgodności (-35 i -10), długość sekwencji oddzielającej obydwa te regiony, odległość regionu -10 od puryny w miejscu startu transkrypcji (+1) oraz konformacja i superzwinięcie DNA. Wiązanie białek efektorowych w miejscu sekwencji promotorowej lub w jej pobliżu może wpływać na siłę promotora na różne sposoby. Współzawodnictwo polimerazy RNA i białek efektorowych o miejsce wiązania w promotorze w znaczący sposób może redukować dostępność promotora dla polimerazy RNA. Wiązanie określonych białek do miejsc zlokalizowanych w pobliżu miejsca wiązania polimerazy RNA (np. CAMP-CRP) /83/ może regulować siłę promotora poprzez zmianę lokalnej konformacji /168/. Białka, które wiążą się z DNA daleko od sekwencji promotorowej (np. topoizomerazy), powodują zmianę stopnia superzwinięcia DNA. Mogłoby to zwiększać siłę promotora poprzez ułatwianie topnienia DNA i/lub zniekształcenie miejsc wiążących dwuniciowego DNA, zapewniając lepszy dostęp dla oddziałujących z DNA białek. Także oddziaływania białko-białko między polimerazą RNA i białkami efektorowymi (λ cII, cAMP-CRP) mogą wpływać na siłę promotora.

Siłę promotora charakteryzuje nie tylko powinowactwo polimerazy RNA do promotora (K_B), ale także zdolność izomeryzacji do kompleksu otwartego (k_2 , k_f) oraz zdolność do opuszczania sekwencji promotorowych (ang. *promoter clearance*). Dla

typowych promotorów *E. coli* wartości K_B mieszczą się w zakresie od 10^7 do 10^9 M^{-1} , natomiast wartości $k_2(k_f)$ od 10^{-1} do 10^{-3} s^{-1} /87, 149/. Jednakże silne wiązanie polimerazy RNA do promotora może w znaczący sposób wpływać negatywnie na opuszczenie sekwencji promotora przez polimerazę i przejście do produktywnej fazy transkrypcji. Zatem, promotory z sekwencjami najbardziej zbliżonymi do sekwencji zachowawczych w regionach -35 i -10 nie są wcale najsilniejszymi promotorami /65, 152/.

Sekwencje promotorowe rozpoznawane są jako specyficznie zorientowane donory i akceptory wiązań wodorowych w dwuniciowej cząsteczce DNA oddziałujące z określonymi grupami funkcyjnymi zlokalizowanymi na powierzchni białek. Na stabilność interakcji białka z DNA wpływają także oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi szkieletu cukrowo-fosforanowego, a dodatnio naładowanymi grupami funkcyjnymi polimerazy RNA i prawdopodobnie oddziaływania pomiędzy hydrofobowymi grupami na powierzchni białek i metylowymi grupami tyminy eksponowanymi do większej bruzdy podwójnej helisy DNA /152/.

Porównując sekwencje szeregu promotorów *Escherichia coli* wykazano obecność dwóch sześci nukleotydomy regionów zlokalizowanych około 35 i 10 pz (par zasad) powyżej (ang. *upstream*) miejsca startu transkrypcji (określanego jako +1) o sekwencjach, odpowiednio **TTGaca** i **TAtaaT**. Są to sekwencje najwyższej zgodności (sekwencje konsensusowe; sekwencje zachowawcze; ang. *consensus sequence*), a więc sekwencje najsilniej konserwowane we wszystkich promotorach *E. coli*. Regiony te nazwano heksamerami -35 i -10. Sekwencja oddzielająca powyższe heksamery (ang. *spacer*), nie jest konserwowana ewolucyjnie, ale odległość pomiędzy nimi ma charakterystyczną, preferowaną, silnie konserwowaną długość 17 ± 1 pz /54, 81, 139, 152/. Powyższe trzy elementy, wraz z miejscem startu transkrypcji, składają się na tzw. **rdzeń promotora**. Wykazano również, że preferowana długość segmentu DNA pomiędzy regionem -10 i miejscem startu transkrypcji wynosi 6-8 pz /81/ (ryc. 2) oraz, że preferowaną zasadą w miejscu startu transkrypcji jest puryna (w 93 % przypadków), w szczególności A (w 51% promotorów, np. *araBAD*, *galP1*, *lacP1*, *malK*, A1 T7, A3 T7, λP_R , λP_L), a także G (42 % , np. *araC*, *lacP2*, *tnaA*, *glnS*, T7 A2, T7 C czy *P22PR*). Cytosyna i tymina występują w miejscu startu transkrypcji tylko w odpowiednio 5% i 2% przypadków /54/.



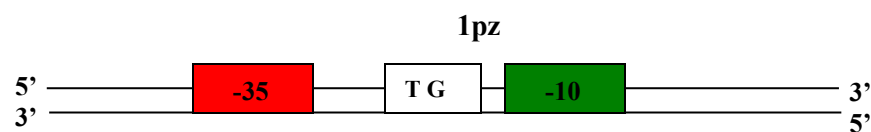
Ryc. 2. Schemat promotora zawierającego sekwencje najwyższej zgodności (sekwencja nukleotydowa nici niematrixowej) rozpoznawanego przez polimerazę RNA *Escherichia coli*. Kolorem czerwonym zaznaczono region -35, zielonym region -10 (duże litery w obrębie regionów -35 i -10 określają zasady najsilniej konserwowane, małe słabiej konserwowane); +1 oznaczono miejsce startu transkrypcji. Pomiędzy heksamerami -35 i -10 zaznaczono odcinek sekwencji o silnie konserwowanej długości 17±1 pz, a także odległość miejsca startu transkrypcji od regionu -10, wynoszącą 6-8 pz. Element UP (ang. *upstream promoter element*) oznacza sekwencję bogatą w pary AT, DSR – (ang. *downstream sequence region*) region zlokalizowany poniżej miejsca startu transkrypcji.

Częstość występowania kilku z nukleotydów konsensusowych heksamerów -35 i -10 była wyższa niż pozostałych nukleotydów, zostały więc zidentyfikowane jako najsilniej ewolucyjnie konserwowane nukleotydy tych heksamerów. W regionie -35 najsilniej konserwowane okazały się być pierwsze trzy zasady, a mianowicie -36T-35T-34G (np. *malT*, *argCBH*, *uvrB P1*, *glnS*, T7 A1, T7 A2, T7 A3, λP_R czy λP_L), nieco mniej -33A-32C (np. *araBAD*, *araC*, *galP1*, *lacP1*, *argCBH*, T7 A1, T7 A2). Adenina w pozycji -31 występuje w przybliżeniu z taką samą częstotliwością jak inne słabo konserwowane zasady poza regionem -35: T w pozycji -38, C w -37, T w -30 i T w pozycji -27. Natomiast w przypadku regionu -10 najsilniej zachowane ewolucyjnie są zasady -12T, -11A oraz -7T (np. *araBAD*, *galP1*, *galP2*, *tnaA*, *uvrBP1*, *alaS*), występujące w ponad 80% znanych promotorów. Pozostałe zasady znaleziono w poniżej 60% znanych promotorów i są słabiej konserwowane, podobnie jak T w pozycji -18, T w -16 i G w -15, występujące już poza regionem -10 /54/.

Odcinek oddzielający regiony -35 i -10 jest również elementem mającym znaczący wpływ na aktywność promotora. Zmiany sekwencji w obrębie tego regionu mają bardzo niewielki wpływ na aktywność promotora. Natomiast zmiana długości tego odcinka drastycznie wpływa na wydajność promotora /4, 54, 139/. Dowody eksperymentalne sugerują, że nukleotydy w obrębie tej sekwencji nie są w bezpośrednim kontakcie z polimerazą RNA, ale długość tego odcinka jest szczególnie ważna dla wzajemnej orientacji regionów -35 i -10, aby zapewnić tym regionom optymalne kontakty z polimerazą RNA. Jednakże, kiedy zostanie zmieniona kompozycja purynowo-

pirymidynowa łącznika, może to w znaczący sposób wpłynąć na skok podwójnej helisy DNA, a tym samym na wzajemną orientację heksamerów.

Istnieje specjalna grupa promotorów, sklasyfikowanych jako promotory z rozszerzonym regionem -10 (ang. *extended -10 promoter*) charakterystycznych dla *E. coli*, które posiadają słabą homologię lub pozbawione są w ogóle regionu -35. Zawierają one charakterystyczny motyw sekwencji TG zlokalizowanej 1 pz powyżej regionu -10 (TGnTATAAT), który może kierować niezależnym od dodatkowych aktywatorów procesem transkrypcji (ryc. 3). Motyw sekwencji TG dostarcza dodatkowych miejsc wiążących dla polimerazy RNA, być może częściowo rekompensując w ten sposób brak regionu -35 /8, 155/. Porównując promotory *E. coli*, motyw TG znaleziono w 20% z 300 analizowanych promotorów. Dinukleotyd TG odpowiadający motywowi TG w promotorach *E. coli*, będący częścią motywu TRTG (R-puryna), można znaleźć również w promotorach bakterii Gram dodatnich (znaleziono go w 45% z 142 analizowanych promotorów *Bacillus subtilis*, np. promotor *amyP* genu α -amylazy), które oprócz obydwu konserwowanych ewolucyjnie regionów -35 i -10, mogą zawierać także element UP. W tego typu promotorach motyw TRTG uczestniczy prawdopodobnie w separacji nici DNA podczas topnienia i we wczesnych etapach tworzenia kompleksu otwartego /153, 154/. Natomiast za aktywność transkrypcyjną promotorów, w których nie ma zarówno regionu -35 jak i sekwencji TG, są odpowiedzialne czynniki transkrypcyjne (aktywatory) /155/.



Ryc. 3. Schemat promotora z tzw. rozszerzoną sekwencją -10; 1 pz powyżej regionu -10 zaznaczono motyw TG.

Na aktywność promotorów często mają wpływ również sekwencje zlokalizowane poza rdzeniem promotora. Są to np. sekwencje znajdujące się powyżej miejsca startu transkrypcji, charakteryzujące się obecnością dużej liczby par AT często występujących „w fazie” (tzw. bloki A, ang. *A-tracts*) determinujących wewnętrzną krzywiznę DNA, zwane regionem sekwencji USR (ang. USR – *upstream sequence regions*) /155, 15/. Ponieważ ścieżki A_n (lub T_n) ($n = 2-6$) nie są zazwyczaj rozmieszczone przypadkowo, ale występują z

periodycznością około 10-11 pz, a na jeden pełen obrót helisy przypada 10.5 pz (DNA w formie B), to centra ścieżek A są zlokalizowane po jednej stronie helisy. Powoduje to załamanie DNA o około 18° (przez każdy blok A) w kierunku mniejszej bruzdy DNA /70/. Bloki A stanowią często część tzw. elementu UP (ang. *upstream promoter element*), bogatego w pary A+T i zlokalizowanego 40-60 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. Jest to miejsce wiązania C-końcowej domeny podjednostki α (np. promotor *rrnB* P1) /121, 1/. Domena ta wiąże się preferencyjnie do dwóch miejsc znajdujących się w obrębie elementu UP – „proksymalnego” (pozycja około -41) i „dystalnego” (pozycja około -52) /40/. Obecność ich może zwiększać wydajność promotora nawet 30-krotnie. Być może jest to związane z krzywizną DNA, która wpływa pozytywnie na proces transkrypcji poprzez zwiększoną efektywność oddziaływań białko-DNA wynikającą z większej powierzchni kontaktu /49/. Nie stwierdzono jednak bezpośredniej korelacji pomiędzy stopniem stymulacji transkrypcji, a krzywizną DNA. Pewne elementy UP (np. w promotorze *rrnBP1*) nie posiadają charakterystycznej krzywizny, co może wskazywać na to, że załamanie DNA nie jest niezbędne do funkcjonowania promotora. Z drugiej strony, ponieważ bloki A powodują deformację DNA, struktura DNA mogłaby odgrywać pewną rolę w rozpoznaniu dystalnych sekwencji promotorowych przez podjednostkę α . Nie jest jednak jasne czy podjednostka α rozpoznaje determinowaną przez sekwencję konformację szkieletu DNA, funkcjonalne grupy w mniejszej i większej bruzdzie czy też kombinację tych dwóch elementów.

Na aktywność niektórych promotorów, np. takich jak wczesne silne promotory faga T5, mogą wpływać również sekwencje zlokalizowane w pozycji od +1 do +20, zwane regionami sekwencji *downstream* (ang. DSR – *downstream sequence regions*) /155/.

1.2.1. Lokalizacja promotora

W DNA występują charakterystyczne sygnały decydujące o tym, że polimeraza RNA, pośród tysięcy par zasad, odnajduje właściwe miejsca dla wiązania, rozkręcenia DNA i utworzenia transkrypcyjnie kompetentnego kompleksu. Można sądzić, iż lokalizacja promotora przez polimerazę RNA zachodzi, podobnie jak inne reakcje chemiczne, na drodze kontrolowanej przez dyfuzję w przestrzeni trójwymiarowej, tzn. poprzez chaotyczne, zależne od temperatury, ruchy termiczne /151/. Częstość występowania specyficznych sekwencji (sekwencji promotorowych) w obrębie cząsteczki

DNA w stosunku do przypadkowych, niepromotorowych miejsc w cząsteczce, jest relatywnie niska. Genom *E.coli* zawiera w przybliżeniu 4×10^6 niespecyficznych miejsc wiążących, które współzawodniczą z określonymi specyficznymi miejscami o wiązanie białka. W związku tym, lokalizacja promotora przez polimerazę RNA, przy tak ogromnym nadmiarze niespecyficznych miejsc wiązania w obrębie genomu w porównaniu z miejscami specyficznymi, może w znaczny sposób spowalniać tempo wiązania promotora poprzez współzawodnictwo pomiędzy tymi miejscami. Wykazano jednak, że zwiększenie długości DNA nie redukuje szybkości lokalizacji promotora przez polimerazę RNA, co miałyby miejsce w przypadku współzawodnictwa pomiędzy specyficznymi i niespecyficznymi miejscami wiązania. Stałe szybkości wyznaczone dla wiązania polimerazy RNA *E. coli* do kilku silnych promotorów wskazują, że etap lokalizacji promotora przez polimerazę RNA jest znacznie szybszy (K_a przewyższała $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), niż by to wynikało z jednoetapowej reakcji kontrolowanej przez dyfuzję (przewidywana dla tej reakcji wartość K_a nie przekracza $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Wartości te sugerują, że procesem lokalizacji sekwencji promotorowej musi kierować inny mechanizm, niż reakcja kontrolowana przez dyfuzję w przestrzeni trójwymiarowej.

Niespecyficzne wiązanie do przypadkowych sekwencji DNA jest ważnym etapem pośrednim w zlokalizowaniu promotora i ułatwia przeniesienie polimerazy RNA do specyficznych sekwencji promotorowych w cząsteczce DNA. Pośród tych oddziaływań można wyróżnić niespecyficzne wiązania do „wewnętrznych” sekwencji w obrębie cząsteczki DNA, nie będących sekwencjami promotorowymi oraz wiązanie do końców DNA, w przypadku cząsteczek liniowych [152]. Wiązania do wewnętrznych sekwencji DNA, pomimo najmniejszego powinowactwa tych sekwencji do polimerazy RNA, są najważniejsze *in vivo* (i dla dużych cząsteczek DNA *in vitro*), ponieważ stanowią dominującą liczbę miejsc wiążących. Jednakże, wiązanie do końców cząsteczki DNA jest około 600 razy silniejsze, niż do innych przypadkowych sekwencji w obrębie DNA i szczególnie istotne może być w przypadku małych, liniowych cząsteczek DNA.

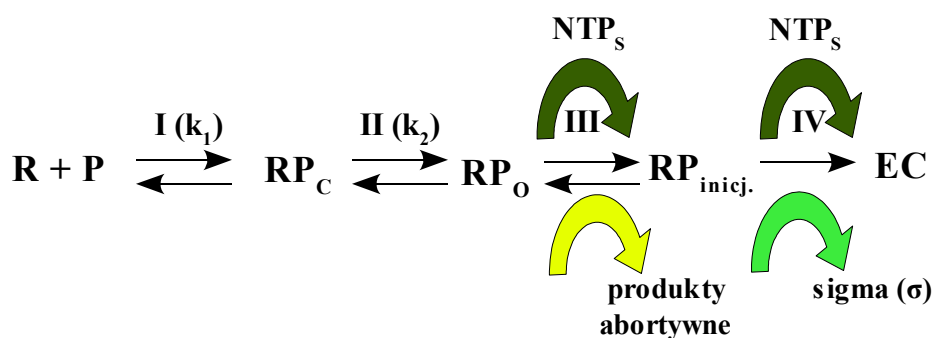
Oddziaływania niespecyficzne są całkowicie natury elektrostatycznej, w związku z tym są bardzo wrażliwe na wysokie stężenia soli. W takich warunkach, w przeciwieństwie do oddziaływań specyficznych, oddziaływania niespecyficzne mogą być niemal całkowicie wyeliminowane. Polimeraza związana niespecyficznie do sekwencji w obrębie cząsteczki DNA porusza się wzdłuż tej cząsteczki, co znacznie skraca czas lokalizacji właściwych sekwencji promotorowych w porównaniu do procesu przypadkowego szukania tych sekwencji poprzez proces dyfuzji w trójwymiarowej przestrzeni. Ten mechanizm

lokalizacji promotora określa się jako „ślizganie się” polimerazy RNA po DNA (ang. *sliding*) /14, 53, 116, 134/. Polega on na kolejnych reakcjach dysocjacji i reasocjacji enzymu i DNA. Polimeraza RNA może być również przekazywana pomiędzy segmentami tej samej cząsteczki DNA /152/ .

Mechanizm kierujący procesem rozpoznania sekwencji promotorowej przez polimerazę RNA nie jest do końca jasny. Jest to proces złożony, na który prawdopodobnie składa się kilka etapów. Wydaje się, że pierwsza faza lokalizacji promotora w przestrzeni musi mieć charakter procesu kontrolowanego przez dyfuzję, a oddziaływania z DNA muszą natomiast mieć charakter oddziaływań elektrostatycznych (dalekiego zasięgu). W bezpośredniej bliskości sekwencji promotorowej musi nastąpić zmiana w mechanizmie oddziaływania polimerazy RNA z DNA, tzn. oddziaływania o charakterze elektrostatycznym muszą być zastąpione bardziej złożonymi oddziaływaniami z charakterystyczną sekwencją promotorową. Zatem, polimeraza RNA musi rozpoznać unikalny przestrzenny układ zasad nukleinowych sekwencji promotorowej oraz musi nastąpić istotna zmiana konformacji enzymu.

1.3. Inicjacja transkrypcji

Momentem krytycznym procesu transkrypcji jest etap inicjacji, mający największy wpływ na właściwości biochemiczne komórki, ponieważ właśnie na tym etapie zapada decyzja, który gen ulega ekspresji. Inicjacja jest również reakcją bardzo złożoną i oprócz procesu lokalizacji i rozpoznania określonych sekwencji w obrębie DNA, obejmuje tworzenie zamkniętego kompleksu enzym DNA (ang. *closed complex*), a także kolejne zdarzenia prowadzące do szeregu konformacyjnych zmian DNA i enzymu, dających w rezultacie aktywny transkrypcyjnie kompleks otwarty (ang. *open complex*). Inicjacja transkrypcji obejmuje także wiązanie substratów NTP_s, tworzenie pierwszych wiązań fosfodiestrowych i utworzenie inicjacyjnego kompleksu transkrybującego, a także syntezę abortywnych produktów RNA. Proces inicjacji kończy się z chwilą odłączenia podjednostki sigma od rdzenia polimerazy RNA i przejścia w kompleks elongacyjny /78, 90, 152/ (ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat głównych etapów inicjacji transkrypcji (I-IV). Etapy te obejmują: wiązanie polimerazy RNA (R) do sekwencji promotora (P) i utworzenie kompleksu zamkniętego (RP_c), izomeryzację kompleksu zamkniętego w kompleks otwarty (RP_o), tworzenie potrójnego inicjacyjnego kompleksu (RP_{inicyj.}) po związaniu pierwszych NTP_s, tworzenie kompleksu elongacyjnego (EC). Zanim zostanie zapoczątkowana produktywna faza transkrypcji, kompleks inicjacyjny przechodzi przez wielokrotnie powtarzane rundy cyklu abortywnego i uwalnia krótkie transkrypty (produkty abortywne). Zaznaczono również etap uwolnienia z kompleksu podjednostki sigma, która może być ponownie wykorzystana w następnym cyklu inicjacyjnym /155/.

1.3.1. Kompleks zamknięty

Gdy polimeraza RNA zlokalizuje specyficzne sekwencje promotorowe w obrębie cząsteczki DNA, wiąże się z nimi, tworząc tzw. **kompleks zamknięty**. Oddziaływania specyficzne są określone jako oddziaływania pomiędzy specyficznie zorientowanymi donorami i akceptorami wiązań wodorowych znajdującymi się w mniejszym lub w większym rowku DNA, a donorami i akceptorami wiązań wodorowych znajdującymi się na powierzchni białek. Kompleks zamknięty pomimo dodatkowej stabilizacji przez specyficzne wiązania wodorowe lub oddziaływania hydrofobowe, w dalszym ciągu wykazuje przewagę oddziaływań natury elektrostatycznej. Dotyczy to oddziaływań pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi, a dodatnio naładowanymi grupami reszt aminokwasów, np. lizyny i argininy (w podjednostce β³). W związku z tym kompleks ten charakteryzuje się niską stabilnością i wrażliwością na wysokie stężenia soli i nadmiar heparyny, polianionowego kompetitora DNA. Kompleks zamknięty tworzy się w temperaturze poniżej 8°C, a w temperaturze powyżej 22°C szybko izomeryzuje do kompleksu otwartego /74, 87, 125/. DNA w obrębie regionu promotorowego w kompleksie zamkniętym występuje w formie dwuniciowej. Na podstawie badań wykorzystujących technikę footprintingu z zastosowaniem DNazy I i rodników hydroksylowych wykazano, że obszar protekcji DNA przez polimerazę RNA w kompleksie zamkniętym różni się w

zależności od promotora i może obejmować obszar DNA od pozycji -4 do -53 (promotor A1 faga T7) /125/, od -5 do -51 (promotor A3 faga T7), +1 do -55 (UV5) i +10 do -45 (*prmp-1* Δ 256), co odpowiada całkowitemu obszarowi protekcji wynoszącemu około 50-57 pz /79/. Najdłuższa średnica polimerazy RNA wynosi 160 Å, co odpowiada długości DNA w formie B, wynoszącej około 47 pz. Sugeruje to, że polimeraza RNA mogłaby wiązać się do promotora bez większych zmian konformacyjnych /79/. W obrębie tego regionu DNA jest częściowo chronione i wzór protekcji wykazuje periodyczne zmiany. Powtarzają się one z okresem periodyczności około 10 pz. Świadczy to o tym, że polimeraza RNA oddziałuje tylko z jedną stroną podwójnej helisy DNA /125, 147/. Ponadto, w kompleksie zamkniętym, DNA poniżej regionu -10 nie jest chronione przed atakiem rodników czy DNazy, wskazując na brak kontaktów DNA z polimerazą RNA w tym regionie /125, 97/.

1.3.2. Kompleksy pośrednie

W temperaturze pomiędzy 8 a 21°C powstają kompleksy, które różnią się zarówno od kompleksu zamkniętego jak i otwartego. Są to tzw. **kompleksy pośrednie**, które wykazują większy obszar protekcji poszerzony o sekwencje zlokalizowane w pobliżu miejsca startu transkrypcji, obejmujący region od pozycji -53 do +21, co odpowiada długości około 70 pz. Tak drastyczny wzrost rozmiaru chronionego obszaru DNA przez polimerazę RNA może świadczyć o znaczących konformacyjnych zmianach enzymu i/lub DNA /79, 125/. Jednakże DNA w kompleksie pośrednim pozostaje w formie dwuniciowej. Charakterystyczna dla tego kompleksu jest zwiększona oporność na działanie heparyny. Wzór obszaru protekcji powyżej pozycji -14 pozostaje niezmienny w stosunku do kompleksu zamkniętego. Natomiast poniżej sekwencji -13, widoczne są znaczne różnice. Zasady do pozycji +18 na nici kodującej i do +21 na niekodującej, są całkowicie chronione przez polimerazę RNA (z wyjątkiem zasad -10 i -11 na nici niekodującej). Ten wzór obszaru protekcji może sugerować, że ta część DNA jest w bliskim kontakcie z białkiem /125/. Rozciągnięcie protekcji DNA w kierunku *downstream* przez polimerazę RNA podczas przejścia z kompleksu zamkniętego do pośredniego o około 24 pz i całkowita protekcja regionu od -3 do +21 sugeruje, że odpowiednie domeny polimerazy RNA obejmują ten region DNA /25, 117, 125/.

1.3.3. Kompleks otwarty

Kompleks otwarty tworzy się w temperaturach powyżej 21°C, przy czym optymalną temperaturą jest 37°C, a jego charakterystyczną cechą jest stabilność wobec dziesięciokrotnego nadmiaru heparyny. Aby kompleks mógł stać się transkrypcyjnie kompetentny, tzn. zdolny do syntezy RNA, podwójna helisa DNA musi ulec lokalnemu rozdzieleniu. Ma to miejsce w regionie -10, ponieważ region ten jest bogaty w pary AT i w związku z tym jest termodynamicznie najmniej stabilną częścią całej sekwencji promotora /77, 58/. W wyniku rozplecenia nici (reakcji „otwierania”) DNA tworzy się tzw. pętla transkrypcyjna /152/, która obejmuje 12±2 nukleotydów pomiędzy pozycjami -11 i +3. Zasięg pętli transkrypcyjnej został określony m.in. na podstawie badań dostępności zasad dla odczynników chemicznych modyfikujących zasady w jednoniciowym DNA (dimetylosiarczan, nadmanganian potasu) /12, 64/. Wykazano, iż większość tymin uczestniczących w tworzeniu pętli transkrypcyjnej była dostępna dla odczynników chemicznych. Adeniny znajdujące się w komplementarnej niematrycowej nici DNA są chronione przed modyfikacją, co sugeruje, że ten fragment nici zaangażowany jest w ścisły kontakt z białkiem. Oddziaływania te, pomiędzy polimerazą RNA (podjednostka σ^{70}) a zasadami nici niematrycowej, będą stabilizowały kompleks otwarty.

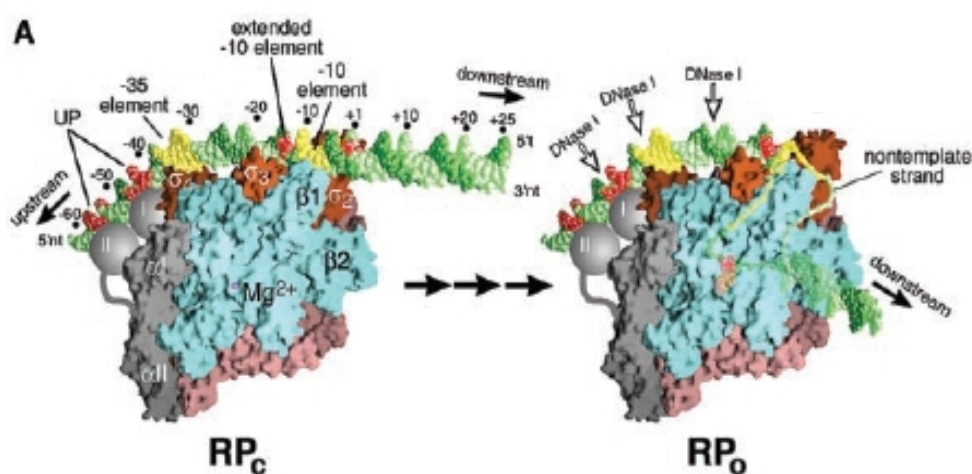
Analizując wzajemną orientację heksamerów -35 i -10 przy ich projekcji na powierzchnię walca i odległość między nimi (17 pz), należy stwierdzić, że oba te regiony w wolnym DNA są skręcone w stosunku do siebie o około 68° zakładając, że DNA występuje w formie B i na jeden obrót helisy przypada 10.5 pz /3/. Periodyczny układ protekcji DNA przed działaniem rodników hydroksylowych w kompleksie zamkniętym nie wykazuje odstępstw od periodyczności charakteryzującej się okresem powtarzalności około 10 pz. Natomiast w kompleksie pośrednim i otwartym występuje zaburzenie tej periodyczności w regionie od -20 do -10, co sugeruje, że tworząc kompleks otwarty, polimeraza RNA zmieniała wzajemną orientację obu heksamerów. Musi być to związane z dystorsją odcinka oddzielającego oba heksamery. Ta rotacja helisy DNA i skupisko zasad AT w regionie -10 powodują destabilizację heksameru -10, „otwieranie” podwójnej helisy DNA i tworzenie kompleksu otwartego. Kompleks ten wykazuje podobny wzór protekcji do kompleksu pośredniego (-53 do +21) /125, 110/ z tym, że sekwencja zasad pomiędzy pozycjami -6 i +2 w nici kodującej jest dostępna dla rodników hydroksylowych, natomiast nić niekodująca w obrębie tej sekwencji jest w pełni chroniona, co sugeruje, że nici w tym obszarze są rozdzielone /91, 92, 110, 125/. Otwarcie DNA powoduje zwiększenie

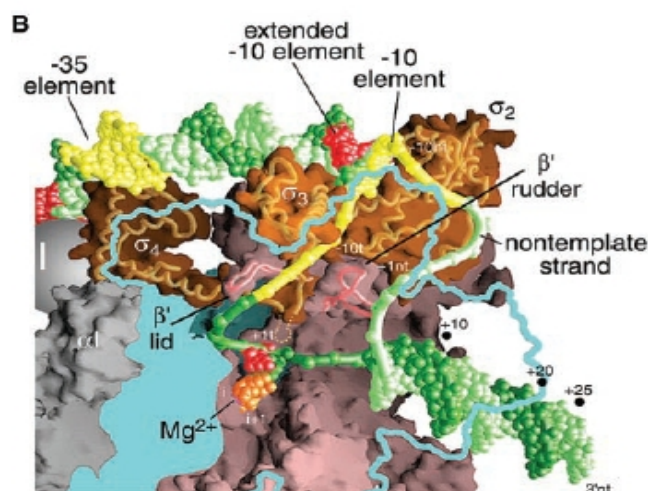
naprężenia rotacyjnego w dwuniciowym DNA, po obu stronach oczka transkrypcyjnego /122/. To naprężenie jest częściowo zmniejszane przez rotację DNA poniżej pętli transkrypcyjnej, ponieważ kontakty z białkiem w górnej części promotora uniemożliwiają rotację DNA /125/. „Otwieranie” DNA w czasie tworzenia kompleksu otwartego, jak i przemieszczenie się pętli transkrypcyjnej w czasie elongacji indukuje zmiany topologiczne w DNA /2, 24, 38, 45, 111, 158/. Z drugiej strony, struktura i superzwinięcie DNA również mogą wywierać modulujący wpływ na proces transkrypcji /7, 27, 61, 93/.

Dzięki zastosowaniu metod opartych na miejscowo specyficznym tworzeniu wiązań krzyżowych pomiędzy polimerazą RNA a DNA (ang. *crosslinking*) określono pozycje oddziaływań polimerazy RNA z fragmentami promotorowego DNA w kompleksie otwartym /9, 99/. Wykazano, że część sekwencji promotorowej zlokalizowanej poniżej miejsca startu transkrypcji oddziałuje z podjednostką β' (aminokwasy 821-1407), natomiast część powyżej miejsca startu transkrypcji z podjednostką β (aminokwasy 643-989) oraz β' (aminokwasy 1-580). Fragment dwuniciowy promotora, występujący poniżej miejsca startu transkrypcji (pozycje od +4 do +21) znajduje się w kanale doprowadzającym dwuniciowe DNA do centrum aktywnego. Nić matrycowa oczka transkrypcyjnego oddziałuje z podjednostką β (aminokwasy 235-643, 643-989, 951-1342), a także z podjednostką β' (aminokwasy 545-878). Nić niemmatrycowa oczka transkrypcyjnego na całej długości oddziałuje z podjednostką σ (region 2.3 i 2.4), a także z podjednostką β (aminokwasy 1-235, 235-643). Natomiast najbardziej proksymalna część nici niemmatrycowej pętli transkrypcyjnej oddziałuje z podjednostką β' (aminokwasy 545-878, 821-1407) /99/. Sugeruje to, że podjednostki β , β' i σ współpracują w oddziaływaniach z tym regionem promotora. Wcześniejsze wyniki badań genetycznych i biochemicznych wykazały, że podregiony 2.3 i 2.4 podjednostki σ^{70} oddziałują z regionem -10 (aminokwasy podregionu 2.4 odpowiadają za rozpoznanie i wiązanie heksameru -10, a aminokwasy podregionu 2.3 są zaangażowane w „topnienie” DNA), region 2.5 oddziałuje z wydłużonym regionem -10 (ang. *extended -10 element*), a region 4.2 z heksamerem -35 /8, 33, 85, 89, 132/.

W pracy poświęconej analizie struktury kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z DNA, Murakami i wsp. /97/ zaproponowali model kompleksu holoenzymu polimerazy RNA *Thermus aquaticus* z promotorowym DNA, zawierającym dystalną dwuniciową część DNA (włączając region -35) do zasady w pozycji -12 i część jednoniciową nici niemmatrycowej od zasady w pozycji -11 do -7 (ang. *fork-junction*). W pracy tej

sugerowano, iż nić niematrixowa regionu -10 kontaktuje się z eksponowanymi na zewnątrz aromatycznymi aminokwasami regionu 2.3 podjednostki σ (ryc. 5). Są to między innymi Tyr-430 i Trp-433, które oddziałują z zasadami nici niematrixowej pozycji -11 i/lub -10 i są zaangażowane w proces „topnienia” DNA /97, 144/. Podstawienia tych aminokwasów hamują proces „topnienia” DNA /85/. Ta para aminokwasów aromatycznych tworzy prawdopodobnie przestrzeń, która pozwala na wprowadzenie do niej pierścienia adeniny z pozycji -11 (nici niematrixowej). To wyeksponowanie nukleotydu do przestrzeni między wspomnianymi aminokwasami stabilizuje „otwartą” formę DNA, a więc stanowi prawdopodobny mechanizm inicjacji topnienia DNA w czasie tworzenia kompleksu otwartego. Taki mechanizm opisany jest jako *base flipping* dla enzymów oddziałujących z DNA, w którym odpowiednie ugrupowania białkowe „wyciągają” zasady z helisy DNA i umieszczają w miejscu aktywnym enzymu /86/. Gln-437 i Thr-440 są zaangażowane w wiązanie tyminy w pozycji -12, natomiast Glu-458 (regionu 2.5) oddziałuje z wydłużonym regionem -10, w pozycji -14/-15. Fragment nici niematrixowej od pozycji -2 do +4 zlokalizowany jest w rowku pomiędzy dwiema domenami podjednostki β ($\beta 1$ i $\beta 2$). Natomiast dwuniciowe DNA powyżej pozycji -12 oddziałuje z argininami R436, 441 i 451 /85/. Nić matrycowa znajduje się w kanale głównym, w którego ścianie zlokalizowane jest centrum aktywne. Kanał ten jest utworzony przez dodatnio naładowane aminokwasy domen podjednostek σ_2 , σ_3 , $\beta 1$, β' *lid* i β' *rudder* (ryc. 5B). Po opuszczeniu centrum aktywnego nić matrycowa przechodzi obok łącznika $\sigma_3 - \sigma_2$ i elementów podjednostki β tworzących tylną ścianę głównego kanału /97/.





Ryc. 5. Modele przedstawiające kontakty holoenzymu polimerazy RNA z promotorowym DNA w kompleksie zamkniętym (RP_C) i otwartym (RP_O). Nić matrycową (t) przedstawiono kolorem ciemnozielonym; nić niematrycową (nt) kolorem jasnozielonym. Regiony -35 i -10 przedstawiono kolorem żółtym; element UP, wydłużony region -10 i miejsce startu transkrypcji (+1) przedstawiono kolorem czerwonym. Holoenzym polimerazy RNA przedstawiono za pomocą kolorów: α I, α II, ω - szary; β -niebieski; β' -różowy; σ -pomarańczowym. Przedstawiono także prawdopodobne położenie α CTD na elemencie UP, w postaci szarych kul oznaczonych jako I i II. **A** – modele kompleksów zamkniętego (RP_C) i otwartego (RP_O). Podjednostkę β przedstawiono jako częściowo przezroczystą w celu uwidocznienia centrum aktywnego z jonami Mg^{2+} (czerwone kule) wewnątrz głównego kanału oraz pęcherzyka transkrypcyjnego i sekwencji DNA zlokalizowanej powyżej miejsca startu transkrypcji, zamkniętych w kanale głównym. Miejsca cięcia DNazą DNA w kompleksie otwartym przedstawiono w postaci strzałek w pozycjach -45, -35 i -25 zlokalizowanych w mniejszych bruzdach DNA. **B** – powiększenie modelu kompleksu otwartego, przedstawiające szczegóły oddziaływania rdzenia promotora z polimerazą RNA, pęcherzyk transkrypcyjny i część DNA zlokalizowaną poniżej miejsca startu transkrypcji. Część podjednostki β została usunięta (zarys tej podjednostki przedstawiono w postaci niebieskiej linii) w celu ukazania elementów strukturalnych znajdujących się wewnątrz kanału głównego polimerazy RNA. RNA zajmujące pozycje i i i+1 przedstawiono w postaci pomarańczowych kul. Powierzchnie podjednostki σ oraz β' lid i β' rudder są przedstawione jako częściowo przezroczyste, ukazując wewnątrz szkielet α -węglowy (odpowiednio jasnopomarańczowy i różowy). Nić matrycowa DNA w obrębie pęcherzyka transkrypcyjnego przechodzi przez tunel białkowy ukształtowany przez σ_2 i następnie przechodzi poniżej łącznika σ_3 - σ_4 , mija α -helisę σ_3 i β' lid z jednej strony i β' rudder z drugiej strony [97].

Eksperymenty z zastosowaniem odczynników reagujących z niesparowanymi zasadami jednoniciowego DNA i rodników hydroksylowych wskazują, że proces prowadzący od momentu zainicjowania topnienia DNA do utworzenia w pełni otwartego kompleksu transkrypcyjnego wymaga wiązania jonów Mg^{2+} . Badania te wykorzystujące dziką i zmutowaną polimerazę RNA *E. coli* (pozbawiona aminokwasów odpowiadających za wiązanie jonów Mg^{2+}) pokazały, że do tworzenia aktywnego centrum niezbędnego do syntezy RNA potrzebne są trzy takie jony [98, 163, 164]. Stwierdzono, iż w wiązaniu jonów magnezu zaangażowane są aminokwasy Glu-464, Asp-460 i 462 podjednostki β' i

prawdopodobnie Glu-1272 i 1274 podjednostki β polimerazy RNA. Usunięcie reszt asparagin (460 i 462) nie wpływa na powinowactwo polimerazy RNA do sekwencji promotorowych i formowanie pęcherzyka transkrypcyjnego, ale tworzy formę enzymu niezdolną do syntezy RNA /164/. Może to wskazywać na zróżnicowaną rolę jonów magnezu znajdujących się w kompleksie transkrypcyjnym. Te jony, które związane są z resztami asparagin niezbędne są do reakcji polimeryzacji, pozostałe odpowiedzialne są za powstanie i rozszerzanie pęcherzyka transkrypcyjnego /163/. Wykazano ponadto, iż w kompleksach powstałych w warunkach niedoboru jonów Mg^{2+} zasięg pęcherzyka transkrypcyjnego obejmuje pozycje od -12 do -1, natomiast w kompleksach zawierających te jony sięga do pozycji +2, obejmując miejsce startu transkrypcji. Wskazuje to, iż pęcherzyk transkrypcyjny składa się z dwóch części, części zależnej i niezależnej od jonów Mg^{2+} , których rozmiar zależy również od temperatury. Tworzenie aktywnego transkrypcyjnie kompleksu otwartego poprzedzone jest tworzeniem kompleksu pośredniego, który charakteryzuje zwiększone powinowactwo do jonów Mg^{2+} niezbędnych do tworzenia centrum katalitycznego. Związanie jonów Mg^{2+} ułatwia powiększenie rozmiarów pęcherzyka transkrypcyjnego i wzmacnia kontakty zasad pętli transkrypcyjnej z polimerazą RNA /163/. Krytycznie do tej hipotezy odnieśli się jednak Łoziński i Wierzchowski, którzy wykazali, że otwieranie DNA i tworzenie pętli transkrypcyjnej nie jest zależne od jonów Mg^{2+} . Dowiedli, że wzmożona reaktywność MnO_4^- w obecności jonów Mg^{2+} wynika z redukcji elektrostatycznej bariery dla anionów MnO_4^- , poprzez neutralizację ujemnie naładowanych grup PO_4^- jonami Mg^{2+} /84/.

Analizując kompleks otwarty przy pomocy metody opóźniania kompleksów w żelu, analizy permutacyjnej fragmentów DNA, rozpraszania neutronów, mikroskopii elektronowej i wysokorozdzielczej mikroskopii atomowej (ang. AFM – *high-resolution atomic force microscopy*) wykazano, że DNA w kompleksie otwartym z polimerazą RNA jest załamany /59, 117/. Centrum załamania znajduje się w pozycji -3, a kąt załamania jest mniejszy niż 45° /59/. Badania przy pomocy AFM w kompleksie $\sigma^{70} RP_0$ w promotorze λP_L pozwoliły określić kąt załamania jako 54° , natomiast w kompleksie $\sigma^{54} RP_0$ z promotorem *glnA* jako 114° /117/. W modelu kompleksu otwartego zaproponowanym przez Murakami i wsp., część DNA zlokalizowana powyżej miejsca startu transkrypcji owija się dookoła polimerazy RNA, przede wszystkim dzięki załamaniu wynoszącym około 36° w pozycji -35 i załamaniu około 8° w pozycji -25, a także w pozycji -16, gdzie występuje kolejne ostre załamanie wynoszące 37° /97/. Załamanie jest utrzymywane i zwiększa się w transkrybującym kompleksie, a kąt załamania zmienia się wraz z postępem syntezy RNA,

wykazując periodyczne zmiany wartości w przybliżeniu co 10 zasad /162/. Kolejne potencjalne miejsce załamania zlokalizowane w regionie elementu UP (pozycje -40 do -60) umożliwia wytworzenie dodatkowych kontaktów z polimerazą RNA i prawdopodobnie ułatwia owijanie DNA wokół polimerazy RNA /117, 121, 155, 35/. Obecność załamania i owijanie DNA wokół polimerazy RNA wydaje się być topologicznym warunkiem wstępnym dla tworzenia kompleksu otwartego i jest najprawdopodobniej jedną z przyczyn wyjątkowej stabilności tego kompleksu.

1.3.4. Kompleks potrójny

Wiązanie pierwszych trifosforanów rybonukleozydów (NTP) komplementarnych do matrycy DNA w kompleksie otwartym powoduje utworzenie końca 5' rosnącego łańcucha RNA i przekształcenie tego kompleksu w **kompleks potrójny (ang. ternary complex)**. Potrójne kompleksy, po kilku rundach wiązania substratów NTP, składają się już z holoenzymu polimerazy RNA związanej z matrycą DNA i rosnącego łańcucha RNA, stopniowo wydłużanego w kierunku 3'. Kompleks potrójny charakteryzuje się stabilnością wobec wysokiego stężenia soli i heparyny, co sugeruje duży wkład nieelektrostatycznych oddziaływań w tym kompleksie. W stabilizację kompleksu są włączone wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe pomiędzy zasadami a aminokwasami aromatycznymi poddomeny 2.3 podjednostki σ^{70} . Polimeraza RNA pozostaje związana z sekwencją promotorową do momentu uwolnienia podjednostki sigma z kompleksu /95/, dzięki oddziaływaniom z heksamerami -35 i -10, a rosnący łańcuch RNA w takim kompleksie może osiągnąć długość nawet do 8 - 9 nukleotydów. Odbywa się to bez utraty kontaktu dystalnej części polimerazy RNA z promotorem. Jest to możliwe, ponieważ domeny białka, zawierające centrum aktywne enzymu, są stosunkowo mobilne i zdolne do translokacji w kompleksie potrójnym o około 10 nukleotydów zgodnie z kierunkiem transkrypcji i utworzenia w ten sposób łańcucha RNA nawet o długości do 8, 9 nukleotydów. W tej fazie transkrypcji utrzymywanie silnego kontaktu polimerazy RNA z heksamerem -35 może spowodować uwolnienie transkryptu z kompleksu i powrót do stanu poprzedzającego syntezę RNA. Proces ten, zwany **inicjacją abortywną**, poprzedza w warunkach *in vitro* produktywną fazę syntezy RNA, która rozpoczyna się w momencie uwolnienia podjednostki sigma i opuszczenia przez enzym sekwencji promotorowych. W tym momencie może być rozpoczęty nowy cykl inicjacyjny. Uwolnienie podjednostki σ

jest wynikiem współzawodnictwa między rosnącym RNA i podjednostką σ w kompleksie, a nowo syntetyzowane RNA, jeśli osiągnie odpowiednią długość, powoduje dysocjację σ^{70} z kompleksu /34/. Inicjacja abortywna jest naturalną właściwością wszystkich polimeraz RNA zdolnych do syntezy RNA, występującą u wirusów, organizmów prokariotycznych i eukariotycznych /152, 155/. Zgodnie z mechanistycznym modelem, który zaproponowali Straney i Crothers, proces abortywnej transkrypcji jest wynikiem dwóch przeciwstawnych tendencji: przemieszczania się mobilnych domen polimerazy RNA w kierunku transkrypcji podczas syntezy RNA i próby utrzymania enzymu związanego w promotorze poprzez oddziaływania z heksamerem -35. Prowadzi to do powstania napięcia w obrębie kompleksu (ang. *stressed intermediate*) /140/, które może zostać usunięte na dwa sposoby. Mianowicie, poprzez uwolnienie abortywnego produktu z kompleksu i powrót domeny zawierającej centrum aktywne do pozycji +1 promotora. Możliwe jest również zerwanie kontaktów polimerazy RNA z heksamerem -35 i skokowe przemieszczenie się dystalnych domen polimerazy RNA związanych z regionem -35 w kierunku transkrypcji i utworzenie kompleksu elongacyjnego /57, 138, 165/. Towarzyszy temu usunięcie z kompleksu podjednostki σ , drastyczna zmiana obrazu protekcji DNA /91, 92, 82/ i radykalne zwiększenie stabilności transkrybującego kompleksu. Kompleks elongacyjny charakteryzuje wysoka procesywność, ponieważ synteza RNA zostaje przzerwana tylko w momencie napotkania transkrypcyjnego terminatora lub innego sygnału wpływającego na zatrzymanie syntezy RNA.

Struktura i funkcja kompleksu elongacyjnego jest jednym z najlepiej poznanych elementów skomplikowanego i wieloetapowego procesu transkrypcji /22, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 75, 150/. Wynika to z faktu, że kompleks elongacyjny jest najbardziej stabilnym /157/, a przez to najbardziej dostępnym do analiz ze wszystkich kompleksów zaangażowanych w proces transkrypcji. Wiele informacji o strukturze i funkcji tego kompleksu jest niezbędnych dla zrozumienia również innych etapów transkrypcji, w tym procesu inicjacji /76, 96, 100, 101, 102, 103, 104, 105/.

1.4 Rola regionów -35 i -10 promotora w procesie inicjacji transkrypcji

Analizy oddziaływań sekwencji promotorowych z polimerazą RNA wykazały, że silnie konserwowane regiony -35 i -10 znajdują się w ścisłym kontakcie z holoenzymem polimerazy RNA /135, 136/ i są istotne dla bardzo złożonego procesu inicjacji transkrypcji. Dotyczy to zarówno etapów wiązania polimerazy RNA jak i izomeryzacji do kompleksu otwartego. Rola obu heksamerów nie jest definitywnie wyjaśniona, jednakże o ich znaczeniu świadczy fakt, iż wszelkie mutacje skoncentrowane w tych obszarach znacząco wpływają na aktywność promotora /54, 66, 135, 139, 160/. Do niedawna brak było wystarczających informacji o roli poszczególnych zasad w obrębie tych heksamerów w odniesieniu do wiązania polimerazy RNA i tworzenia kompleksu otwartego. Sugerowano, że region -35 jest przede wszystkim odpowiedzialny za rozpoznanie promotora i wiązanie polimerazy RNA, prowadzące do utworzenia kompleksu zamkniętego i za taką orientację enzymu, która ułatwi stereospecyficzne oddziaływanie DNA regionu -10 z polimerazą RNA i utworzenie kompleksu otwartego /43, 66/. Sugestia, iż informacja zawarta w sekwencji regionu -35 jest niezbędna jedynie dla właściwego wiązania polimerazy RNA wynikała z faktu, że mutacje wprowadzone w pozycji -33 tego heksameru wpływały na etap rozpoznania promotora przez polimerazę, ale nie na etap izomeryzacji kompleksu zamkniętego w otwarty /66, 160/. Jednakże dalsze badania (mutageneza *in vitro* promotorów *lacUV5*, λP_{Rx3}) wykazały, że sekwencja regionu -35 wpływa zarówno na powinowactwo polimerazy RNA do promotora, jaki i na tempo tworzenia kompleksu otwartego /54, 66, 141/. Wykazano, że największy wpływ na siłę promotora okazały się mieć podstawienia w pozycji -32 i -34, natomiast podstawienia w pozycji -31, nie miały znaczącego wpływu na ten parametr. Zasada w pozycji -32 może być zaangażowana bezpośrednio w wiązanie z polimerazą RNA (region 4.2 podjednostki σ^{70}). Podstawienie tego nukleotydu powodowało drastyczne zmniejszenie powinowactwa polimerazy RNA do promotora. Podstawienia w pozycji -33 miały różny efekt w zależności od tego, jaka zasada została wprowadzona. Wstawienie w tej pozycji guaniny generowało trimer TTG, który jest konserwowany w wielu promotorach i charakterystyczny dla najsilniejszych promotorów. Wzrost powinowactwa występuje również wtedy, gdy w pozycji -34 wprowadzi się guaninę, natomiast wbudowanie cytozyny lub adeniny generuje najsłabsze promotory. Sugerowano, że ta pozycja może odgrywać znaczącą rolę zarówno w powinowactwie polimerazy RNA do promotora, jak i w tworzeniu kompleksu otwartego oraz, podobnie jak pozycja -32, oddziaływać z regionem 4.2 podjednostki σ^{70} /66/.

Niezależnie od istotnej roli przypisywanej heksamerowi -35 sugerowano, że sekwencja regionu -35 może być z powodzeniem funkcjonalnie zastąpiona przez kontakty polimerazy RNA z odpowiednimi aktywatorami białkowymi, bądź przez obecność dodatkowej konserwowanej sekwencji w pobliżu regionu -10 w tzw. *extended -10 promoters* /8/.

Siebenlist, jako pierwszy pokazał, że tworzenie kompleksu otwartego (w promotorze A3 faga T7) jest łączone z separacją nici w regionie obejmującym pozycje -8 do +3, a więc zachodzi na region -10 /135/. Wykorzystując mutagenezę *in vitro* wykazano, iż wspomniany wyżej heksamer ma duże znaczenie na etapie tworzenia kompleksu zamkniętego, stabilizując początkowe oddziaływania formy dwuniciowego DNA z polimerazą RNA, a następnie jako jednoniciowe DNA kieruje procesem izomeryzacji tego enzymu do jego aktywnej, funkcjonalnej formy odpornej na heparynę. Wszelkie substytucje w regionie -10, kiedy DNA jest „otwarty” nie mają większego znaczenia, co świadczy o tym, że kiedy DNA jest w formie jednoniciowej, sekwencja przestaje mieć znaczenie lub ma znaczenie marginalne /43/. Natomiast sekwencja -10 ma duży wpływ na rozpoznanie dwuniciowego DNA i izomeryzację kompleksu /29, 43, 122/. W eksperymentach z wykorzystaniem mutagenyzy *in vitro* wykazano, że największy wpływ na aktywność promotora miały mutacje w pozycjach -12, -11 i -7, a więc w pozycjach najsilniej konserwowanych zasad /43, 54, 160/. Sugerowano również, w oparciu o analizy współzawodnictwa wiązania różnych sekwencji promotorowych przy pomocy techniki filtracji na filtrach membranowych, że „górną” połowa regionu -10 (TATAAT) dominuje w procesie rozpoznania DNA przez σ^{70} /37/. Także analiza kompleksów z wykorzystaniem procesu inicjacji abortywnej wskazuje, że pierwsze dwie zasady TA heksameru -10 są najważniejsze dla funkcjonowania promotora, podkreślając jednocześnie rolę nici niematrixowej w formie jednoniciowej /118/. Na podstawie badań z wykorzystaniem nadmanganianu potasu, który wykrywa niesparowane tyminy w DNA, badań z zastosowaniem matryc widełkowych (ang. *fork junction*), a także badań roli jednoniciowego DNA w stabilizacji kompleksu z zastosowaniem techniki współzawodnictwa stwierdzono, że występowanie adeniny w pozycji -11 jest krytyczne dla inicjacji transkrypcji i utrzymania DNA w formie „otwartej” /37, 43, 52, 86, 113/. Substytucje pozycji -11A zasadą G lub T znacznie zmniejszają zdolność wiązania polimerazy RNA z odpowiednim jednoniciowym DNA /113/. Inne analizy sugerują również, że adenina w pozycji -11 jest nie tylko odpowiedzialna za proces topnienia DNA, ale również jest miejscem, w którym ten proces się rozpoczyna /54, 52, 80/. Matlock i wsp. stwierdzili, że azot N1 adeniny w pozycji -11 odgrywa znaczącą rolę w specyficznym

rozpoznawaniu tej zasady przez polimerazę RNA. Pozwoliło to na stworzenie prawdopodobnego modelu procesu inicjacji „topnienia” DNA. Atom azotu w pozycji N1 adeniny jest zaangażowany w tworzenie wiązania wodorowego typu Watsona-Cricka z zasadą -11T nici matrycowej, w związku z tym polimeraza RNA prawdopodobnie musi konkurować z tą zasadą o wiązanie z N1 adeniny nici niematrixowej /86/. Sugerowano, że adenina w pozycji -11, oddziałując z podjednostką σ^{70} polimerazy RNA, znajduje się pomiędzy aminokwasami aromatycznymi, Trp-433 i Tyr-430 /44, 80/.

Substytucje w pozycjach silnie konserwowanych zasad -12T (w 80% sekwencji znanych promotorów) i -7T w jednoniciowym DNA nie miały wpływu na rozpoznanie przez polimerazę RNA. Być może zasada -12T odgrywa rolę w rozpoznaniu przez polimerazę RNA dwuniciowego DNA /113/, co sugerują badania wykorzystujące współzawodnictwo w wiązaniu do polimerazy RNA dwuniciowych matryc zawierających konsensusowe i zmienione nukleotydy w regionie -10 /43/. Występująca w pozycji -12 para T-A jest charakterystyczna dla promotorów o wysokiej aktywności transkrypcyjnej, z których szybciej zachodzi proces transkrypcji. Jednakże, pomimo efektywnego tworzenia kompleksu otwartego z tego typu promotorów, w warunkach nadmiaru enzymu w procesie transkrypcji *in vitro*, powstawało mniej transkryptów, niż w przypadku obecności w pozycji -12 pary G-C. Być może, w tych warunkach, obecność pary zasad T-A zapobiegała ucieczce polimerazy z abortywnej fazy transkrypcji i hamowała przejście kompleksu inicjacyjnego w procesywną fazę transkrypcji /159/. Parę G-C można znaleźć tylko w 4 do 10 % naturalnie występujących, znanych promotorów, jednakże wiele silnych promotorów zawiera w tej pozycji właśnie tę parę, np. promotor λP_R czy T7A1. Stwierdzono ponadto, że w przypadku około 75% promotorów zawierających w pozycji -10 parę zasad C-G, również w pozycji -12 zawierało parę G-C /159/. Najsilniej konserwowaną zasadą w regionie -10 jest T w pozycji -7 (występująca w około 90% znanych promotorów), jednakże jej rola nie została wyjaśniona. Być może zasada ta uczestniczy w stabilizacji kompleksu otwartego. Jednak na podstawie badań z wykorzystaniem matryc widelkowych stwierdzono, że podstawienia pozycji -7 w formie jednoniciowej nie miały wpływu na tworzenie kompleksu otwartego opornego na heparynę /52/.

Sekwencje promotorowe wykształciły się w procesie ewolucji, jednak nie jest możliwe, aby promotory zawierały sekwencję optymalną dla wszystkich etapów złożonego i skomplikowanego procesu inicjacji transkrypcji. Obecność pewnych zasad może z jednej strony zmniejszać prawdopodobieństwo utworzenia kompleksu binarnego opornego na heparynę, ale z drugiej strony ułatwiać izomeryzację tego kompleksu do formy zdolnej do

syntezy RNA. Zatem sekwencja zasad regionu -10 promotora może wywierać różny wpływ na poszczególne etapy prowadzące do utworzenia aktywnego kompleksu transkrypcyjnego [159]. Poza tym należy rozdzielić sekwencję zasad ważną dla funkcjonowania promotora jako całości od sekwencji, które są ważne dla wiązania jednoniciowego DNA.

Argumenty przytoczone powyżej świadczą o tym, że w funkcjonowaniu regionów -35 i -10 istotną rolę odgrywają specyficzne kontakty zasad tych heksamerów z polimerazą RNA. Stwierdzenie tego typu oddziaływań nie wyjaśnia jednak, czy rozpoznanie promotora przez enzym w procesie inicjacji transkrypcji ma charakter sekwencyjny, i czy powstanie pierwszego, zamkniętego kompleksu polimerazy RNA z DNA, wymaga równoczesnego wystąpienia wszystkich oddziaływań. Ta druga możliwość wydaje się mało prawdopodobna. Założenie o sekwencyjnym charakterze oddziaływań sekwencji promotorowej z enzymem skłania do przypuszczenia, że jakiś fragment promotora pierwszy kontaktuje się z polimerazą RNA i zwiększa prawdopodobieństwo utworzenia pozostałych wiązań stabilizujących kompleks. W takim przypadku to pierwotne miejsce wiązania enzymu przez sekwencję promotorową odgrywałoby decydującą rolę w interakcji enzymu i DNA. Sekwencja ta pełniłaby zatem dominującą rolę w procesie rozpoznania, a utworzenie kontaktów z białkiem w obrębie tej sekwencji byłoby czynnikiem limitującym wystąpienie wszystkich pozostałych etapów inicjacji transkrypcji. Istnieją przesłanki, by sądzić, że taka sytuacja ma rzeczywiście miejsce. W eksperymentach interferencji rodników hydroksylowych stwierdzono po raz pierwszy, że delecje nukleozydów analizowane w szerokim kontekście sekwencji promotorowej i unikalnych warunkach termodynamicznych tworzenia kompleksów dają efekt zależny od lokalizacji takiej delecji. Stwierdzono, że delecje, które uniemożliwiają w tych warunkach powstanie kompleksów binarnych, a więc limitują wszystkie pozostałe fazy inicjacji transkrypcji, zlokalizowane są w regionie -35 nici matrycowej. Równocześnie, delecje tego typu zlokalizowane w regionie -10, drugim potencjalnym miejscu pierwotnego kontaktu polimerazy RNA z cząsteczką DNA, nie wywierały takiego negatywnego efektu na wiązanie. Eksperymenty te pozwalają przypisać heksamerowi -35 dominującą rolę we wczesnych fazach rozpoznania sekwencji promotorowej. Hipotezę tę potwierdzają kinetyczne eksperymenty z użyciem lasera Nd Yag generującego pojedyncze impulsy (5 ns) przy 260 nm [10, 11]. Pierwsze wiązania krzyżowe w wyniku zastosowania światła UV, dotyczą regionu -35. Kolejne eksperymentalne potwierdzenie tej sugestii stanowią ostatnie analizy wykonane przez Sclavi i wsp., poświęcone szybkim kinetycznym analizom procesu oddziaływania

polimerazy RNA z promotorem metodą footprintingu rodnikami hydroksylowymi, generowanymi przez promienie X /126/. Nie oznacza to jednak, że zakończone sukcesem pierwotne oddziaływanie odpowiednich domen polimerazy RNA i heksameru -35 musi być tą fazą procesu inicjacji transkrypcji, która decyduje o sile promotora. Zgodnie z powszechnie akceptowanym poglądem, czynnikiem limitującym szybkość transkrypcji jest proces izomeryzacji kompleksu zamkniętego w otwarty. Odbywa się to jednak na jednym z późniejszych etapów inicjacji transkrypcji. Istnieją podstawy by sądzić, że ranga obu heksamerów promotora we wczesnej fazie transkrypcji jest różna i może się zmieniać w odniesieniu do różnych faz procesu inicjacji transkrypcji. Najprawdopodobniej też w różnych fazach procesu inicjacji transkrypcji najważniejszą rolę mogą odgrywać oddziaływania o różnym charakterze. Prawdopodobne też wydaje się, że w pierwszych fazach inicjacji transkrypcji znaczny udział mogą mieć oddziaływania niespecyficzne.

1.5 Polimeraza RNA jako cel działania antybiotyków

Polimeraza RNA, centralny enzym odpowiedzialny za ekspresję genów u bakterii, jest celem działania związków przeciwbakteryjnych m.in. rifampicyny /127, 128/ i jej pochodnych, streptolidyginy /19/, czy też niedawno odkrytych niskocząsteczkowych inhibitorów, takich jak microcin (MccJ25, cykliczny peptyd zbudowany z 21 aminokwasów) /124/, CBR (N-hydroxy-N'-fenylo-3-trifluorometylo-benzamidyna) /4/ czy też sorangicyna (polieter makrolidowy) /16/. Obecnie tylko rifampicyna i jej pochodne są istotnymi klinicznie antybiotykami, wykorzystywanymi w terapii przeciwgruźliczej. Jednakże coraz częściej pojawiające się szczepy bakteryjne odporne na ten antybiotyk wymuszają poszukiwanie nowych związków.

Badania dotyczące mutagenyzy polimerazy RNA *E. coli*, badania biochemiczne /88, 109, 62, 130, 131/ oraz krystalograficzne analizy strukturalne rdzenia polimerazy RNA *Thermus aquaticus* związanego z rifampicyną /18/ pozwoliły stwierdzić, że antybiotyk ten wiąże się do miejsca zlokalizowanego w obrębie kanału głównego, w „kieszeni” podjednostki β , w odległości około 12 Å od miejsca aktywnego, zatrzymując elongację RNA na etapie 2-3 nukleotydów. Badania z wykorzystaniem metody opartej na miejscowo specyficznym tworzeniu wiązań krzyżowych (ang. *crosslinking*) wykazały, że rifampicyna blokuje miejsce, w którym łańcuch RNA wychodzi z katalitycznego centrum polimerazy RNA. Sorangicyna wiąże się w tym samym miejscu co rifampicyna i charakteryzuje ją

podobny mechanizm działania. Jednakże analizy genetyczne wskazują, że wiązanie rifampicyny zależy od kształtu kieszeni wiążącej antybiotyku, a mutacje warunkujące oporność na ten antybiotyku wpływają na kształt tej struktury, uniemożliwiając w efekcie wiązanie antybiotyku. W przypadku sorangicyny zjawisko oporności nie jest tak istotne, co najprawdopodobniej jest związane z konformacyjną giętkością tego antybiotyku pozwalającą na dopasowanie się do zmian w miejscu wiążącym antybiotyku. Właściwość ta może być wykorzystana przy projektowaniu inhibitorów szybko mutujących celów w enzymie /16/. Inny antybiotyku, streptolidygina (*3-acetyltetramic acid*), wiąże się w pobliżu miejsca aktywnego enzymu oddziałując bezpośrednio ze strukturą *bridge helix* (ryc. 1) i zapobiega zmianom konformacyjnym tej struktury uniemożliwiając w ten sposób wiązanie nukleotydów i elongację łańcucha RNA /129/. Antybiotyku ten działa efektywnie *in vitro* w odniesieniu do szeregu bakteryjnych polimeraz RNA, ale nie jest klinicznie istotny, ponieważ K_i mieści się zakresie stężeń 10-100 μM , podczas gdy ta wielkość dla rifampicyny jest rzędu nM. Poza tym błony komórek bakteryjnych nie są przepuszczalne dla streptolidyginy /56, 129/. Wśród niskocząsteczkowych inhibitorów transkrypcji blokujących działanie polimerazy RNA, znajdują się microcin J25 /28, 94, 36/ czy CBR703 /4/. Modelowanie molekularne, badania biochemiczne i genetyczne sugerują, że MccJ25, produkt genu *mccJ* /137/, wiąże się z polimerazą RNA w obrębie mniejszego kanału (ang. *secondary channel*), prawdopodobnie blokując ten kanał i uniemożliwiając w ten sposób wprowadzenie nukleotydów do centrum aktywnego enzymu /161, 94/. Nie wyklucza to również możliwości, że MccJ25 działa na polimerazę RNA poprzez inny, nieznanый jeszcze mechanizm inhibicji. CBR703, podobnie jak streptolidyna, wiąże się w pobliżu struktury *bridge helix*. Prawdopodobnie zapobiega zmianom konformacyjnym tej domeny uniemożliwiając ruch struktur centrum aktywnego, które są połączone z miejscem wiążącym ten związek przez *bridge helix*. Powoduje to blokadę wiązania nukleotydów i utworzenia pierwszych wiązań fosfodiesterowych /4/.

Polimeraza RNA, enzym o złożonej, multidomenowej budowie, zawiera szereg charakterystycznych elementów strukturalnych, które mogą być potencjalnymi miejscami działania niskocząsteczkowych związków przeciwbakteryjnych. Można sądzić, że zaawansowane badania strukturalne bakteryjnej polimerazy RNA i potencjalnych związków antybakteryjnych działających na ten enzym, z jednej strony dostarczą informacji o strukturze i funkcjonowaniu enzymu, z drugiej natomiast pozwolą na opracowanie nowych pochodnych istniejących już związków przeciwbakteryjnych lub syntezę nowych, działających specyficznie na inne cele w enzymie. Istnieje również

możliwość zaprojektowania i otrzymania związków chimerycznych działających jednocześnie na kilka miejsc w polimerazie RNA.

2. CEL PRACY

Na etapie inicjacji transkrypcji podjednostka σ^{70} , która wraz z rdzeniem tworzy holoenzym polimerazy RNA, specyficznym rozpoznaje dwa konserwowane ewolucyjnie regiony -35 i -10. Region -10 jest miejscem, w którym następuje zmiana struktury DNA podczas transkrypcji, tzn. lokalna konwersja z formy dwuniciowej do jednoniciowej, będącej etapem kierowanego przez polimerazę RNA tworzenia funkcjonalnego kompleksu otwartego. Mniej jednoznacznie można określić natomiast funkcję sekwencji -35 w procesie inicjacji transkrypcji.

Istnieją uzasadnione dowody, by sądzić, że sumaryczna efektywność procesu inicjacji transkrypcji jest wypadkową różnorodnych i często przeciwstawnych efektów związanych z wiązaniem polimerazy RNA do sekwencji promotorowej, a także dalszych procesów prowadzących do powstania aktywnego transkrypcyjnie kompleksu inicjacyjnego. Analizując wpływ sekwencji na funkcjonowanie promotora w procesie transkrypcji, należałoby rozdzielić wpływ tych sekwencji na wiązanie enzymu od ich roli w kolejnych fazach transkrypcji. Ponadto celowe byłoby niezależne zdefiniowanie roli każdego z heksamerów w wiązaniu polimerazy RNA, a także w ich funkcjonowaniu na kolejnych etapach procesu inicjacji transkrypcji.

Dotychczasowe wyniki eksperymentów nie pozwalają jednoznacznie określić, czy wkład obu heksamerów w oddziaływanie z polimerazą RNA jest równocenny, czy też któryś z dwóch heksamerów jest istotniejszy w tym procesie. Zasadne wydaje się również pytanie, czy oddziaływanie niespecyficzne w obrębie sekwencji promotorowej mogą być istotne w funkcjonowaniu promotora.

W związku z tym celem pracy jest określenie rangi i wkładu regionów -10 i -35 promotora, a także roli oddziaływań niespecyficznym, w wiązaniu polimerazy RNA i tworzeniu aktywnego kompleksu inicjacyjnego zdolnego do procesu transkrypcji. W tym celu, wykorzystując promotor A1 faga T7 należy skonstruować fragmenty promotorowego DNA zawierające częściowo i całkowicie zmienione regiony -10 i -35, przeprowadzić analizy efektywności wiązania polimerazy RNA przez zmodyfikowane sekwencje promotorowe, tworzenia kompleksów otwartych, a także zdolności przejścia do produktywniej fazy transkrypcji wykorzystując reakcję transkrypcji *in vitro* w warunkach limitowania substratów.

3. MATERIAŁY

3.1 Szczepy bakteryjne

DH5α *Escherichia coli* [F⁻, Φ 80 *lacZAM15*, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (r_k⁻ m_k⁻), *supE44*, *relA1deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)*U169*] (Z. Burton, Michigan State, University East Lansing)

BL21(DE3)^c*Escherichia coli* [*hsdS gal*(λ*cl*ts857 *ind1Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*)] (Novagen)

R120 *Escherichia coli* F⁻ *lac his metB thi strA rpoC^{ts}*[pLacI^Q(K)] (dzięki uprzejmości M. Kashleva) /63/

3.2 Plazmidy

pDS1 – 3833 pz, [Ap^R; ori-pBR322; ori-ColE1] pMB1 (NCBI – 490681; dzięki uprzejmości H. Heumanna)

pMKA201 – 7.2 kb, [Ap^R; ori-f1; *lacPT7 – rpoC*(H6C)] (dzięki uprzejmości M. Kashleva) /63/.

pHTT7f1-CHα - [Ap^R; ori-pBR322; ori-f1; Φ10P-*rpoA*(H6C)] (dzięki uprzejmości H. H. Ebrigha) /142/.

3.3 Pożywki

W doświadczeniach wykorzystano pożywki, płynną LB i stałą LA, które zostały przygotowane według następującej procedury (tab. 3.1a, 3.1b):

Tab. 3.1a Pożywka płynna LB

<i>Składniki</i>	<i>Ilość</i>
Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g
Woda	do 1000 ml

Tab. 3.1b Pożywka stała LA

<i>Składniki</i>	<i>Ilość</i>
Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Woda	do 1000 ml

Przygotowane pożywki sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem 1atm., w temperaturze 121°C przez 20 min. Następnie dodawano roztworu ampicyliny do stężenia końcowego 100 µg/ml.

3.4 Bufory stosowane do enzymów

3.4.1 10x 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 10 x stężony bufor do enzymu restrykcyjnego *Bam*HI (MBI Fermentas)

10 mM Tris-HCl pH 8.0
100 mM KCl
5 mM MgCl₂
0.02% Triton X-100
0.1 mg/ml BSA

3.4.3 10 x stężony bufor do enzymu restrykcyjnego *Bgl*III (MBI Fermentas)

50 mM Tris-HCl pH 7.5
100 mM NaCl
10 mM MgCl₂
0.1 mg/ml BSA

3.4.4 10 x stężony bufor do enzymu restrykcyjnego *Eco*471 (*Ava* II) (MBI Fermentas)

10 mM Tris-HCl pH 8.5
100 mM KCl
10 mM MgCl₂
0.1 mg/ml BSA

3.4.5 10 x stężony bufor do enzymu restrykcyjnego *Eco*RI (MBI Fermentas)

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 w 37 °C)
100 mM MgCl₂
100 mM NaCl
0.02% Triton X-100
0.1 mg/ml BSA

3.4.6 10 x stężony bufor do kinazy polinukleotydowej (MBI Fermentas)

700 mM Tris-HCl, pH 7.6
100 mM MgCl₂

50 mM DTT

3.4.7 10 x stężony bufor do alkalicznej fosfatazy (MBI Fermentas)

100 mM Tris-HCl pH 7.5

100 mM MgCl₂

3.4.8 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 Taq Polimeraza DNA do reakcji PCR, 1 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.2 *Bam*HI, 10 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.3 *Bgl*II, 10 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.4 *Eco*471 (*Ava* II), 10 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.5 *Eco*RI, 10 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.6 RNaza, 1000 u/ μl (MBI Fermentas)

3.5.7 Fragment Klenowa polimerazy I DNA, 1 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.8 Ligaza DNA faga T4, 1 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.9 Fosfataza alkaliczna (CIP), 1 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.10 Kinaza polinukleotydomowa , 10 u/μl (MBI Fermentas)

3.5.11 Lizozym w 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 (10 mg/ml) (Sigma)

3.5.12 Polimeraza RNA *E. coli* (otrzymana przez dr hab. Władysława Werela w Instytucie Maxa Plancka fuer Biochemie w Martinsried)

3.6 Startery

Wykorzystano startery o stężeniu 10 μM (Thermo Hybaid GmbH)

3.6.1 **PLA1:** 5'-GGA TCC TCG AGA TCC CGA AAA TTT ATC AAA-3'

3.6.2 **PPA1:** 5'-GGA TCC TCG AGC TCC AGA TCC CGG ACC C-3'

3.6.3 **oligoLA1:** 5'-GGA TCC CGA AAA TTT ATC AAA AAG AGT AGA ATT
CTAAAG TCT AAC CTA TAG GAT ACT TAC-3'

3.6.4 **TBL:** 5'-GCG GAG ATC TGC CAT CGA GAG GGA C-3'

3.6.5 **TBR1:** 5'-GCG GAG ATC TCT GTG TAT AGG TTA GAG TTT A-3'

3.6.6 **TBR2:** 5'-GCG GAG ATC TCA TCC TAT AGG TTA GAC TTT A-3'

3.6.7 **kfA1:** 5'-GTA TTG ACT TAA AGT CTA ACC TAT AG-3'

3.6.8 **kfO₃₅:** 5'-GTA GAA TTC TAA AGT CTA ACC TAT AG-3'

3.7 Nukleotydy

dNTP set 100 mM (MBI Fermentas)

3.8 Roztwory do lizy alkalicznej

3.8.1 Roztwór I - Bufor GET

50 mM glukoza

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

3.8.2 Roztwór II – Mieszanina lizująca (przygotowana bezpośrednio przed użyciem)

Na 6 ml roztworu

1 M NaOH 1.2 ml

10% SDS 0.6 ml

woda redestylowana 4.2 ml

3.8.3 Roztwór III – Octan potasu w lodowatym kwasie octowym

Roztwór na 20 ml:

5 M octan potasu 12 ml

lodowaty kwas octowy 2.3 ml

woda redestylowana 5.7 ml

3.8.4 Fenol

3.8.5 Roztwór chloroform-alkohol izoamyłowy (24:1)

3.9 Roztwory wykorzystane do wytrącania DNA

3.9.1 3 M octan sodu, pH 5.2

3.9.2 13 M octan amonu

3.9.3 Alkohol etylowy 96 %

3.9.4 Alkohol etylowy 70 %

3.10 Roztwory wykorzystane do przygotowania komórek kompetentnych

3.10.1 100 mM CaCl₂

CaCl₂ 1.47 g

Woda do 100 ml

3.11 Roztwory wykorzystane do transformacji

3.11.1 Pożywka płynna LB z glukozą

1 M glukoza	200 μ l
Pożywka LB	do 1 ml

3.12 Roztwory wykorzystane do hodowli bakterii i oczyszczania polimerazy RNA

3.12.1 0.5 mM roztwór IPTG

IPTG	1.26 g/5000 ml hodowli bakteryjnej
hodowla bakteryjna	5000 ml

3.12.2 0.5 M roztwór PMSF

PMSF	0.87 g
etanol 70%	do 10 ml

3.12.3 50 mM roztwór NiSO₄

NiSO ₄	1.4 g
Woda redestylowana	do 100 ml

3.12.4 Bufor D

1 M Tris-HCl, pH 7.9	50 ml
5 % glycerol	50 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	200 μ l
woda	do 1000 ml

3.12.5 40 mM roztwór imidazolu

Imidazol	54.4 mg
Bufor D	do 20 ml

3.12.6 400 mM roztwór imidazolu

Imidazol	544 mg
Bufor D	do 20 ml

3.13 Roztwory stosowane do badania oddziaływań białko DNA

3.13.1 5 mCi roztwór [γ -³²P] ATP (aktywność właściwa 7000 Ci/mmol)

3.13.2 Bufor 8 mM Tris-HCl pH 7.9

3.13.3 Bufor do kompleksów (10 x stężony):

80 mM Tris-HCl, pH 7.9
500 mM NaCl

10 mM β -merkaptoetanol (2-merkaptoetanol)

3.13.4 Mieszanina do reakcji transkrypcji *in vitro* – „MIX”

0.4 mM ApUpC	2 μ l
5 mM ATP	1 μ l
5 mM GTP	1 μ l
150 mM MgCl ₂	1 μ l

3.13.5 Bufor TE

1 M Tris-HCl, pH 7.9	10 ml
0.5 M EDTA, pH 8.0	0.4 ml
woda redestylowana	do 1000 ml

3.13.6 Roztwory wykorzystane w reakcji footprintu nadmanganianem potasu

3.13.6.1 Roztwór wyjściowy nadmanganianu potasu (KMnO₄)- 0.1 M

nadmanganian potasu	36.06 mg
woda dejonizowana	do 20 ml

3.13.6.2 Roztwór roboczy nadmanganianu potasu – 15 mM

3.13.6.3 Piperydyna

3.13.7 Roztwory do autoradiografii

3.13.7.1 Roztwór do wywoływania klisz rentgenowskich

<u>Część A</u>	995 g
węglan sodu	
siarczyn sodu	

<u>Część B</u>	148 g
hydrochinon	
1-fenylopirazolidyn-3-on	
woda	do 9 l

3.13.7.2 Roztwór utrwalający do klisz rentgenowskich

<u>Część A</u>	
tiosiarczan sodu krystaliczny	2160 g

<u>Część B</u>	
chlorek amonu	270 g

<u>Część C</u>	
pirosiarczyn sodu	180 g
woda	do 9 l

3.14 Elektroforeza agarozowa DNA

3.14.1 Roztwór stężony bromku etydyny o stężeniu 5 mg/ml

3.14.2 6 x stężony roztwór barwników do elektroforezy:

0.09 % błękit bromofenolowy

0.09 % cyjan ksylenu

60 % glicerol

60 mM EDTA

3.14.3 Bufor TBE 10 x stężony

Tris 108 g

Kwas borowy 55 g

0.5 M EDTA pH 8.0 2 ml

Woda redestylowana 1000 ml

stężony HCl do pH 8.3

3.15 Elektroforeza poliakryloamidowa białek

3.15.1 Roztwór akrylamidów (30/0.8 %)

Bisakrylamid 0.8 g

Akrylamid 30 g

Woda do 1000 ml

3.15.2 Bufor do żelu górnego 0.5 M Tris-HCl/0.4% SDS pH 6.8

Tris 60.57 g

SDS 2 g

Woda do 500 ml

3.15.3 Bufor do żelu dolnego 1.5 M Tris-HCl /0.4% SDS pH 8.8

Tris 20.19 g

SDS 2 g

Woda do 500 ml

3.15.4 Bufor do elektroforezy SDS (10 x stężony)

Tris 30.2 g

Glicyna 142.2 g

SDS 10 g

Woda do 1000 ml

3.15.5 Bufor lizujący

1 M Tris-HCl, pH 6.8	12.5 ml
SDS	5 g
2-merkптоetanol	10 ml
błękit bromofenolowy	10 mg
glicerol	20 ml

3.15.6 Roztwory do barwienia żeli poliakryloamidowych azotanem srebra

3.15.6.1 Roztwór azotanu srebra

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

3.15.6.2 Roztwór wywołujący

1 % kwas cytrynowy	1 ml
37 % formaldehyd	100 μ l
woda	do 200 ml

3.15.6.3 Roztwór przerywający

10 % kwas octowy	50 ml
45 % metanol	50 ml

3.16 Elektroforeza w żelach sekwencyjnych

3.16.1 Bufor obciążający do żeli sekwencyjnych

98 % dejonizowany formamid
10 mM EDTA (pH 8.0)
0.025 % cyjan ksylenu
0.025 % błękit bromofenolowy

3.16.2 Roztwór akrylamidów (patrz punkt 3.15.1)

3.16.3 Bufor TBE 10 x stężony (patrz punkt 3.14.3)

3.17 Żele

3.17.1 Żel agarozowy

W zależności od masy cząsteczkowej rozdzielanych fragmentów, przygotowano 1-2% żel agarozowy według tabeli 3.2:

Tab. 3.2 Przygotowanie żeli agarozowych

<i>Skład</i>	<i>1%</i>	<i>2%</i>
agaroz	250 mg	500 mg
woda	22.25 ml	22 ml

Następnie roztwory ogrzewano, aż do rozpuszczenia się agarozy, dodawano 2.5 ml buforu TBE (1 x stęż.) (patrz 3.14.3) i wlewano do poziomego aparatu do elektroforezy. Przed zestalaniem w żelu umieszczano grzebień.

3.17.2 Niedenaturujący żel poliakryloamidowy

Niedenaturujący żel poliakryloamidowy przygotowano w sposób przedstawiony w tabeli 3.3:

Tab. 3.3 Przepisy dla niedenaturujących żeli poliakryloamidowych o różnych stężeniach

<i>Skład</i>	<i>3.5%</i>	<i>5%</i>	<i>6%</i>	<i>10%</i>
30 % roztwór akrylamidów	2.32 ml	3.32 ml	3.98 ml	6.64 ml
10 x stęż. TBE	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
woda	15.46 ml	14.46 ml	13.8 ml	11.14 ml
10 % nadsiarcezan amonu	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Po dokładnym wymieszaniu składników roztworu mieszaninę wlewano pomiędzy wcześniej przygotowane (dokładnie umyte, odtłuszczone i uszczelnione) płytki szklane, między płytkami umieszczano grzebień i pozostawiano do momentu spolimeryzowania żelu (około 20-30 minut).

3.17.3 Denaturujący żel poliakryloamidowy (SDS)

W celu przygotowania denaturującego żelu poliakryloamidowego mieszano składniki według tabel 3.4a i 3.4b:

Tab.3.4a Roztwory wykorzystane do przygotowania „dolnego” denaturującego żelu poliakryloamidowego o różnych stężeniach

<i>Składniki żelu</i>	<i>12.5%</i>	<i>10%</i>
1.5 M Tris pH 8.8 0.4% SDS	2 ml	2 ml
Roztwór akrylamidów (30%/0.8%)	3.3 ml	2.64 ml
woda	2.7 ml	3.37 ml
10 % nadsiarazan amonu	40 µl	40 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Tab. 3.4b Roztwory wykorzystane do przygotowania „górnego” denaturującego żelu poliakryloamidowego

<i>Składniki żelu</i>	<i>Ilość</i>
0.5 M Tris pH 6.8 0.4 % SDS	0.8 ml
Roztwór akrylamidów (30%/0.8%)	0.5 ml
woda	2.1 ml
10 % nadsiarazan amonu	30 µl
TEMED	6 µl

Przygotowane składniki żelu dolnego wlewano pomiędzy wcześniej przygotowane szklane płytki (umyte, odfuszczone i dobrze uszczelnione), na powierzchnię żelu wprowadzono 1 ml wody redestylowanej i pozostawiano do momentu spolimeryzowania. Następnie usuwano wodę, wlewano żel górny, między płytkami umieszczano grzebień i pozostawiono do czasu spolimeryzowania żelu górnego.

3.17.4 Żel sekwencyjny

Na odfuszczone szyby nanoszono roztwór zawierający 3 ml chloroformu i 150 µl dichlorodimetylosilanu (ułatwia oddzielenie szyby od żelu), następnie szyby odpowiednio składowano i przygotowywano żel sekwencyjny mieszając składniki według tabeli 3.5:

Tab. 3.5 Roztwory wykorzystane do przygotowania żeli sekwencyjnych

<i>Skład</i>	<i>8%</i>
Mocznik do elektroforezy	29.4 g
30% roztwór akrylamidów	14 ml
10 x stęż. TBE	7 ml
woda dejonizowana	do 70 ml

Roztwór przygotowywano w temperaturze około 40°C, następnie oziębano i sączono pod próżnią. Dodawano 500 µl 10% nadsiarczanu amonu, 35 µl TEMED-u i wlewano pomiędzy wcześniej przygotowane szyby. Następnie pomiędzy szybami umieszczano grzebień i pozostawiono do momentu spolimeryzowania (około 30 min).

3.18 Złoże chromatograficzne

3.18.1 Złoże agaroza Ni-NTA (QIAGEN)

Jest to złoże, w którego skład wchodzi Ni-NTA związane z Sepharose® CL-6B i wykorzystywane jest do oczyszczania białek zawierających na końcu -N lub -C sześć kolejnych reszt histydynowych. NTA, kwas nitrylotrójoctowy, jest chelatującym adsorbentem zawierającym cztery miejsca wiążące i w związku z tym zajmującym cztery z sześciu miejsc w sferze koordynacyjnej jonów niklu, pozostawiając dwa miejsca wiążące wolne, co umożliwia oddziaływanie z resztami histydynowymi białek. Złoże może wiązać 5-10 mg białek na mililitr żywicy /125/.

3.18.2 Złoże Source™ 15S (Amersham Pharmacia Biotech AB)

Source™ 15S jest silnym jonowymiennym złożem (nośnikiem) opartym na jednowymiarowych, sferycznych, porowatych ziarnach polistyrenowo/diwinyloowo benzenowych o średnicy 15 µm. Grupą funkcyjną jest anion SO₃⁻, a więc jest to silny kationowymieniacz. Przechowywany jest w 20% etanolu w temperaturze pokojowej. Złoże może wiązać około 25 mg białka na mililitr złoża.

3.18.3 Złoże Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB)

Q-Sepharose jest silnym jonowymiennym złożem (wymieniacz anionowy), zawierającym porowate ziarna agarozy o średnicy 90 µm. Z matrycą związany jest anionit, będący czwartorzędową solą amoniową, zdolną do wymiany 0.18-0.25 mmol (Cl⁻)/ml. Przechowywany jest w 20% etanolu w temperaturze pokojowej.

3.19 Odczynniki

<i>Odczynnik</i>	<i>Nazwa firmowa</i>	<i>Firma</i>
Agar	Agar – Agar	Merck
Agaroza	Agarose	Sigma
Akrylamid	Acrylamide	Sigma
Ampicylina	Ampicilinum	Polfa Tarchomin PL
Azotan srebra	Azotan srebra	POCh Gliwice
Bisakrylamid	N,N'-methylene-bis-acrylamide	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
EDTA	EDTA	Sigma
Ekstrakt drożdżowy	Yeast Extract	Gibco BRL
Fenol	Phenol	Sigma
Formaldehyd	Formaldehyd	POCh Gliwice
Glicerol	Glicerol 87%	Sigma
Glicyna	Aminoacetic acid	Sigma
Glukoza	Glocosum	Ubichem
Heparyna	Heparin	Sigma
Imidazol	Imidazole	Sigma
Kwas borowy	Boric acid	Sigma
Kwas cytrynowy	Citric acid	Sigma
Kwas octowy	Kwas octowy 80%	POCh Gliwice
Kwas solny	Kwas solny	POCh Gliwice
Lizozym	Lysozyme	Sigma
Markery masowe 100pz	Gene Ruler™100pz DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
Markery masowe 1000pz	Gene Ruler™1kp DNA Ladder	MBI Fermentas
Metanol	Metanol	POCh Gliwice
Mocznik do elektroforezy	Urea for electrophoresis	Sigma
Nadmanganian potasu	Nadmanganian potasu	POCh Gliwice
Nadsiarczan amonu	Ammonium persulfate	Sigma
Octan amonu	Ammonium acetate	Sigma
Octan potasu	Potassium acetate	Sigma
Octan sodu	Sodium acetate	Sigma
Piperydyna	Piperidine (Hexahydropyridine)	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
Woda amoniakalna	Woda amoniakalna	POCh Gliwice
Wodorotlenek sodu	Wodorotlenek sodu	POCh Gliwice
β-merkaptoetanol	2-Mercapto-Ethanol	Sigma

3.20 Aparatura

Poziomy aparat do elektroforezy agarozowej	Kucharczyk T.E.
Aparat do elektroforezy poliakryloamidowej	Pharmacia Biotech, USA
Aparat do żeli sekwencyjnych	Kucharczyk T.E.
Autoklaw typ A6	SMS, Warszawa
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 Otrzymywanie fragmentów DNA metodą PCR.

Roztwory do reakcji PCR przygotowywano mieszając składniki wg tabeli 4.1:

Tab. 4.1 Przygotowanie próbek do reakcji PCR (na 50 μ l reakcji)

<i>Składniki</i>	<i>Ilość</i>
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
polimeraza DNA , 1 u/ μ l	1.3 μ l
woda dejonizowana jałowa	39.7 μ l
Suma	50 μ l

W zależności od amplifikowanych fragmentów stosowano różne profile temperaturowe (tab. 4.2a, 4.2b, 4.2c).

Tab. 4.2a Warunki reakcji PCR dla różnych fragmentów promotorowego DNA

<u>Dla fragmentów A1, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O₋₃₅, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10}*:</u>	
1.	95°C, 60s
2.	35 cykli: 95°C, 60s
	50°C, 30s
	72°C, 60s
3.	72°C, 200s
2.	4°C

Tab. 4.2b Warunki reakcji PCR dla różnych fragmentów promotorowego DNA - c.d.

<u>Dla fragmentów : kA1, kO₋₃₅*:</u>	
3.	95°C, 60s
3.	30 cykli: 95°C, 60s
	55°C, 30s
	72°C, 60s
3.	72°C, 200s
4.	4°C

Tab. 4.2c Warunki reakcji PCR dla różnych fragmentów promotorowego DNA - c.d.

Dla fragmentu R*:	
1.	95°C, 60s
2.	pętla 1, 3 cykle: 95°C, 60s 40°C, 45s 72°C, 30s
3.	pętla 2, 30 cykli: 95°C, 60s 50°C, 30s 72°C, 60s
4.	72°C, 200s
5.	4°C

(*) - objaśnienia skrótów zastosowanych w tabelach znajdują się w Dodatku (patrz 9.1)

Ponieważ uzyskanie fragmentów L₁(L₃) i L₂(L₄) (patrz 9.1) w przedstawiony powyżej sposób sprawiało trudności (z powodu zbyt niskiej temperatury przyłączania jednego ze starterów), we wstępnej fazie amplifikacji wykorzystano fragment Klenowa polimerazy I DNA. W tym celu połączono wszystkie składniki podane w tabeli 4.1, z wyjątkiem startera 1 (PLA1) (patrz 3.6.1) i polimerazy DNA i ogrzewano w 95°C przez 3min, a następnie umieszczono w lodzie. W dalszej kolejności dodano 5 u fragmentu Klenowa DNA polimerazy I i inkubowano przez 30 min w 37°C. Po inkubacji dodano 1.2 µl startera 1 (PLA1), 1.3 µl Tag polimerazy DNA i przeprowadzano reakcję PCR według schematu podanego dla fragmentów A1, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O₋₃₅, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10}.

Do reakcji amplifikacji wykorzystano termocykler Hot Shot 18, firmy DNA Gdańsk.

4.2 Izolacja plazmidu metodą lizy alkalicznej

5 ml pożywki LB (patrz 3.3) (zawierającej ampicylinę w stężeniu 100 µg/ml) zaszczepiano pojedynczą kolonią bakteryjną i inkubowano, wytrząsając całą noc w temperaturze 37°C. Następnie hodowlę odwirowywano przez 30 s (15000 obr./min, 15850 x g). Supernatant odrzucano, a osad rozpuszczano w 100 µl buforu GET (patrz 3.8.1) i dodawano 10 µl lizozymu (10 mg/ml), intensywnie mieszając. Po 5 min inkubacji w temperaturze pokojowej do roztworu dodawano 200 µl świeżo przygotowanego roztworu II (patrz 3.8.2) i mieszano przez trzykrotne odwracanie próbki. Następnie próbkę umieszczano w lodzie na 5 min, po czym do całości dodawano 150 µl zimnego roztworu III (patrz 3.8.3) i delikatnie mieszano w odwróconej pozycji. Próbki umieszczano w lodzie na 5 min i wirowano (15000 obr./min - 15850 x g, 5 min).

W dalszej kolejności supernatant (około 400 μ l) przenoszono do świeżej probówki, dodawano 250 μ l fenolu i intensywnie mieszano przez 30 s. Wirowano przez 5 minut (15000 obr./min, 15850 x g), supernatant przenoszono do świeżej probówki eppendorfa i dodawano 250 μ l roztworu chloroform-alkohol izoamyłowy (w stosunku objętościowym 24 : 1) i ponownie odwirowywano (15000 obr./min, 15850 x g). Górną warstwę umieszczano w świeżej probówce i dodawano 1 ml 96% alkoholu etylowego o temperaturze pokojowej. Zawartość probówki mieszano przez czterokrotne odwracanie probówki i pozostawiano na 2 min. Następnie odwirowywano przez 5 min (15000 obr./min, 15850 x g), supernatant odrzucano, a osad przemywano dwukrotnie 70 % alkoholem etylowym, 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 przygotowany osad przechowywano w temperaturze -20°C . Do dalszych badań osad rozpuszczano w 30 μ l jałowej, dejonizowanej wody, a następnie dodawano 1 μ l RNazy (10 u/ μ l) i inkubowano w 37°C przez 30 min, w celu pozbycia się RNA, które mogłoby przeszkadzać w dalszych badaniach.

4.3 Oczyszczanie i wytrącanie DNA metodą fenol-chloroform/alkohol etylowy

Do roztworu DNA, który po reakcjach enzymatycznych (PCR, defosforylacja, cięcie enzymami restrykcyjnymi) zawierał zanieczyszczenia białkami, dodawano taką samą objętość mieszaniny fenol-chloroform (1:1), mieszano i wirowano przez 1 min (15000 obr./min, 15850 x g). Zbierano górną warstwę, dodawano do niej 0.1 objętości 3M octanu sodu (pH 7.0) i dwie objętości 96% zimnego alkoholu etylowego (0°C). Zawartość probówki dobrze mieszano i trzymano przez 30 min w temperaturze -20°C . Następnie wirowano przez 10 min (15000 obr./min, 15850 x g) i przemywano dwukrotnie 70% alkoholem etylowym. Otrzymany osad DNA suszono pod próżnią przez 10 minut, a następnie rozpuszczano w 30 μ l jałowej, dejonizowanej wody.

4.4 Cięcie plazmidowego DNA oraz fragmentów DNA enzymami restrykcyjnymi

Do 10 µl roztworu DNA dodawano 2 µl buforu (stężonego 10 razy), odpowiedniego dla danego enzymu restrykcyjnego (patrz 3.4.2-3.4.5), 7µl jałowej, dejonizowanej wody, i 1 µl enzymu o stężeniu 10 u/µl (patrz 3.5.2-3.5.5).

W przypadku plazmidu oczyszczonego metodą lizy alkalicznej, dodawano dodatkowo 1 µl RNazy (10 u/µl). Mieszaninę inkubowano w 37°C przez 4 do 16 godzin (w zależności od zastosowanego enzymu).

*Ava*II - 4 godz. (O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10}, plazmid pDS1)

*Bam*HI – 4 godz. (O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10}, plazmid pDS1)

*Bg*III - 16 godz. (O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10})

*Eco*RI - 16 godz. (O₋₃₅, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10})

Wydajność cięcia plazmidu sprawdzano za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym (patrz 4.10).

4.5 Defosforylacja plazmidowego DNA

Po reakcji trawienia plazmidowe DNA wycinano z żelu i oczyszczano przy pomocy QIAquick PCR Purification Kit, zgodnie z zaleceniami producenta /112/. Następnie do 90 µl roztworu plazmidowego DNA dodawano 10 µl 10x stężonego buforu do defosforylacji (patrz 3.4.7), 1 µl alkalicznej fosfatazy (1u/µl) i inkubowano w 37°C przez 30 min. W celu inaktywacji enzymu mieszaninę ogrzewano przez 10 min w 75°C, a następnie zdefosforylowany DNA oczyszczano, stosując QIAquick PCR Purification Kit /112/.

4.6 Ligacja

4.6.1 Ligacja fragmentów L₁(L₃), L₂(L₄) z fragmentem R

Oczyszczone po reakcji PCR (patrz 4.3) i trawieniu enzymem *Bg*III (patrz 4.4) fragmenty DNA: L₁(L₃), L₂(L₄), R wytrącano (patrz 4.3): L₁(L₃) z R i L₂(L₄) z R. Tak wytrącone razem fragmenty DNA zawieszano w 13 µl jałowej dejonizowanej wody, dodawano 1.5 µl buforu do T4 DNA ligazy (patrz 3.4.8) i 0.5 µl T4 DNA ligazy (10 u/µl). Mieszaninę ligacyjną inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Otrzymane

w wyniku ligacji fragmenty O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10} oczyszczano, stosując QIAquick PCR Purification Kit /112/.

4.6.2 Ligacja fragmentów O₋₁₀, O_{1/2-10}, O₋₃₅, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10} z plazmidem pDS1

Fragmenty O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10} trawione enzymem restrykcyjnym *Bam*HI (patrz 4.4) i oczyszczone za pomocą QIAquick PCR Purification Kit /112/, mieszano (w stosunku molowym plazmid : fragment – 1:3) z trawionym tym samym enzymem restrykcyjnym, zdefosforylowanym (patrz 4.5) i oczyszczonym plazmidem pDS1 (QIAquick PCR Purification Kit /101/) i wytrącano (patrz 4.3). Osad rozpuszczano w 7 µl jałowej, dejonizowanej wody. Natomiast fragment O₋₃₅ (4.5 µl) (trawiony enzymem restrykcyjnym *Bam*HI i oczyszczony przy pomocy QIAquick PCR Purification Kit /112/) zmieszano z plazmidem pDS1 (1.5 µl) i dodano 1 µl wody. W obu przypadkach mieszaniny ogrzewano przez 5 min w 45°C i schłodzono do 0°C. Następnie do roztworu kolejno dodawano: 1 µl buforu do T4 DNA ligazy (patrz 3.4.8), 1 µl 30 mM roztworu ATP oraz 1 µl T4 DNA ligazy (10 u/µl). W przypadku mieszaniny ligacyjnej pDS1+O₋₁₀, pDS1+O_{1/2-10}, pDS1+O_{-35/1/2-10} i pDS1+O_{-35/-10} inkubację przeprowadzano 10 godzin w 16°C, natomiast w przypadku pDS1+O₋₃₅ inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1.5 godziny.

4.7 Przygotowanie komórek kompetentnych

50 ml pożywki LB (patrz 3.3) zaszczepiano pojedynczą kolonią bakterii *E. coli* szczepu DH5α i inkubowano całą noc w 37°C, intensywnie wytrząsając. Po całonocnej inkubacji 0.5 ml hodowli wprowadzono do świeżej pożywki (50 ml) i hodowano do osiągnięcia przez kulturę OD₆₀₀ = 0.4-0.5. W celu monitorowania wzrostu bakterii, OD₆₀₀ hodowli mierzono co 20-30 minut.

Gotową hodowlę przenoszono do sterylnej probówki wirowniczej, inkubowano w lodzie 10 minut, i odwirowywano przez 10 minut w 4°C (4000 obr./min, wirówka mlw K23). Supernatant odrzucano, a osad zawieszano w 10 ml zimnego 100 mM CaCl₂ (patrz 3.10.1) i trzymano w lodzie około 5 minut, i ponownie odwirowywano (10 minut, 4°C, 4000 obr./min, wirówka mlw K23). Otrzymany osad zawieszano w 2 ml zimnego 100 mM CaCl₂ i rozpipetowywano po 200 µl do 1.5 ml jałowych probówek eppendorfa. Komórki zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -70°C.

4.8 Transformacja

Do 200 μ l komórek kompetentnych dodawano po 5 μ l mieszaniny ligacyjnej – zligowane cząsteczki DNA (pDS1+O₋₁₀, pDS1+O_{1/2-10}, pDS1+O₋₃₅, pDS1+O_{-35/1/2-10}, pDS1+O_{-35/-10}), dokładnie mieszano i inkubowano w lodzie 30 minut. Mieszaninę przenoszono do 42°C na 90 sekund, po czym schładzano w lodzie przez 1-2 minut. Następnie dodawano 720 μ l pożywki LB (patrz 3.3), 80 μ l roztworu glukozy (1 M) i inkubowano w 37°C przez 45 minut. Po tym czasie zawartość probówek (po 100 μ l) wysiewano na płytki LA z ampicyliną (patrz 3.3). Jednocześnie wykonano kontrole, wysiewając komórki kompetentne na płytki z ampicyliną (kontrola ujemna) i na płytki bez ampicyliny (kontrola dodatnia), a także komórki kompetentne transformowane autozligowanym plazmidem pDS1 na płytki z ampicyliną (kontrola efektywności transformacji). Płytki inkubowano 24 godziny w 37°C.

4.9 Analiza otrzymanych transformantów

Pojedyncze kolonie transformantów, które wyrosły na płytkach z ampicyliną, analizowano na obecność właściwych insertów za pomocą reakcji PCR i analiz restrykcyjnych. W tym celu prowadzono płynne hodowle transformantów, izolowano zrekombinowane plazmidy (metodą lizy alkalicznej) (patrz 4.2), a następnie prowadzono analizy restrykcyjne DNA i amplifikację DNA za pomocą odpowiednich starterów. Produkty amplifikacji i analiz restrykcyjnych identyfikowano na żelach agarozowych (patrz 4.10) i poliakryloamidowych (patrz 4.11).

4.10 Elektroforeza w żelu agarozowym

Do próbek DNA dodawano 6 x stężonego roztworu barwnika (patrz 3.14.2) i wprowadzano do studzienek w żelu agarozowym (patrz 3.17.1). Rozdział elektroforetyczny prowadzono pod napięciem 90-95 V, przez 40-50 minut w 1 x stężonym buforze TBE (patrz 3.14.3). DNA uwidacziano poprzez inkubację w rozcieńczonym roztworze bromku etydyny (5 μ l bromku etydyny o stężeniu 5 mg/ml na 100 ml wody) i ekspozycję na światło lampy UV za pomocą transiluminatora i rejestrowano.

4.11 Elektroforeza w niedenaturującym żelu poliakryloamidowym

Próbki na żel przygotowywano jak w punkcie 4.10. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 1 x stężonym buforze TBE (patrz 3.14.3), pod napięciem 120V, przez około 60-70 minut. Prażki DNA uwidacziano jak w punkcie 4.10.

4.12 Hodowla bakterii *E. coli* R120 i BL21 – otrzymywanie polimerazy RNA zawierającej rozszerzenie oligohistydynowe związane z podjednostką β' lub α

250 ml pożywki LB z ampicyliną (stężenie 100 mg/ml) (patrz 3.3) zaszczipiano pojedynczą kolonią szczepu bakterii *Escherichia coli* R120 (patrz 3.1) zawierających plazmid pMKA201 (patrz 3.2), kodujący podjednostkę β' -his. Plazmid ten zawiera gen *rpoC* zaopatrzony w dodatkową sekwencję kodującą sześć reszt histydynowych /63/. W celu otrzymania polimerazy RNA zawierającej rozszerzenie oligohistydynowe związane z podjednostką α , hodowano bakterie szczepu *E. coli* BL21 (patrz 3.1) zawierających plazmid pHTT7f1-CH α (patrz 3.2) zawierający gen *rpoA* i sekwencję kodującą sześć reszt histydynowych /142/. Hodowle inkubowano całą noc w 37°C. Inokulum następnie wprowadzano do 5 l świeżej pożywki LB (patrz 3.3) z ampicyliną (stężenie 100 mg/ml) i hodowano, silnie napowietrzając w 37°C, do momentu osiągnięcia przez hodowlę gęstości (OD₆₀₀) około 0.5. Przy tej wartości OD przeprowadzono indukcję przy pomocy 0.5 mM IPTG (1.3 g/5 l) (patrz 3.12.1) i hodowano jeszcze przez 3-4 godzin. W celu skontrolowania przebiegu indukcji i wydajności ekspresji genu, z hodowli pobierano (przed i po indukcji) próbki hodowli o objętości 1ml, zwirowywano (5 min, 15000 obr./min – 15850 x g), zawieszano w buforze lizującym (patrz 3.15.5), umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 3 min i analizowano na denaturującym żelu poliakryloamidowym (patrz 4.14). Hodowlę zwirowywano (30 min, 4000 obr./min, wirówka mlw K23, 4°C), osad zawieszano w buforze D (patrz 3.12.4), zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

4.13 Oczyszczanie polimerazy RNA

Do zawieszonego w 50 ml buforu D (patrz 3.12.4) osadu bakterii dodawano 4 mg lizozymu, 10 μ l roztworu PMSF (patrz 3.12.2) i inkubowano około 30 minut w 4°C.

Komórki bakterii poddawano lizie przez sonifikację ultradźwiękami (6 cykli po 1 minucie, po każdym cyklu przerwa 1min), cały czas inkubując zawartość probówek w łaźni lodowej (aby zapobiec ogrzaniu układu). Zlizowane komórki bakterii wirowano w ultrawirówce w 4°C przez 30 minut, przy 22000 obr./min (141000 x g). Osad odrzucano, a oczyszczaniu poddawano białka znajdujące się w supernatancie. W supernatancie znajdował się holoenzym polimerazy RNA, zawierający podjednostkę β' z rozszerzeniem polihistydynowym, natomiast w osadzie znajdowało się większość zmodyfikowanej podjednostki β' . Również w przypadku oczyszczania polimerazy RNA zawierającej rozszerzenie oligohistydynowe związane z podjednostką α wykorzystano supernatant, w którym znajdowały się białka rozpuszczalne, zmodyfikowana podjednostka α oraz holoenzym polimerazy RNA zawierający rozszerzenie oligohistydynowe związane z tą podjednostką.

4.13.1 Oczyszczanie enzymu metodą chromatografii powinowactwa złoża Ni-NTA-agarose

4.13.1.1 Przygotowanie kolumny Ni-NTA- agarose

Kolumny przemywano następującymi roztworami:

Woda jałowa, filtrowana	3 objętości kolumny
50 mM roztwór NiSO ₄	2 objętości kolumny
Woda redestylowana jałowa, filtrowana	1 objętość kolumny
Bufor D	2 objętości kolumny

4.13.1.2 Oczyszczanie

Supernatant nanoszono na przygotowaną kolumnę Ni-NTA /143/ (patrz 4.13.1.1), przemywano jedną objętością buforu D (patrz 3.12.4) i jedną objętością 40 mM roztworu imidazolu (patrz 3.12.5), w celu usunięcia niespecyficznie związanych białek. Białka specyficznie związane do złoża eluowano 400 mM roztworem imidazolu (patrz 3.12.6)

4.13.1.3 Regeneracja kolumny

Kolumnę przemywano 2 objętościami jałowej filtrowanej wody i 2 objętościami 100 mM EDTA.

4.13.2 Oczyszczanie polimerazy RNA za pomocą chromatografii (HPLC) na jonowymiennych złożach SourceTM15S i Q-Sepharose

4.13.2.1 Przygotowanie kolumny SourceTM15S i Q-Sepharose

Kolumnę przemywano 20 ml jałowej, redestylowanej, filtrowanej wody, następnie 20-50 ml filtrowanego buforu D (patrz 3.12.4) o pH 6,8 (SourceTM15S) (patrz 3.18.2) lub pH 7,9 (Q-Sepharose) (patrz 3.18.3), przy przepływie 1ml/min.

4.13.2.2 Oczyszczanie

Frację białka po elucji 400 mM roztworem imidazolu (patrz 4.13.1.2), наносono na kolumnę z jonowyminiaczem kationowym (SourceTM 15S) (patrz 3.18.2) lub z jonowyminiaczem anionowym (Q-Sepharose) (patrz 3.18.3). Część białka, która się nie związała (ang. *flow through*) odrzucano (zbierano tylko niewielką ilość próbki do kontroli na żelu poliakryloamidowym). Białka związane ze złożem eluowano liniowym (0.1 M do 1M) gradientem stężenia chlorku sodu i zbierano te frakcje białek, które eluowane były 0.4 M stężeniem soli.

4.13.2.3 Regeneracja kolumny

Kolumnę płukano około 100 ml jałowej, filtrowanej, redestylowanej wody i około 40 ml 2 M roztworu KCl przy przepływie 1ml/min do całkowitego usunięcia pozostałych na kolumnie białek. Na końcu kolumnę przepłukiwano około 20 ml 20% etanolu i przechowywano w 4°C.

4.13.3 Zwiększanie stężenia białka za pomocą zestawu MICROCON[®] - Centifugal 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.

Próbki białka наносono na kolumnienkę z odpowiednim filtrem celulozowym (YM-100) i odwirowywano (20 min, 4°C, 8 tys. obr./min – 51273 x g). Następnie kolumnienkę umieszczano w czystej probówce w odwróconej pozycji i wirowano (15 min, 4°C, 8 tys. obr./min – 51273 x g). Białko osadzone wcześniej na membranie przy wirowaniu

kolumnienki w odwrotnej pozycji zostaje uwolnione z membrany.

4.14 Elektroforeza białek w warunkach denaturujących

Do zebranych próbek eluowanego białka (ok. 45 μ l) dodawano 15 μ l 4x stężonego buforu lizującego (patrz 3.15.5) i umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 3 minuty. Próbkę nanoszono na wcześniej przygotowany denaturujący żel poliakrylamidowy (patrz 3.17.3) i przeprowadzano elektroforezę w buforze SDS 1 x stężonym (patrz 3.15.4, 4.14), pod napięciem 180V przez około 90 do 120 minut. Żel barwiono roztworem azotanu srebra (patrz 3.15.6).

4.15 Barwienie żeli białkowych roztworem azotanu srebra

Żel umieszczony na 60 minut lub całą noc w 50% roztworze metanolu (100 ml), zalewano na 15 minut roztworem azotanu srebra (patrz 3.15.6.1) i 3-krotnie przez 5 minut płukano wodą redestylowaną. Następnie żel „wywoływano” (roztwór wywołujący; patrz 3.15.6.2) do momentu pojawienia się prążków białek, po czym barwienie przerywano stosując roztwór przerywający (patrz 3.15.6.3).

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

Próbki do reakcji znakowania przygotowywano według tabeli 4.3:

Tab. 4.3 Roztwory wykorzystane do radioaktywnego znakowania starterów

<i>Składniki</i>	<i>Ilość</i>
10 μ M starter PPA1 (PLA1, oligoLA1 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 37°C. Następnie inaktywowano enzym przez 10 minut w 68°C, startery oczyszczono za pomocą zestawu

AIQuick Nucleotide Removal Kit zgodnie z zaleceniami producenta /112/. W przypadku ApUpC, po inaktywacji enzymu, nie stosowano oczyszczania.

4.17 Badanie oddziaływań DNA z polimerazą RNA - reakcja tworzenia kompleksów

Kompleksy binarne zostały przygotowane według następującego schematu (tab. 4.4a i 4.4b):

Tab. 4.4a Przygotowanie kompleksów binarnych tworzonych przez polimerazę RNA *E. coli* i różne fragmenty promotora A1 faga T7

	<i>A1</i> (89 ng/μl)	<i>O</i> ₋₁₀ (40 ng/μl)	<i>O</i> _{1/2-10} (38 ng/μl)	<i>O</i> ₋₃₅ (87 ng/μl)
DNA (znakowany ³² P)	1 μl	2.2 μl	2.3 μl	1 μl
holoenzym polimerazy RNA (4 μg/μl)	5.5 μl	5.5 μl	5.5 μl	5.5 μl
Bufor do kompleksów 10 x stężony *	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
woda	2.5 μl	1.3 μl	1.2 μl	2.5 μl

Tab. 4.4b Przygotowanie kompleksów binarnych tworzonych przez polimerazę RNA *E. coli* i różne fragmenty promotora A1 faga T7 – c.d.

	<i>O</i> _{-35/-10} (35 ng/μl)	<i>O</i> _{-35/1/2-10} (36 ng/μl)	<i>kA1</i> (35 ng/μl)	<i>kO</i> ₋₃₅ (96 ng/μl)
DNA (znakowany ³² P)	2.5 μl	2.5 μl	2.5 μl	1 μl
holoenzym polimerazy RNA (4 μg/μl)	5.5 μl	5.5 μl	5.5 μl	5.5 μl
Bufor do kompleksów 10 x stężony *	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
woda	1 μl	1 μl	1 μl	2.5 μl

(*) - patrz 3.13.3

Holoenzym polimerazy RNA, wykorzystywany do reakcji tworzenia kompleksów, przygotowano łącząc rdzeń polimerazy z podjednostką sigma w stosunku molowym 1:3

(optymalne wysycenie rdzenia podjednostką sigma uzyskiwano we wcześniejszych eksperymentach optymalizacyjnych).

Przygotowane mieszaniny reakcyjne inkubowano 20 min w temperaturze 37°C i dializowano wobec buforu TE (patrz 3.13.5) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (stosowano błony dializacyjne Millipore VS o średnicy porów 0.025 µm). Po dializie do próbek dodawano 1 µl heparyny o stężeniu 20 mg/ml (stężenie końcowe wynosiło około 1 mg/ml), 1 µl stężonego roztworu barwników do elektroforezy (patrz 3.14.2), całość nanoszono na 3.5 % natywny żel poliakryloamidowy i przeprowadzano elektroforezę w buforze TBE (patrz 3.14.3), pod napięciem 70 V, przez około 2.5-3 godzin.

4.18 Transkrypcja *in vitro*

Do kompleksów binarnych (patrz 4.17) dodawano 5 µl mieszaniny MIX (ApUpC, ATP, GTP, MgCl₂) (patrz 3.13.4) i inkubowano 20 minut w 37°C. Po inkubacji dodawano 1 µl heparyny o stężeniu wyjściowym 20 mg/ml, 2 µl stężonego roztworu barwników do elektroforezy (patrz 3.14.2) i nakładano na żel. Elektroforezę prowadzono jak w punkcie 4.17. W przypadku reakcji transkrypcji, w której używano znakowanego ApUpC, (patrz 4.16), wykorzystywano nieznakowany DNA.

4.19 Cięcie kompleksów binarnych enzymami restrykcyjnymi

Do 10 µl próbek zawierających kompleksy binarne (patrz 4.17) dodawano 1 µl heparyny o stężeniu 10 mg/ml, a następnie trawiono odpowiednim enzymem restrykcyjnym: kompleksy fragmentów O₋₁₀ i O_{1/2-10} z holoenzymem polimerazy RNA trawiono enzymem *Bgl*II, kompleks fragmentu O₋₃₅ z holoenzymem polimerazy RNA trawiono enzymem *Eco*RI, natomiast kompleksy fragmentów O_{-35/-10} i O_{-35/1/2-10} enzymami *Eco*RI i *Bgl*II, przez 3 godziny w temperaturze 37°C. Następnie poddane trawieniu kompleksy nanoszono na wcześniej przemyte 2 ml buforu TE (patrz 3.13.5) nitrocelulozowe filtry membranowe o średnicy porów 0.45 µm, filtrowano i ponownie przemywano 2 ml tego samego buforu. Filtry z immobilizowanymi na nich kompleksami umieszczano w 200 µl buforu zawierającego 1% SDS i 0.3 M octan sodu. DNA eluowano z filtrów przez 3 godziny (lub całą noc) w temperaturze 37°C. Kolejnym etapem było wytrącanie wyeluowanego DNA przy pomocy 96% alkoholu etylowego (patrz 4.3) i

zawieszenie w 10 μl dejonizowanej, jałowej wody. Tak przygotowane DNA analizowano na 6 % żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących (patrz 4.11).

4.20 Footprint z wykorzystaniem nadmanganianu potasu (KMnO_4)

10 μl roztworu zawierającego kompleksy binarne (patrz 4.17) dializowano wobec buforu TE (patrz 3.13.5) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po dializie do próbek (ok. 20 μl) dodawano 1 μl heparyny o stężeniu wyjściowym 20 mg/ml i po około 20 sekundach dodawano 1.5 μl 15 mM roztworu nadmanganianu potasu. Reakcję przeprowadzano w 37°C przez 1 min, a następnie, w celu zakończenia reakcji, dodawano 1.5 μl β -merkaptotetanolu. Próbkę uzupełniano wodą do objętości 100 μl i dodawano po 200 μl fenolu i chloroformu. Dokładnie mieszano i wirowano przez 5 min przy 15000 obr./min (15850 x g). Zbierano górną warstwę (około 100 μl) i dodawano 20 μl 13 M octanu amonu, dokładnie mieszano, a następnie dodawano 400 μl zimnego (0°C) 96% alkoholu etylowego. Inkubowano 30 min w -20°C, wirowano 10 min przy 15000 obr./min (15850 x g), a następnie dwukrotnie przemywano 70% alkoholem etylowym. Otrzymany osad suszono pod próżnią przez 10 min, rozpuszczano w 63 μl jałowej, dejonizowanej wody. Po dodaniu 7 μl piperydyny próbki inkubowano w 90°C przez 30 min. Po schłodzeniu dodawano 20 μl 13 M octanu amonu, dokładnie mieszano, a następnie dodawano 300 μl zimnego (0°C) 96% alkoholu etylowego, inkubowano 30 min w -20°C i wirowano przez 10 min, przy 15000 obr./min (15850 x g). Osad dwukrotnie przemywano 70% alkoholem etylowym, suszono pod próżnią przez 10 min, a następnie rozpuszczano w 4 μl buforu obciążającego do żeli sekwencyjnych (patrz 3.16.1). Próbkę umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 3 min, następnie schładzano do 0°C (umieszczając w lodzie) i nakładano na 8% żel sekwencyjny (patrz 3.17.4). Elektroforezę przeprowadzano w buforze TBE (patrz 3.14.3) przy 2000V, 95W i temperaturze 55-60°C przez 1.5 do 2 godzin.

4.21 Sekwencjonowanie

Do reakcji sekwencjonowania metodą enzymatyczną Sangera /112/ fragmentów O₃₅ i A1 wykorzystano zestaw *SequiTherm EXEL™* II DNA Sequencing Kit firmy Epicentre Technologies. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną według poniższego

wzoru:

starter PPA1(znakowany na końcu 5') 10 μ M	1 μ l
bufor 3.5 x stęż. (<i>SequiTherm EXEL II Sequencing Buffer</i>)	3.5 μ l
matryca A1 (O ₋₃₅) 0.2 pM	2.5 μ l
<i>SequiTherm EXEL II DNA Polymerase</i> (5 u/ μ l)	1 μ l
woda dejonizowana	4.3 μ l

Równolegle przeprowadzano 4 niezależne reakcje, w których do 2 μ l przygotowanej mieszaniny reakcyjnej dodawano odpowiednio po 2 μ l G, T, C, A *SequiTherm EXEL II Termination Mix*, dokładnie mieszając. Reakcję przygotowywano w 4°C. Do reakcji sekwencjonowania stosowano następujący profil temperaturowy (tab. 4.5):

Tab. 4.5 Warunki reakcji sekwencjonowania

Dla fragmentów A1, O ₋₃₅ :	
5.	95°C, 120s
4.	30 cykli: 95°C, 60s
	55°C, 30s
	72°C, 60s
3.	72°C, 200s
6.	4°C

Po reakcji do próbek dodawano po 3 μ l buforu obciążającego do żeli sekwencyjnych (patrz 3.16.1) i наносzono na 8 % żel sekwencyjny (patrz 3.17.4). Elektroforezę przeprowadzano w buforze TBE (patrz 3.14.3) przy 2000V, 95W i temperaturze 55-60°C przez 1.5 do 2 godzin.

4.22 Autoradiografia

Po zakończeniu elektroforezy, na żelu zawierającym radioaktywnie znakowany DNA układano kliszę rentgenowską oraz ekran wzmacniający, umieszczano w kasecie do autoradiografii i eksponowano w temperaturze -70°C przez 1 do 2 godzin w przypadku żeli natywnych zawierających kompleksy lub dwie doby w przypadku żeli sekwencyjnych. Następnie kliszę wywoływano przez 1-2 minut (patrz 3.13.7.1), utrwalano przez 2 minuty (patrz 3.13.7.2) i suszono. Wszystkie czynności wykonywano bez dostępu światła.

5. WYNIKI

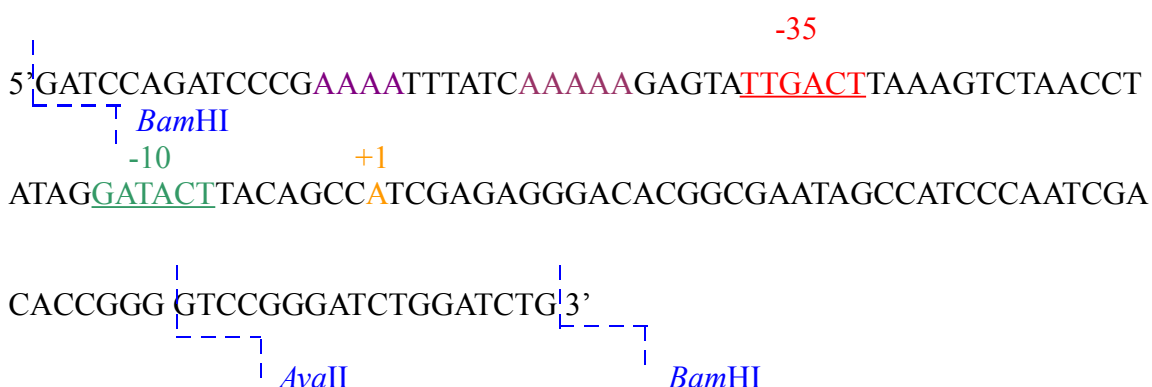
5.1 Konstrukcja zmienionych w obrębie regionów -35 i -10 sekwencji promotora A1 bakteriofaga T7

5.1.1 Promotor A1 bakteriofaga T7

Do badań oddziaływania polimerazy RNA z promotorowym DNA oraz do określania rangi i wkładu regionów -35 i -10 w wiązanie polimerazy RNA wybrano promotor A1 bakteriofaga T7. Promotor ten, wraz z promotorami A2 i A3, należy do grupy trzech wczesnych, silnych promotorów, znajdujących się w niekodującym regionie blisko lewego końca DNA bakteriofaga T7 (transkrypcja z tego promotora zachodzi od strony lewej do prawej) i rozpoznawanych przez polimerazę RNA *Escherichia coli* /39/. Pomimo pewnych odchyień od najsilniej konserwowanych sekwencji promotorowych w obrębie regionów -35 i -10, promotor ten jest jednym z najsilniejszych promotorów. Sekwencja nukleotydowa regionu -35 (5'-TTGACT-3') w tym promotorze różni się od sekwencji konsensusowej (5'-TTGACA-3') tylko ostatnią zasadą, podczas gdy różnica w regionie -10 dotyczy dwóch zasad (w promotorze A1: 5'-GATACT-3', sekwencja konsensusowa to: 5'-TATAAT-3') (ryc. 2; ryc. 6). Regiony -35 i -10 znajdują się w odległości odpowiednio 30 i 7 par zasad powyżej (ang. *upstream*) miejsca startu inskrypcji (+1), przy czym region -10 w promotorze A1 obejmuje pozycje od -13 do -8, a nie od -12 do -7, jak w przypadku promotora konsensusowego. Długość sekwencji oddzielającej heksamery -35 i -10 w promotorze A1 faga T7, podobnie jak w promotorze konsensusowym, wynosi 17 pz. Charakterystyczna jest również dla tego promotora obecność w pozycji od -42 do -46 kolejno pięciu zasad adeninowych (A), a także czterech reszt adeninowych w pozycji -53 do -56, co może mieć wpływ na wiązanie polimerazy RNA i siłę promotora (ryc. 6).

We fragmencie DNA zawierającym sekwencję promotora A1 faga T7 znajduje się szereg sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne, jednakże występują one poniżej miejsca startu transkrypcji. Przedmiotem naszych zainteresowań jest natomiast sekwencja zlokalizowana powyżej miejsca startu transkrypcji, przede wszystkim zasady zlokalizowane w obrębie i w pobliżu regionów -35 i -10. Dlatego też do promotora A1 faga T7 należało wprowadzić dodatkowe miejsca restrykcyjne umożliwiające modyfikacje w podanych sekwencjach, a także analizę kompleksów polimerazy RNA ze

zmodyfikowanymi promotorami.



Ryc. 6. 130 nukleotydowa sekwencja nici niematrixowej promotora A1 faga T7. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencję regionu -35, zielonym sekwencję regionu -10, jasnopomarańczowym miejsce startu transkrypcji, a niebieskim miejsca cięcia enzymami restrykcyjnymi *Bam*HI i *Ava*II (enzymów istotnych w dalszych etapach pracy).

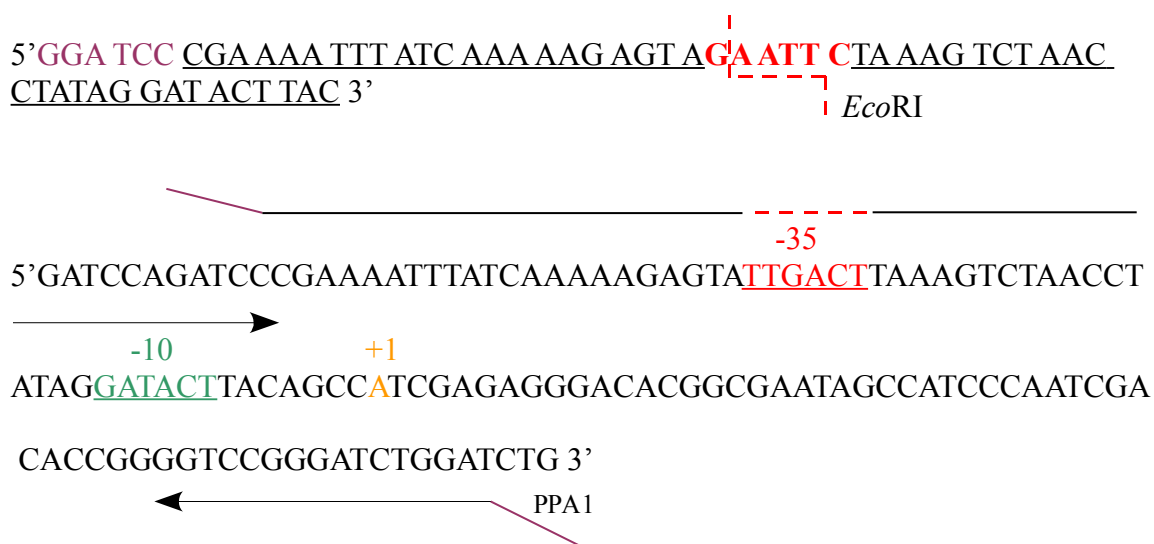
5.1.2 Otrzymywanie fragmentu DNA zawierającego promotor A1 ze zmienionym regionem -35 – fragment O₋₃₅

Wyniki uzyskane w pracy, w której wykorzystano technikę interferencji rodników hydroksylowych (ang. *radical interference*) /156/ mogą sugerować, iż region -35 odgrywa ważniejszą rolę we wczesnej fazie rozpoznawania i wiązania polimerazy, niż region -10. Z drugiej strony jednak manipulacje w heksamerze -10 (doświadczenia z wykorzystaniem matryc widełkowych (ang. *fork junction*) czy substytucje w dwuniciowych i jednoniciowych fragmentach DNA /43, 54, 86, 118, 160, 113/ wskazywały na zasady regionu -10, jako krytyczne dla tworzenia zarówno kompleksu zamkniętego, jak i otwartego. Każda z tych prac dotyczyła jednak zmian pojedynczych zasad w regionach -35 i -10 (delecje czy substytucje), a więc badała rolę i wkład poszczególnych zasad w funkcjonowanie promotora. Nie zbadano natomiast, jaki wpływ na oddziaływanie z polimerazą RNA, na etapie rozpoznawania promotora, tworzenia kompleksu zamkniętego i następnie izomeryzacji do aktywnego transkrypcyjnie kompleksu otwartego, miałyby zmiany całych konsensusowych sekwencji w regionach -35 i -10.

W celu analizy wpływu sekwencji regionu -35 na wiązanie polimerazy RNA, wprowadzono w tym rejonie promotora A1 bakteriofaga T7 całkowicie zmienioną sekwencję DNA. Sekwencję TTGACT zastąpiono sekwencją GAATTC (nić niematrixowa). Zmianie uległa kolejność zasad w heksamerze, natomiast rodzaj zasad (sumaryczna ilość puryn i pirymidyn), a tym samym ilość wiązań wodorowych,

decydujących o stabilności tego segmentu DNA, pozostała niezmienną. Wprowadzenie tych zmian było możliwe dzięki zastosowaniu odpowiedniego startera (oligoLA1), obejmującego heksamer -35 i zawierającego w tym regionie odpowiednio zmienioną sekwencję. Ze względu na sekwencję promotora A1, zawierającego dużą ilość par AT powyżej (ang. *upstream*) miejsca startu transkrypcji, jak i konieczność zastosowania sekwencji niekomplementarnej do nici matrycowej w regionie -35, a także niekomplementarność na końcu 5' (sekwencja *Bam*HI) zdecydowano się na zaprojektowanie odpowiednio długiego startera. Długość ta wynosiła 60 pz i obejmowała pozycje w matrycy A1 od -58 do -5 (ryc. 7).

STARTER oligoLA1



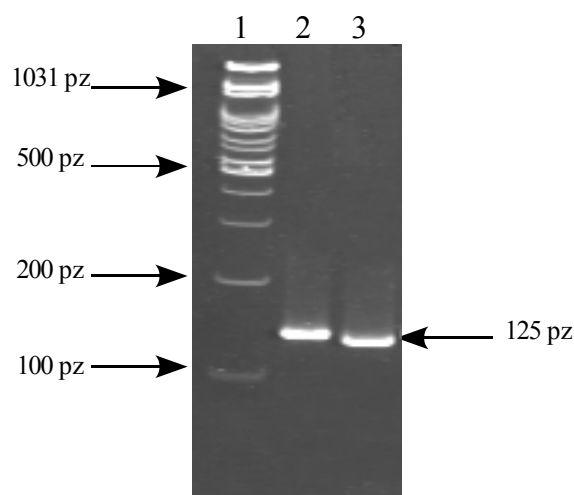
Ryc. 7. Sposób otrzymywania fragmentu DNA promotora A1 faga T7 zawierającego zmienioną sekwencję regionu -35. Powyżej sekwencja startera oligoLA1 zastosowanego do amplifikacji fragmentu O_{35} , zawierającego zmieniony region -35. Kolorem fioletowym zaznaczono sekwencję rozpoznawaną przez enzym *Bam*HI, kolorem czerwonym zmienioną sekwencję regionu -35, podkreślona została sekwencja komplementarna do matrycy promotora A1 faga T7. Linia przerywana określa miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego *Eco*RI. Poniżej sekwencja promotora A1 faga T7 (nić niemmatrycowa), strzałką zaznaczono zasięg startera oligoLA1, kolorem fioletowym sekwencję niekomplementarną zawierającą sekwencję *Bam*HI, czerwoną przerywaną linią zmienioną sekwencję regionu -35. PPA1 oznacza starter stosowany do amplifikacji fragmentu promotorowego DNA.

Długość startera, a także jego sekwencja, wpływają na temperaturę topnienia (T_M), a więc i na temperaturę przyłączania starterów. Zaprojektowany starter posiadał temperaturę topnienia $70,4^{\circ}\text{C}$, przy długości 60 pz. Taka temperatura wynika z oddziaływania obu części startera komplementarnych do matrycy z matrycą DNA. Promotor A1 faga T7, w całym regionie powyżej miejsca startu transkrypcji, zawiera

bardzo dużo par AT, dlatego też temperatura topnienia jest relatywnie niska w porównaniu do długości startera.

Temperatura topnienia części komplementarnej drugiego startera (PPA1) zastosowanego do reakcji tworzenia fragmentu O_{-35} była znacznie niższa i wynosiła 48°C . Najkorzystniej jest, gdy temperatury dwóch starterów zastosowanych do reakcji PCR są zbliżone. Biorąc pod uwagę fakt, że starter oligoLA1 składa się z dwóch części komplementarnych do matrycy DNA, oddzielonych sekwencją niekomplementarną o długości 6 nukleotydów, kluczowe znaczenie w tej reakcji amplifikacji ma sekwencja zlokalizowana poniżej regionu -35 , której temperatura topnienia wynosi 52°C . W takim wypadku temperatury topnienia obu starterów są zbliżone.

W reakcji zastosowano temperaturę przyłączania starterów 50°C , taką samą jak w reakcji amplifikacji wyjściowego promotora A1 faga T7 (patrz 4.1) przy 35 cyklach amplifikacji. Zastosowane warunki reakcji pozwoliły wydajnie uzyskać właściwy produkt, bez produktów ubocznych. Powstały fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7 ze zmienionym regionem -35 , w wyniku zastosowania starterów oligoLA1 i PPA1 miał długość 125 pz, czyli był krótszy od wyjściowego promotora A1 faga T7 o pięć nukleotydów. Matrycą zastosowaną w reakcji amplifikacji był promotor A1 wklonowany w plazmid pDS1. Otrzymany produkt PCR przedstawiono na rycinie 8.



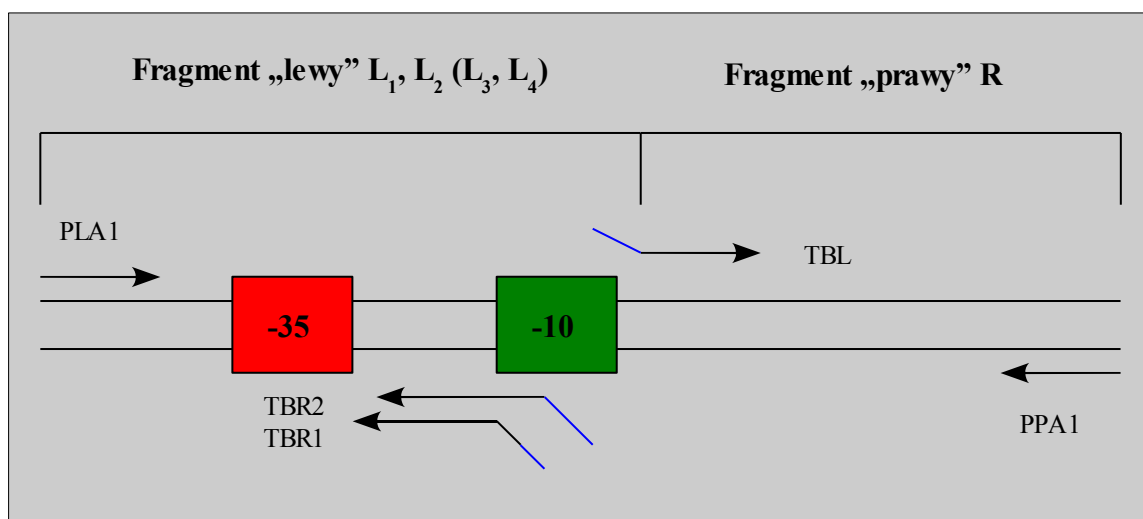
Ryc. 8. Produkty PCR uzyskane na matrycy pDS1+A1. Rozdział fragmentów DNA prowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiony bromkiem etydyny.
 ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100bp Plus
 ścieżka 2 – fragment DNA zawierający promotor A1 bakteriofaga T7
 ścieżka 3– fragment DNA zawierający promotor A1 bakteriofaga T7 ze zmienionym regionem -35 (fragment O_{-35})

5.1.3 Otrzymywanie fragmentów DNA zawierających zmieniony region -10 – fragmenty O₋₁₀, O_{1/2-10}, a także fragmentów DNA zawierających zmienione zarówno region -35 i jak i -10 – fragmenty O_{-35/-10}, O_{-35/1/2-10}

W celu analizy wpływu regionu -10 promotora na wiązanie polimerazy RNA i tworzenie aktywnego kompleksu inicjacyjnego, wiedząc iż szczególne znaczenie mają zasady w pozycji -12, -11 i -10 w promotorze konsensusowym, zdecydowano się na skonstruowanie dwóch fragmentów DNA mających całkowicie i częściowo zmienioną sekwencję w obrębie heksameru -10. W pierwszym fragmencie sekwencja **GATACT** promotora A1 została zastąpiona sekwencją **ACAGAG** (fragment O₋₁₀), natomiast w drugim sekwencja **GATACT** została zastąpiona sekwencją **GATGAG** (fragment O_{1/2-10}) (ryc. 11). Zatem w pierwszym przypadku całkowicie zmieniono heksamer -10, w drugim natomiast zostały zachowane zasady odpowiadające pozycjom -13, -12 i -11, natomiast zmieniono pozostałe trzy, tj. -10, -9, -8.

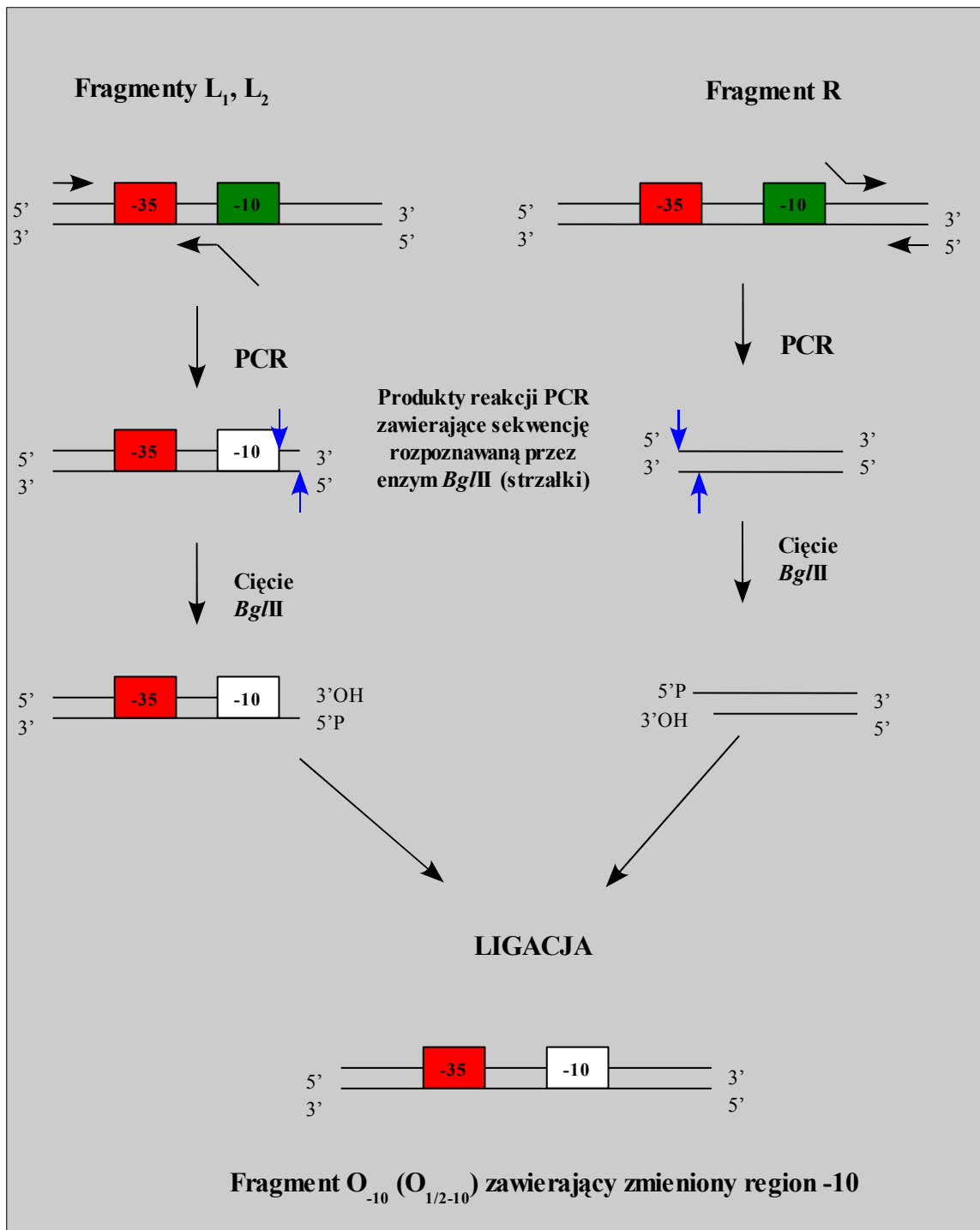
Zdecydowano się również na skonstruowanie fragmentów promotorowego DNA, z których jeden zawierał całkowicie zmienione regiony -35 i -10, podczas gdy drugi posiadał całkowicie zmieniony region -35 i częściowo zmieniony region -10 (odpowiednio fragmenty O_{-35/-10} i O_{-35/1/2-10}).

W przeciwieństwie do sposobu otrzymywania fragmentu, zawierającego zmieniony region -35 (patrz 5.1.2), który powstał w jednej reakcji amplifikacji, w przypadku konstrukcji zmodyfikowanych fragmentów promotorowych zawierających zmieniony region -10, zdecydowano się na utworzenie fragmentów promotorowych w dwóch etapach. W pierwszym etapie należało skonstruować dwa fragmenty DNA obejmujące zmieniony całkowicie i częściowo region -10 wraz z sekwencją zlokalizowaną powyżej tego regionu (fragmenty L₁, L₂ w przypadku zmodyfikowanych fragmentów promotorowych O₋₁₀ i O_{1/2-10}), a także fragment obejmujący sekwencję zlokalizowaną poniżej regionu -10 (fragment R) i w dalszej kolejności połączyć je ze sobą (L₁ z R oraz L₂ z R), co dałoby w rezultacie odpowiednie fragmenty promotorowe O₋₁₀ i O_{1/2-10} (ryc. 9 i 10). Przedstawiony sposób otrzymywania fragmentów promotora A1 faga T7 zawierających zmieniony region -10 pozwolił na wprowadzenie dodatkowego miejsca restrykcyjnego (*Bgl*III) do promotorowego DNA, umożliwiające dalsze modyfikacje w pobliżu sekwencji regionu -10.



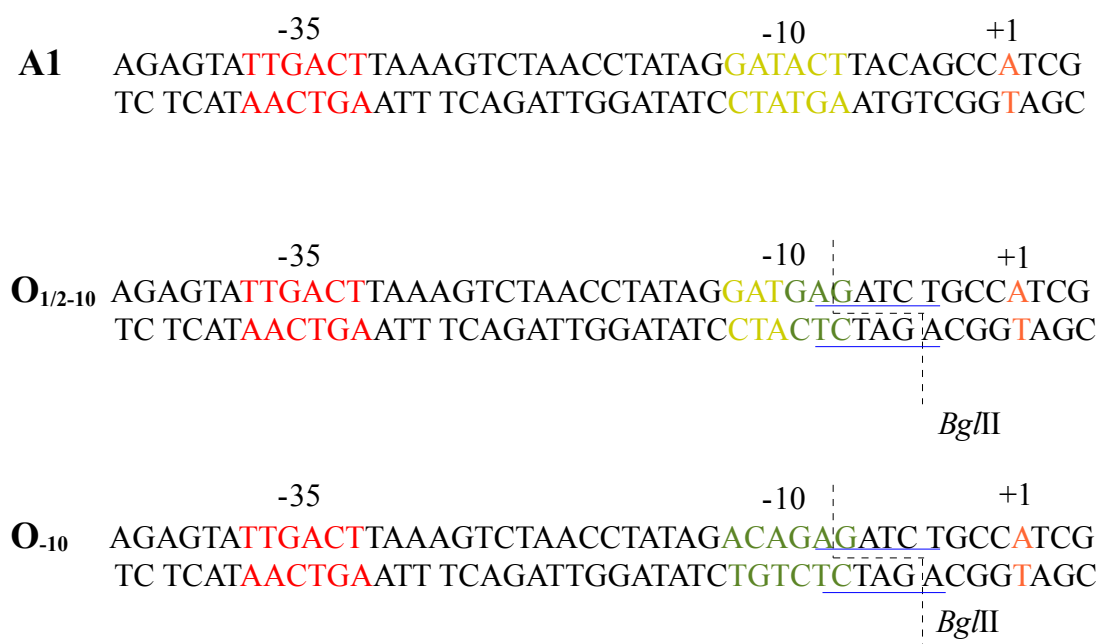
Ryc. 9. Schemat postępowania przy otrzymywaniu promotora A1 bakteriofaga T7 zawierającego częściowo i całkowicie zmieniony region -10, także promotora zawierającego zmienione oba regiony -35 i -10. Strzałkami zaznaczono startery zastosowane do konstrukcji fragmentów (O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/1/2-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$). Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencje niekomplementarne rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *Bgl*III. Startery TBR1 i TBL (TBR2 i TBL) służą do modyfikacji heksameru -10 i wprowadzenia miejsca restrykcyjnego *Bgl*III. Para starterów PPA1 i PLA1 służy do amplifikacji zarówno niezmienionego promotora A1 faga T7, jak i wszystkich zmodyfikowanych fragmentów promotorowych.

Planując konstrukcje fragmentów DNA zawierających zmieniony region -10, brano pod uwagę różne możliwości pozwalające otrzymać zmodyfikowane promotory A1 faga T7. Rozważano wariant syntezy całych dwuniciowych fragmentów DNA czy też wykorzystania odpowiednich długich starterów (obejmujących sekwencję heksameru -10). Jednakże po szczegółowej analizie wszystkich kroków postępowania w planowanych doświadczeniach, a także biorąc pod uwagę dalsze wykorzystanie fragmentów promotorowych i ich kolejne modyfikacje, zdecydowano się na sposób konstrukcji przedstawiony powyżej. Sposób ten daje większą elastyczność w prowadzeniu eksperymentów i pozwala na dalsze modyfikacje fragmentów promotorowych przy niższym nakładzie kosztów. Jest więc bardziej ekonomiczny, zważywszy na to, iż dysponowano już licznymi starterami komplementarnymi do promotora A1 faga T7.



Ryc. 10. Schemat konstrukcji fragmentów O_{-10} i $O_{1/2-10}$ promotora A1 faga T7 zawierających zmieniony całkowicie i częściowo region -10. Zmianę wprowadzono dzięki zastosowaniu starterów posiadających na końcu 5' sekwencję niekomplementarną do matrycy, zawierającą sekwencję rozpoznawaną przez enzym *Bgl*III (miejsce cięcia enzymu zaznaczono niebieskimi strzałkami), co umożliwiło cięcie otrzymanych produktów L_1, L_2 i R , a następnie ich ligację. W podobny sposób otrzymano fragmenty zawierające zmieniony zarówno region -10 jak i -35 (fragmenty $O_{-35/-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$).

Uzyskanie opisanych konstrukcji było możliwe, dzięki odpowiednim starterom, do których na końcach 5' wprowadzono niekomplementarne sekwencje zmienionego regionu -10 oraz dodatkowo miejsce restrykcyjne dla enzymu *Bgl*III (**AGATCT**). Cięcie produktów amplifikacji za pomocą enzymu *Bgl*III umożliwia połączenie dwóch fragmentów (ryc. 10). Sekwencje te wprowadzono na końcu 5' starterów w taki sposób, aby po połączeniu produktów PCR zachować niezmienioną odległość między regionem -10, a miejscem startu transkrypcji (+1). Zachowano również niezmienioną odległość między heksamerami -35 i -10 (ryc. 11).

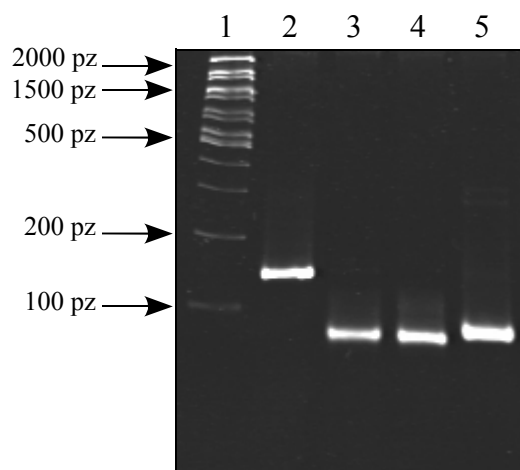


Ryc. 11. Sekwencje fragmentów promotorowych A1 faga T7 typu dzikiego i zmodyfikowanych w regionie -10. Kolorem czerwonym przedstawiono sekwencję heksameru -35, kolorem żółtym - niezmodyfikowaną sekwencję regionu -10, kolorem zielonym - nową sekwencję heksameru -10, pomarańczowym - miejsce startu transkrypcji. Niebieską linią podkreślono sekwencję rozpoznawaną przez enzym *Bgl*III, czarną przerywaną linią dokładne miejsca cięcia.

Temperatury topnienia starterów TBL i PPA1 (patrz 3.6), stosowanych do produkcji fragmentu R (ryc. 10) były zbliżone, i wynosiły odpowiednio dla TBL (część komplementarna do matrycy) - 45°C i dla PPA1 - 48°C. Jednakże wydajność reakcji amplifikacji nie była zadowalająca. W celu zoptymalizowania warunków reakcji PCR zdecydowano się na wprowadzenie na początku reakcji kilku dodatkowych cykli o temperaturze przyłączania starterów 40°C (patrz 4.1). Wprowadzenie tej zmiany

spowodowało powstanie znacznie większej ilości produktu o odpowiedniej długości (ryc. 12).

Żadne z powyższych warunków amplifikacji nie były wystarczające, aby uzyskać fragmenty L_1 , L_2 (ryc. 9). Sytuacja ta była spowodowana znaczną różnicą między temperaturami topnienia starterów TBR1 (34°C) i TBR2 (38°C), a temperaturą topnienia zewnętrznego startera PLA1 (drugi starter obok PPA1 stosowany do amplifikacji fragmentu A1 faga T7) (patrz 3.6) wynoszącą 53°C . Trudności amplifikacji w tym przypadku wynikały w szczególności z tego, że startery TBR1 i TBR2 miały zbyt niskie temperatury przyłączania. Temperatury te zostały narzucone przez sekwencję tej części promotora (ryc. 6). We wstępnych doświadczeniach testowano przebieg reakcji w zakresie temperatur przyłączania starterów 50°C - 30°C , a także wydłużano czas hybrydyzacji w 35°C z 30 s do 60 s. Zgodnie z przewidywaniami w warunkach tych nie udało się uzyskać produktu reakcji PCR. Na etapie planowania reakcji i projektowania starterów wiadomo już było, że reakcja amplifikacji standardową metodą PCR nie da pożądaných rezultatów. Wynika to z faktu, że temperatury topnienia zastosowanych w reakcji starterów, wynoszą 34°C i 38°C , a więc są znacznie niższe od temperatury optymalnej dla przeprowadzanego przez Taq polimerazę DNA procesu elongacji, wynoszącej 72°C . Dlatego należało zastosować niestandardowy proces postępowania, w którym reakcję przeprowadzano w dwóch etapach. W pierwszym etapie należało zastosować enzym, dla którego optymalna temperatura elongacji byłaby na tyle niska, aby stabilność powstających w czasie reakcji hybrydów starter-matryca była wystarczająca. Kryteria takie spełnia polimeraza DNA I, dla której optymalna temperatura wydłużania starterów wynosi 37°C . Dlatego też do tej reakcji użyto fragmentu Klenowa polimerazy DNA I i uzyskano produkt w postaci nici matrycowej, która powstała w wyniku wydłużania starterów TBR1(TBR2). Wykorzystując otrzymaną w pierwszym etapie reakcji nić jako matrycę oraz pozostałe startery, przeprowadzono standardową reakcję PCR z użyciem Taq polimerazy DNA. Zastosowanie takiego zabiegu umożliwiło powstanie fragmentów L_1 i L_2 z odpowiednią wydajnością (patrz punkt 4.1) (ryc. 12).



Ryc. 12. Produkty reakcji PCR uzyskane na matrycy promotora A1 bakteriofaga T7, zgodnie ze schematem na ryc. 9. Elektroforezę fragmentów DNA prowadzono w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiony bromkiem etydyny.

ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100 bp Plus

ścieżka 2 – fragment DNA zawierający promotor A1 bakteriofaga T7

ścieżka 3 – fragment L_1

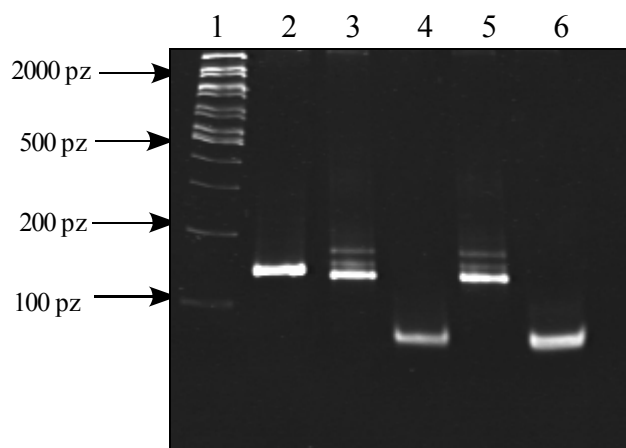
ścieżka 4 – fragment L_2

ścieżka 5 – fragment R

Podobny obraz uzyskano w przypadku produktów reakcji PCR L_3 i L_4 oraz R otrzymanych na matrycy promotora A1 faga T7 zawierającego zmieniony region -35 (O_{-35}).

Uzyskane w wyniku reakcji PCR fragmenty L_1 , L_2 oraz R oczyszczano przy pomocy mieszaniny fenol-chloroform i wytrącano 96% etanolem (patrz 4.3). Kolejnym krokiem było połączenie fragmentów L_1 z R i L_2 z R, w celu otrzymania odpowiednio fragmentów O_{-10} i $O_{1/2-10}$. W związku z tym fragmenty DNA trawiono enzymem *Bgl*III (patrz 4.4), aby uzyskać produkty z tzw. „lepkiemi końcami” niezbędnymi do ligacji fragmentów L i R i ponownie oczyszczono tą samą metodą (fenol-chloroform, 96% etanol). Następnie przeprowadzono reakcję ligacji (patrz 4.6), w wyniku której uzyskano właściwe produkty L_1R i L_2R (ryc. 13).

W analogiczny sposób otrzymano fragmenty DNA ($O_{-35/-10}$, $O_{-35/1/2-10}$) zawierające zmienione oba heksamery – zmieniony heksamer -35 i całkowicie lub częściowo zmieniony heksamer -10. W tym przypadku jednak do otrzymania fragmentów obejmujących zmieniony heksamer -10 i sekwencję zlokalizowaną powyżej tego regionu (fragmenty L_3 i L_4) (ryc. 9 i 10) jako matrycę do reakcji PCR zastosowano nie promotor A1 faga T7 typu dzikiego, lecz promotor zawierający zmodyfikowaną sekwencję heksameru -35 (O_{-35}).



Ryc. 13. Rozdział elektroforetyczny produktów ligacji fragmentów L_1 z R oraz L_2 z R. Elektroforezę prowadzono w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiono bromkiem etydyny:

ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100bp Plus

ścieżka 2 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7

ścieżka 3 – fragment DNA po ligacji L_1 z R (oczekiwany produkt O_{-10})

ścieżka 4 – fragment DNA po ligacji L_1 z R trawiony enzymem *Bg*III

ścieżka 5 – fragment DNA po ligacji L_2 z R (oczekiwany produkt $O_{1/2-10}$)

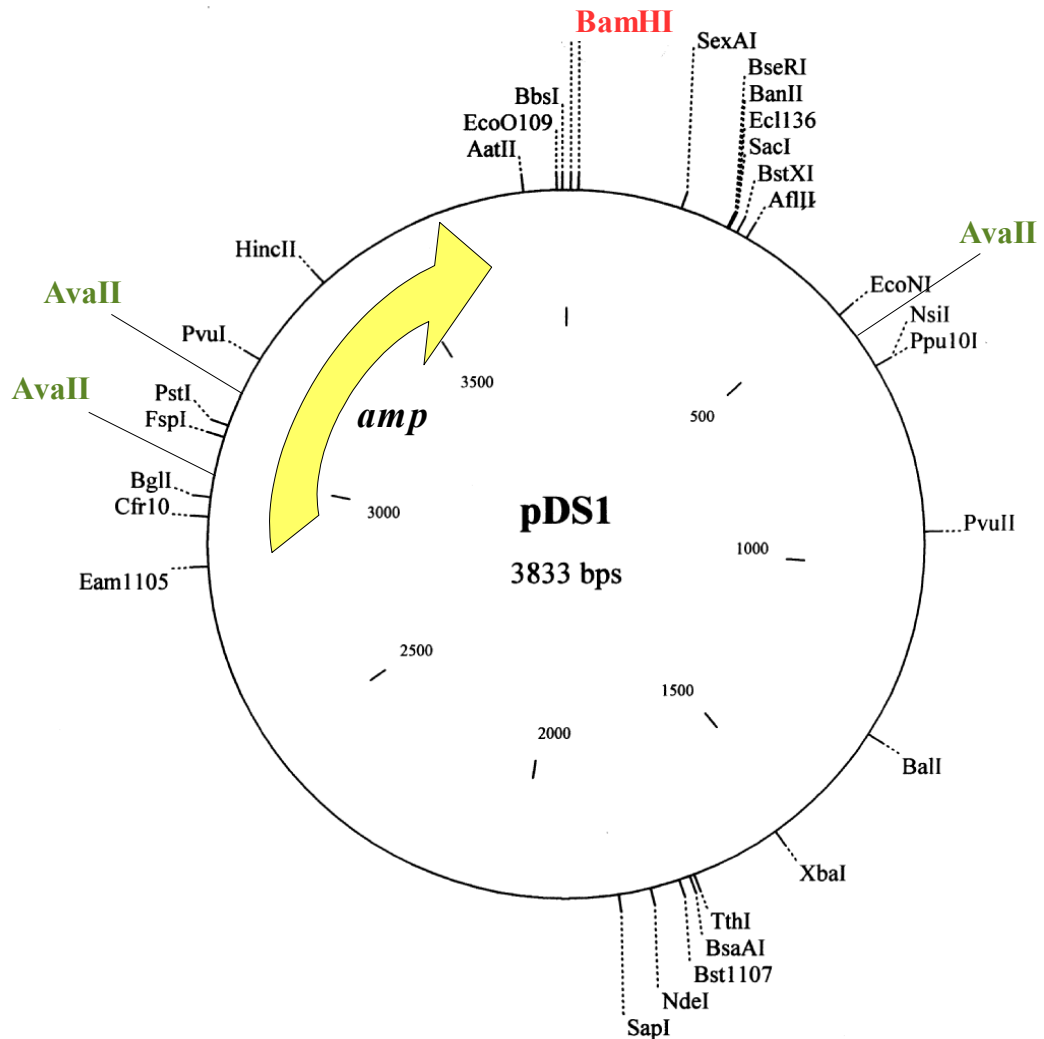
ścieżka 6 – fragment DNA po ligacji L_2 z R trawione enzymem *Bg*III

Podobny obraz otrzymano w przypadku ligacji fragmentów L_3 z R oraz L_4 z R dających produkty ligacji, odpowiednio $O_{-35/-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$.

5.1.4 Klonowanie i analiza otrzymanych klonów

Uzyskane w pierwszej fazie pracy fragmenty promotorowe wklonowano do wektora pDS1 (patrz 3.2), zawierającego w MCS (ang. *multiple cloning site*) unikalne miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *Bam*HI. Plazmid ten (3833 pz) zawiera również gen oporności na ampicylinę (gen kodujący enzym β -laktamazę), co pozwala na wyselekcjonowanie odpowiednich klonów (ryc. 14). Zastosowanie do klonowania plazmidu pDS1 wynikało z planowanych doświadczeń, w których zamierzano wykorzystać sekwencje flankujące wbudowane fragmenty promotorowego DNA. Dysponowano już właściwymi dla tych eksperymentów starterami, które zawierały sekwencje komplementarne do odpowiednich regionów plazmidu pDS1. W związku z tym celowe było, aby uniknąć subklonowania, zastosowanie plazmidu pDS1 a nie innych wektorów. Ponadto plazmid pDS1 charakteryzuje wysoka wydajność klonowania, co pozwala na uzyskanie dużej ilości właściwych zrekombinowanych plazmidów. Znana jest też

orientacja w jakiej wbudowują się do wektora fragmenty promotorowe A1.



Ryc. 14. Schemat plazmidu pDS1. Na rysunku zaznaczono położenie sekwencji rozpoznawanych przez poszczególne enzymy restrykcyjne. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsce cięcia enzymu *Bam*HI, kolorem zielonym miejsce cięcia enzymu *Ava*II. Żółtą strzałką oznaczono gen oporności na ampicylinę.

Otrzymane zmodyfikowane fragmenty promotorowego DNA (O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$) posiadały na obu końcach sekwencję rozpoznawaną przez enzym *Bam*HI. Umożliwiło to po cięciu tym enzymem restrykcyjnym (patrz 4.4) wprowadzenie fragmentów promotorowych do wektora pDS1 (ryc. 15). Aby zapobiec autoligacji

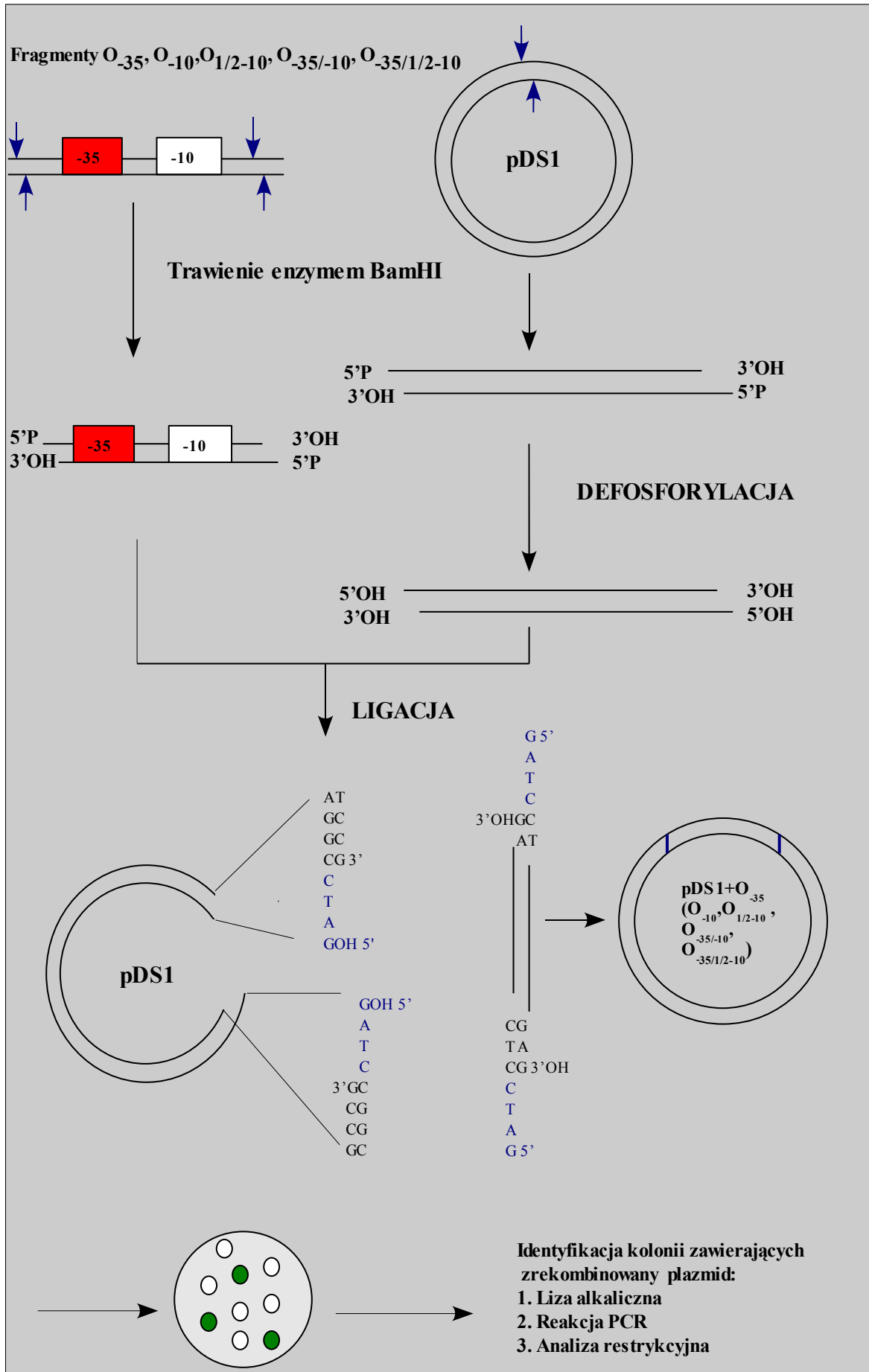
plazmidu i zwiększyć prawdopodobieństwo wytworzenia właściwych rekombinantów plazmid zdefosforylowano (patrz 4.5), usuwając grupę fosforanową z końca 5' przy pomocy alkalicznej fosfatazy. W celu zoptymalizowania warunków ligacji, aby otrzymać jak największą liczbę właściwych rekombinantów, dobierano także odpowiednio stężenia wektora i fragmentów promotorowych /123/. W związku z tym, w reakcji ligacji plazmidu pDS1 z fragmentem O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/-10} i O_{-35/1/2-10} zastosowano w każdym przypadku trzykrotny nadmiar fragmentu w stosunku do plazmidu (patrz 4.6.2).

Po ligacji, mieszaninę ligacyjną, zawierającą zrekombinowane wektory, używano do transformacji komórek kompetentnych *Escherichia coli* szczepu DH5α (patrz 4.7 i 4.8), a następnie wysiewano na płytki ze stałym podłożem agarowym z ampicyliną (patrz 3.3). Aby zwiększyć wydajność transformacji, zastosowana objętość mieszaniny ligacyjnej, wykorzystanej do reakcji transformacji nie przekraczała 5% objętości roztworu komórek kompetentnych. Tak więc 200 μl roztworu komórek kompetentnych transformowano 10-cioma μl mieszaniny ligacyjnej zawierającej zrekombinowany plazmid.

Jednocześnie przeprowadzono kontrolę wydajności transformacji komórek kompetentnych, wprowadzając do nich plazmid wyjściowy (pDS1). Kontrola transformacji superzwiniełym plazmidem pDS1 wykazała wysoką wydajność, rzędu 10⁶ komórek na mikrogram plazmidu. Dodatkową kontrolę stanowiły komórki kompetentne wysiane na płytki z ampicyliną i bez ampicyliny.

Wszystkie transformaty zawierające gen oporności na ampicylinę, tj. właściwe konstrukty pDS1+O₋₃₅, pDS1+O₋₁₀, pDS1+O_{1/2-10}, pDS1+O_{-35/-10}, pDS1+O_{-35/1/2-10}, ale także te komórki, które mogą zawierać plazmid pDS1 pozbawiony insertu, a także plazmid pDS1 z wbudowanymi multimetrami wyrosną na podłożu zawierającym ampicylinę. W przypadku transformacji plazmidem zawierającym fragment O₋₃₅, na płytkach otrzymano w sumie 11 kolonii transformowanych bakterii *Escherichia coli*, w przypadku O₋₁₀ - 19 kolonii, w przypadku O_{1/2-10} - 20 kolonii, O_{-35/-10} - 53 kolonie, natomiast przypadku O_{-35/1/2-10} - 14 kolonii.

W celu sprawdzenia, która kolonia zawiera właściwe konstrukty wyizolowano z komórek bakteryjnych zrekombinowane plazmidy, przy pomocy lizy alkalicznej (patrz 4.2), a następnie sprawdzano poszczególne transformaty na obecność insertu, czyli poszukiwanych fragmentów O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/-10} oraz O_{-35/1/2-10}. Porównywanie w tym wypadku wielkości cząsteczek plazmidów wyjściowych i zrekombinowanych byłoby

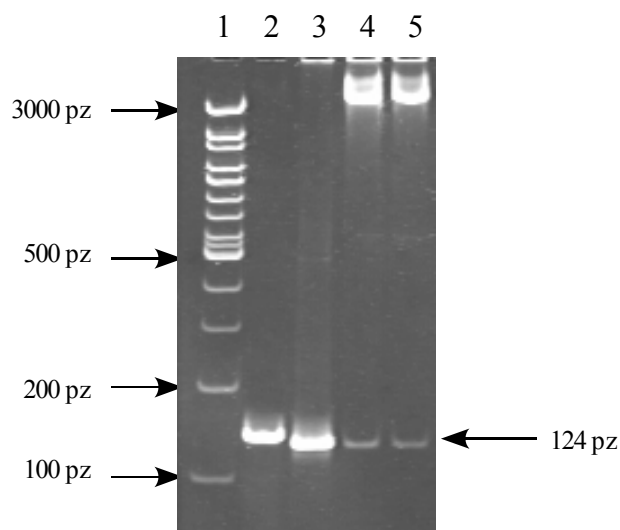


Ryc. 15. Schemat klonowania fragmentów O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$, $O_{-35/1/2-10}$ w wektorze pDS1 i analiza otrzymanych klonów. Niebieskie strzałki oznaczają miejsca cięcia enzymu *Bam*HI.

niecelowe, ze względu na minimalną różnicę długości między nimi (pDS1 3833pz, pDS1+O₋₃₅ - 3957pz, pDS1+O₋₁₀,O_{1/2-10}, pDS1+O_{-35/-10}, pDS1+O_{-35/1/2-10} - 3963pz), która najprawdopodobniej nie byłaby widoczna na żelu agarozowym.

W celu sprawdzenia obecności insertu w plazmidzie pDS1 ze wszystkich transformantów wyizolowano plazmidowe DNA i cięto enzymem restrykcyjnym *Bam*HI (patrz 4.4), a następnie wynik cięcia sprawdzano za pomocą elektroforezy w 6% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących (patrz 4.11). Właściwe konstrukty, w wyniku cięcia, powinny dać obraz liniowej formy plazmidu (enzym *Bam*HI otwiera plazmid, dając w rezultacie formę liniową) w położeniu odpowiadającym długości fragmentu DNA 3833 pz oraz fragment DNA o długości 125 pz (w przypadku fragmentu O₋₃₅) lub 130 pz (w przypadku pozostałych fragmentów). Kontrolne cięcie plazmidu pDS1+A1 dałoby produkt o długości 130 pz.

Przykładowy obraz uzyskany w wyniku cięcia zrekombinowanych plazmidów pDS1+O₋₃₅ enzymem *Bam*HI, przedstawiono na rycinie 16. Insert odpowiadający długości 125 pz zaobserwowano w przypadku dwóch transformantów.



Ryc. 16. Wynik cięcia plazmidowego DNA otrzymanego z transformantów 1 i 2 enzymem *Bam*HI. Elektroforezę prowadzono w 6% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiony bromkiem etydyny:

ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100 bp Plus

ścieżka 2 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7

ścieżka 3 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7 ze zmienionym regionem -35

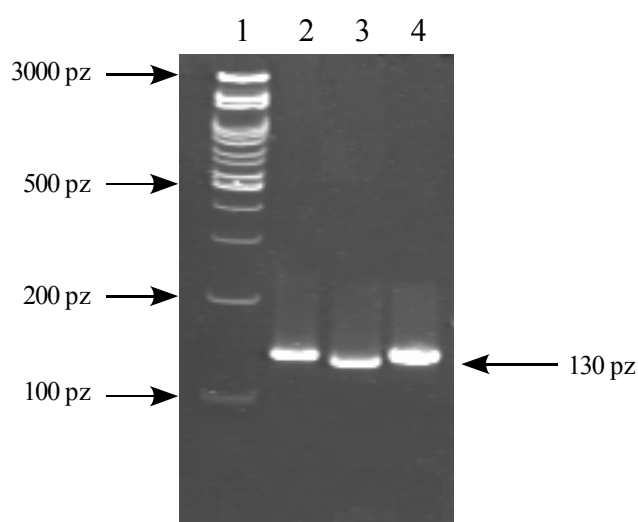
ścieżka 4 – wynik cięcia konstrukt pDS1+O₋₃₅ (transformat nr 1) enzymem *Bam*HI

ścieżka 5 – wynik cięcia konstrukt pDS1+O₋₃₅ (transformat nr 2) enzymem *Bam*HI.

Wycięty z plazmidu fragment o odpowiedniej długości (np. 125 pz) nie jest jednakże jeszcze dowodem na to, iż plazmid, z którego pochodzi ten insert, jest właściwym konstruktorem. Taki sam obraz mógłby dać transformat zawierający wbudowane do plazmidu multimetry odpowiednich fragmentów. W związku z tym należało przeprowadzić kolejne reakcje, które potwierdziłyby wybór właściwych transformantów. Na matrycach konstruktów, które dały reakcje pozytywne w wyniku cięcia enzymem *Bam*HI, przeprowadzono reakcje amplifikacji przy użyciu starterów PPA1 i PLA1, które były stosowane do produkcji promotora A1 faga T7 (patrz 4.1).

W przypadku właściwego konstruktora pDS1+O₃₅, powinno się uzyskać fragmenty o długości 130 pz. Natomiast w przypadku wbudowanych multimetrów mogłyby powstać produkty o różnych długościach, np. gdy fragment O₃₅ byłby klonowany jako dimer, uzyskano by produkty amplifikacji o długości 130 pz, a także około 260 pz i analogicznie, w przypadku klonowanych trimerów, uzyskano by trzy produkty o długości około 130 pz, 260 pz oraz 390 pz. Jednoznaczny dowód mogłoby stanowić zastosowanie starterów zewnętrznych, komplementarnych do sekwencji znajdujących się w plazmidzie.

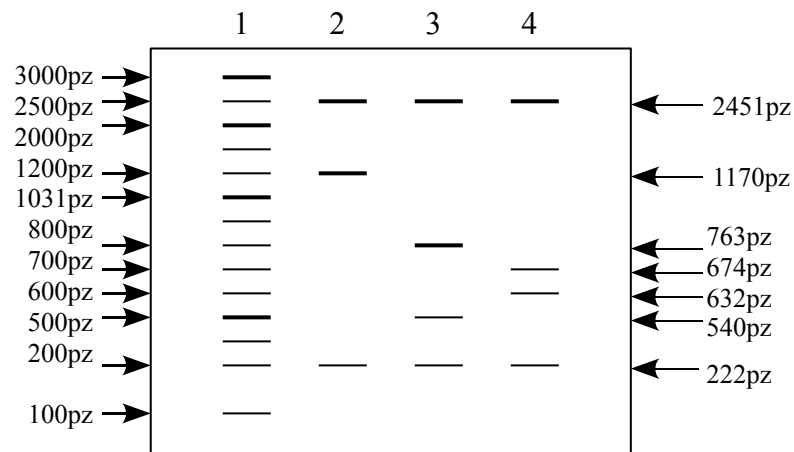
Selekcja transformantów na obecność insertu z wykorzystaniem reakcji PCR potwierdziła, że badane transformaty zawierały insert, który w reakcji amplifikacji dawał produkt o długości około 130 pz. Przykładowy obraz uzyskany w wyniku reakcji PCR przedstawiono na rycinie 17.



Ryc. 17. Wynik reakcji PCR na matrycy DNA otrzymanego z transformata 1. Elektroforezę prowadzono w 10% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiony bromkiem etydyny; ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100bp Plus
 ścieżka 2 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7
 ścieżka 3 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7 ze zmienionym regionem -35 – fragment O₃₅
 ścieżka 4 – fragment uzyskany na matrycy DNA otrzymanego z transformata 1.

W dalszym etapie, także za pomocą reakcji PCR, badano wybrane rekombinanty, stosując następujące zestawy starterów: TBR1(TBR2) z PLA1 oraz TBL z PPA1. Zastosowanie tych par starterów pozwala niezależnie amplifikować fragmenty L i R uzyskanych transformantów, jednoznacznie potwierdzając istnienie odpowiedniego insertu. Przeprowadzenie reakcji umożliwiło wybór klonu 9 dla fragmentu O_{-10} , klonu 17 dla fragmentu $O_{1/2-10}$, klonu 11 dla fragmentu $O_{-35/-10}$ i klonu 4 dla fragmentu $O_{-35/1/2-10}$ jako plazmidów zawierających właściwe wstawki: dla $O_{-10}/O_{-35/-10}$ (L_1/L_3 połączone z R); dla $O_{1/2-10}/O_{-35/1/2-10}$ (L_2/L_4 połączone z R). W każdym z dwóch przypadków, w wyniku reakcji amplifikacji, otrzymano dwa produkty o długości około 70 pz odpowiadające odpowiednim segmentom fragmentów O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$. Ta analiza pozwoliła na wykluczenie możliwości, że są to konstrukcje typu $L_1L_1(L_3L_3)$, $L_2L_2(L_4L_4)$, RR.

Trawienie DNA rekombinantów enzymem *Bam*HI i reakcja amplifikacji na ich matrycach dostarcza informacji o tym, iż plazmid zawiera wstawkę, nie dostarcza jednak informacji o orientacji wbudowanego fragmentu, ponieważ wektor i fragment traktowane były tylko jednym enzymem restrykcyjnym. Zatem badany DNA mógł zostać wligowany w jednej z dwu możliwych orientacji. W celu sprawdzenia orientacji fragmentu wbudowanego do wektora należałoby zastosować taki enzym restrykcyjny, który będzie trawił wklonowany fragment DNA asymetrycznie, mając jednocześnie miejsce cięcia w plazmidzie, zmieniając w ten sposób ilość miejsc restrykcyjnych w cząsteczce plazmidu. Można zastosować również dwa różne enzymy, jeden trawiący w obrębie insertu (asymetrycznie), drugi w obrębie wektora. Zdecydowano się na pierwszy wariant i wykorzystano enzym *Ava* II (patrz 4.4), który tnie plazmid pDS1 w trzech pozycjach : 538, 2935 i 3157 (ryc. 18), dając fragmenty o długościach odpowiednio 222, 1170 i 2451 pz. Fragment A1 (i adekwatnie fragment O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$, $O_{-35/1/2-10}$) posiadają miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez ten enzym w pozycji 112 (w przypadku fragmentu O_{-35} w pozycji 107) od końca 5' nici niematrycowej, dając w wyniku cięcia fragmenty o długościach 112 pz (107 pz) i 18 pz . Po wbudowaniu fragmentów O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$, $O_{-35/1/2-10}$ do wektora pDS1, otrzymano by dodatkowe miejsce restrykcyjne i po cięciu enzymem *Ava* II powstałyby cztery fragmenty o długościach 222, 540, 763 i 2451 pz , w przypadku orientacji zgodnej (zgodnej z rosnącą numeracją określającą położenie miejsc restrykcyjnych w plazmidzie pDS1). Natomiast w przypadku orientacji przeciwnej powstałyby fragmenty o długościach 222, 632, 674 oraz 2451 pz. Przewidywany, orientacyjny układ prążków DNA otrzymany w wyniku działania enzymu restrykcyjnego *Ava*II na odpowiednie zrekombinowane plazmidy przedstawia ryc. 18.



Ryc. 18. Schemat wyniku cięcia DNA zrekombinowanych wektorów pDS1 enzymem *AvaII*. Elektroforeza w 1% żelu agarozowym:

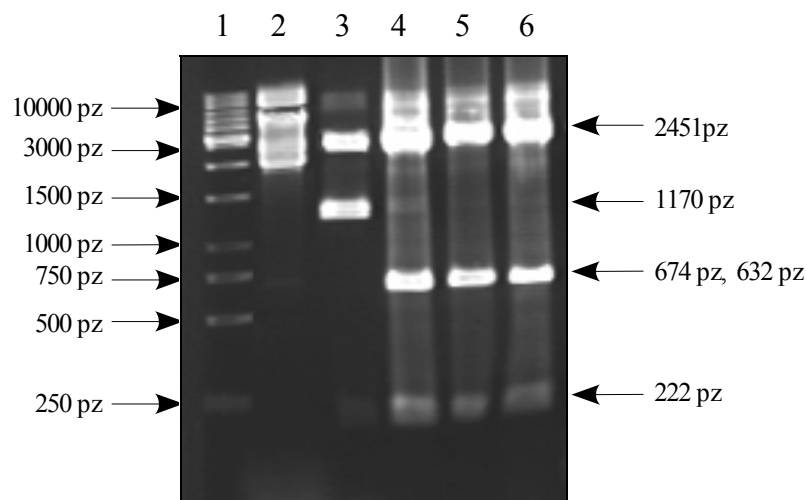
ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100bp Plus

ścieżka 2 – plazmid pDS1 cięty *AvaII*

ścieżka 3 – plazmid pDS1+A1 (O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$, $O_{-35/1/2-10}$) cięty *AvaII*, w zgodnej orientacji

ścieżka 4 – plazmid pDS1+A1 (O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$, $O_{-35/1/2-10}$) cięty *AvaII*, w przeciwnej orientacji.

Trawienie badanych konstruktyw pDS1+ O_{-35} , pDS1+ O_{-10} , pDS1+ $O_{1/2-10}$, pDS1+ $O_{-35/-10}$ oraz pDS1+ $O_{-35/1/2-10}$ zgodnie z opisanym schematem za pomocą enzymu *AvaII* pokazało taki sam obraz jak w przypadku pDS1+A1, dając cztery produkty cięcia o długościach 2451 pz, 674 pz i 632 pz (na żelu widoczne jako jeden prążek) oraz 222 pz, co świadczy o obecności wstawki w plazmidzie, i o jej przeciwnej orientacji (ryc. 19, 20). Orientacja ta jest również zgodna z orientacją uzyskaną wcześniej dla dzikiego promotora A1 faga T7 wklonowanego do wektora pDS1, co świadczy o preferencji tej orientacji w wektorze pDS1.



Ryc. 19. Produkty trawienia zrekombinowanych plazmidów (pDS1+A1, pDS1+O₋₁₀, pDS1+O_{1/2-10}) enzymem restrykcyjnym *Ava*II. Elektroforezę fragmentów DNA prowadzono w 1% żelu agarozowym. Żel barwiony bromkiem etydyny:

ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 1kb

ścieżka 2 – plazmid pDS1 nie cięty

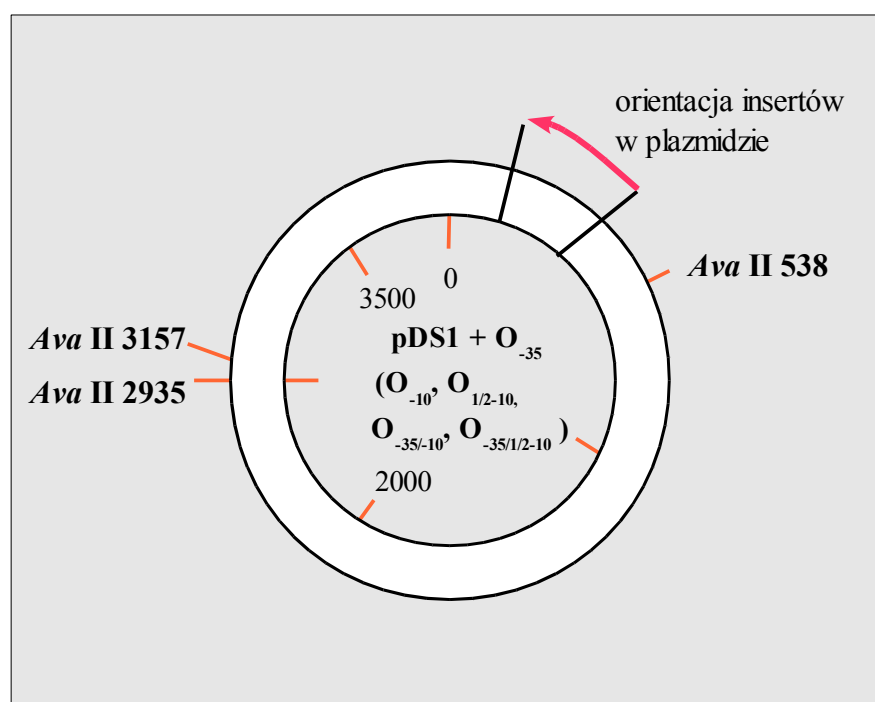
ścieżka 3 – plazmid pDS1 trawiony enzymem *Ava*II

ścieżka 4 – plazmid pDS1+A1 trawiony enzymem *Ava*II

ścieżka 5 – plazmid pDS1+O₋₁₀ trawiony enzymem *Ava*II

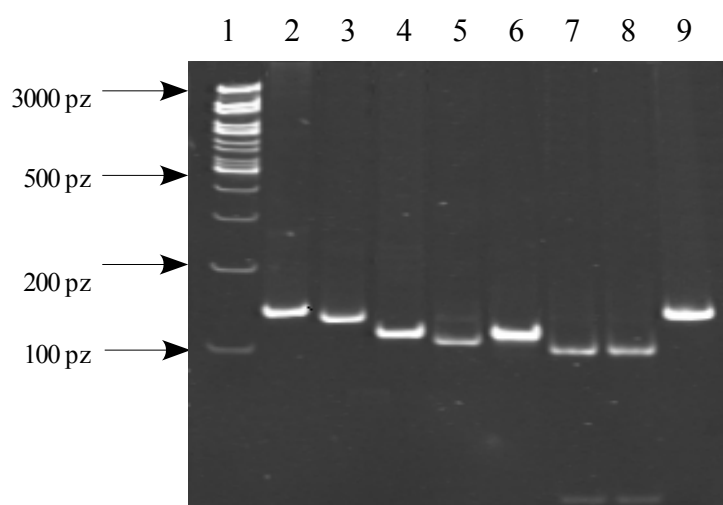
ścieżka 6 – plazmid pDS1+O_{1/2-10} trawiony enzymem *Ava*II

Podobny obraz trawienia enzymem *Ava*II uzyskano w przypadku zrekombinowanych plazmidów pDS1+O₋₃₅, pDS1+O_{-35/-10} oraz pDS1+O_{-35/1/2-10}. Uzyskane wyniki świadczą o obecności odpowiednich insertów i ich przeciwnej orientacji przedstawionej na rycinie 20.

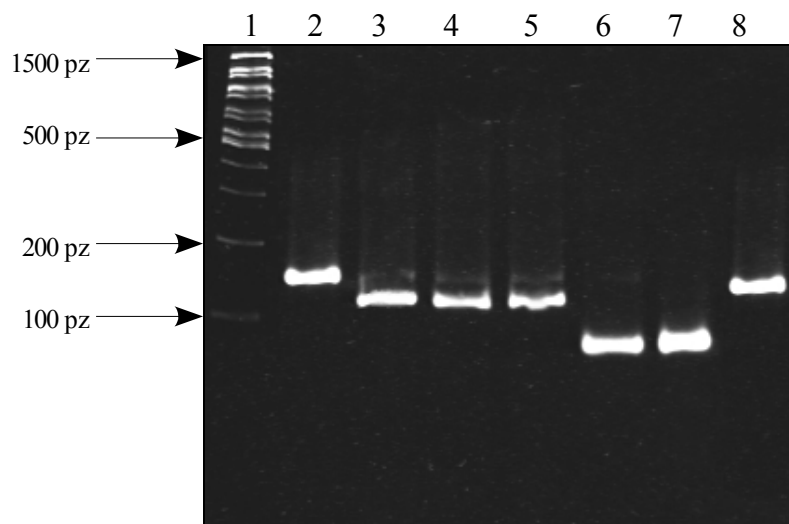


Ryc. 20. Orientacja insertów (O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/-10}, O_{-35/1/2-10}) w wektorze pDS1. Kierunek strzałki oznacza orientację przeciwną (przeciwnej do numeracji przyjętej w plazmidzie pDS1).

Dodatkowy dowód na obecność właściwych fragmentów w zrekombinowanych plazmidach uzyskano, amplifikując w reakcji PCR wklonowane fragmenty i przeprowadzając ich analizę restrykcyjną. Produkty amplifikacji oczyszczono i trawiono enzymami *AvaII* i *EcoRI* w przypadku pDS1+O₋₃₅, *AvaII* i *BglIII* w przypadku pDS1+O₋₁₀ i pDS1+O_{1/2-10} oraz *AvaII*, *EcoRI* i *BglIII* w przypadku pDS1+O_{-35/-10} i pDS1+O_{-35/1/2-10}. Jednocześnie przeprowadzono kontrolne cięcie fragmentu promotora A1 oraz fragmentu O₋₃₅ (fragment amplifikowany na matrycy pDS1+A1 z wykorzystaniem startera oligoLA1 i startera PPA1). Wynik cięcia przedstawiają ryc. 21, 22 i 23.



Ryc. 21. Wynik trawienia fragmentów O₋₃₅ oraz A1 enzymami *Ava II* i *EcoRI*. Elektroforezę prowadzono w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiony bromkiem etydyny:
 ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100bp Plus
 ścieżka 2 – A1 nie cięty
 ścieżka 3 – O₋₃₅ nie cięty
 ścieżka 4 – A1 trawione enzymem *AvaII*
 ścieżka 5 – O₋₃₅ trawione enzymem *AvaII*
 ścieżka 6 – produkt amplifikacji fragmentu O₋₃₅ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *AvaII*
 ścieżka 7 – produkt amplifikacji fragmentu O₋₃₅ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *EcoRI*
 ścieżka 8 – O₋₃₅ trawione enzymem *EcoRI*
 ścieżka 9 – A1 trawione enzymem *EcoRI*



Ryc. 22. Wynik trawienia fragmentów A1, O₋₁₀ oraz O_{1/2-10} enzymami *Ava* II i *Bg*III. Elektroforezę prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiony bromkiem etydyny:

ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene RulerTM 100bp Plus

ścieżka 2 – A1 nie cięty

ścieżka 3 – A1 trawione enzymem *Ava*II

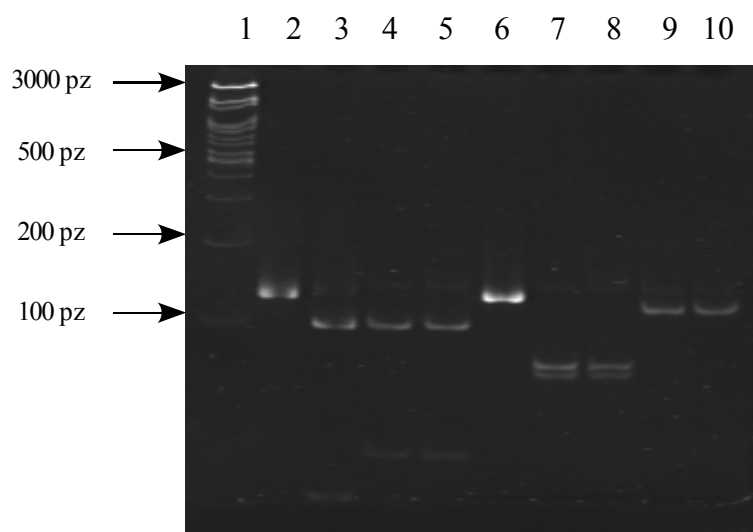
ścieżka 4 – produkt amplifikacji fragmentu O₋₁₀ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *Ava*II

ścieżka 5 – produkt amplifikacji fragmentu O_{1/2-10} wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *Ava*II

ścieżka 6 – produkt amplifikacji fragmentu O₋₁₀ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *Bg*III

ścieżka 7 – produkt amplifikacji fragmentu O_{1/2-10} wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *Bg*III

ścieżka 8 – A1 trawione enzymem *Bg*III.



Ryc. 23. Wynik trawienia fragmentów O_{-35} , $O_{-35/-10}$ oraz $O_{-35/1/2-10}$ enzymami restrykcyjnymi *AvaII*, *EcoRI* i *Bg/II*. Elektroforezę prowadzono w 10 % żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Żel barwiony bromkiem etydyny:

ścieżka 1 – wzorzec masowy Gene Ruler™ 100bp Plus

ścieżka 2 – O_{-35} nie cięty

ścieżka 3 – O_{-35} trawiony enzymem *EcoRI*

ścieżka 4 – produkt amplifikacji fragmentu $O_{-35/-10}$ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *EcoRI*

ścieżka 5 – produkt amplifikacji fragmentu $O_{-35/1/2-10}$ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *EcoRI*

ścieżka 6 – O_{-35} trawiony enzymem *Bg/II*

ścieżka 7 – produkt amplifikacji fragmentu $O_{-35/-10}$ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *Bg/II*

ścieżka 8 – produkt amplifikacji fragmentu $O_{-35/1/2-10}$ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *Bg/II*

ścieżka 9 – produkt amplifikacji $O_{-35/-10}$ fragmentu wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *AvaII*

ścieżka 10 – produkt amplifikacji fragmentu $O_{-35/1/2-10}$ wklonowanego do wektora pDS1 trawionego enzymem *AvaII*

Na podstawie ryc. 21, 22 i 23 można stwierdzić, iż w wyniku cięcia enzymem *AvaII* fragmentów uzyskanych na matrycach DNA wyizolowanych z badanych transformatów (kontrolę stanowiły cięcia fragmentów O_{-35} i A1 enzymem *AvaII*) otrzymano produkt odpowiadający długości 112 pz (w przypadku fragmentu O_{-35} produkt o długości 107 pz). Drugi produkt cięcia o długości 18 pz, ze względu na dużą ruchliwość elektroforetyczną, nie jest na żelu widoczny. Świadczy to, że wszystkie wklonowane fragmenty są pochodną oryginalnego promotora A1 bakteriofaga T7 i zawierają miejsce restrykcyjne dla enzymu *AvaII* prawidłowo zlokalizowane w pobliżu końca fragmentu. Natomiast trawienie enzymem *EcoRI* fragmentu DNA uzyskanego poprzez amplifikację na matrycy pDS1+ O_{-35} ,

pDS1+O_{-35/-10}, pDS1+O_{-35/1/2-10} wykazało obecność dwóch produktów o długości 38 pz oraz 96 pz, co świadczy o obecności miejsca rozpoznawanego przez ten enzym, a więc potwierdza obecność właściwego fragmentu, będącego pochodną oryginalnego promotora A1 faga T7. Kontrolny fragment O₋₃₅ otrzymany w wyniku amplifikacji z użyciem starterów oligoLA1 i PPA1 o długości 125 pz trawiony enzymem *EcoRI* daje fragmenty o długościach 29 pz i 96 pz. W przypadku trawienia fragmentów DNA uzyskanych w wyniku amplifikacji na matrycach pDS1+O₋₁₀ (O_{1/2-10}) oraz pDS1+O_{-35/-10} (O_{35/1/2-10}) enzymem *BglIII* zauważono obecność na żelu dwóch prążków o długościach około 62 pz i 69 pz, co świadczy o obecności we fragmencie sekwencji rozpoznawanej przez ten enzym. Wynik trawienia potwierdza, że fragmenty O₋₁₀ i O_{1/2-10}, O_{-35/-10}, O_{-35/1/2-10} są właściwymi konstruktami, będącymi pochodną oryginalnego promotora A1 bakteriofaga T7 zawierającymi zmieniony odpowiednio całkowicie i częściowo region -10 oraz zawierającymi jednocześnie zmieniony region -35 i -10. Natomiast kontrolne trawienie fragmentu A1 tymi samymi enzymami nie dało rezultatów, ponieważ nie zawiera on miejsc cięcia rozpoznawanych przez enzymy *EcoRI* i *BglIII*. Przeprowadzenie weryfikacji konstruktów przy pomocy enzymów restrykcyjnych było konieczne ze względu na sprawdzenie skuteczności cięcia odpowiednich sekwencji przez te enzymy, co było niezbędne do dalszych doświadczeń.

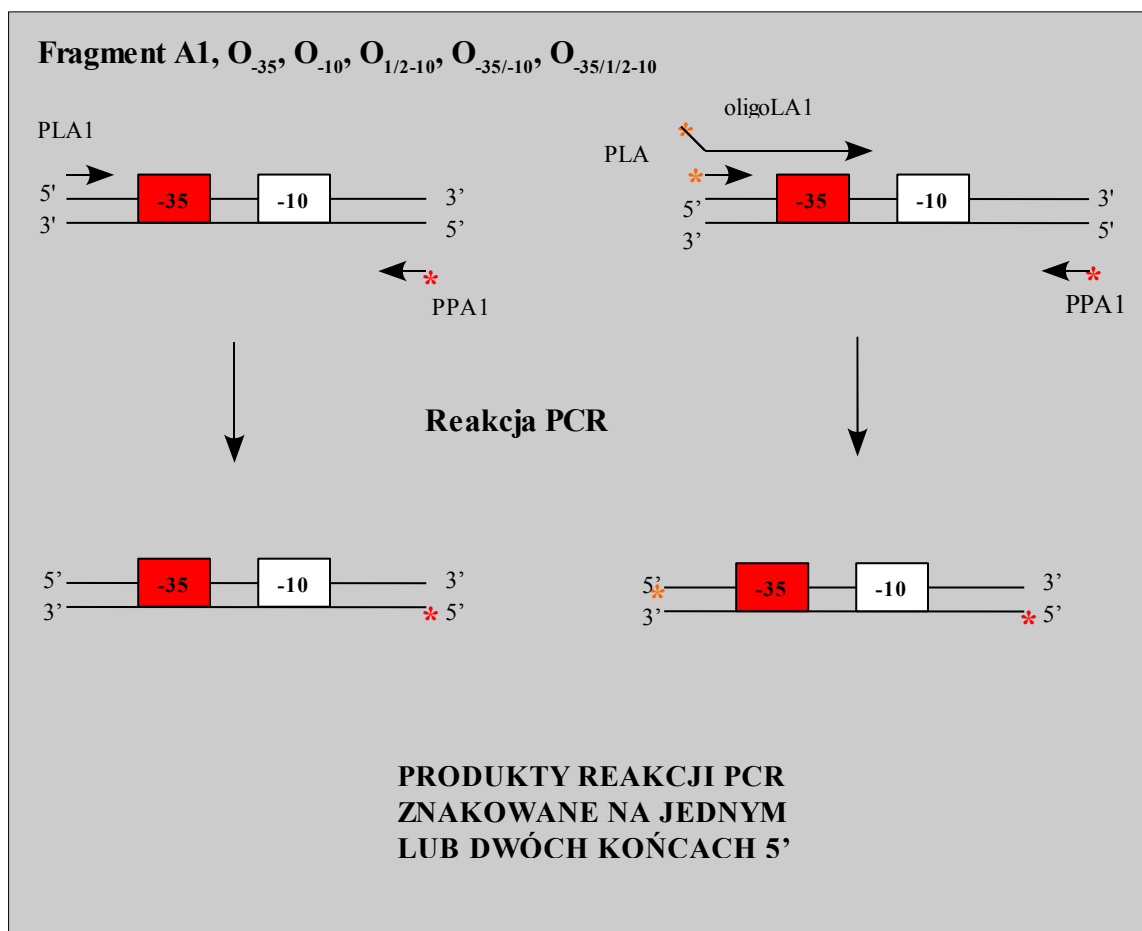
Ostatecznym potwierdzeniem obecności właściwych fragmentów było przeprowadzenie reakcji sekwencjonowania z wykorzystaniem systemu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). W przypadku fragmentu A1 oraz O₋₃₅ przeprowadzono także manualne sekwencjonowanie metodą enzymatyczną Sanger (patrz 4.21) /123/.

5.2 Analiza oddziaływań fragmentów O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/-10} i O_{-35/1/2-10} z holoenzymem polimerazy RNA *E. coli*

5.2.1 Znakowanie radioaktywne fragmentów A1, O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/1/2-10}

Do badania oddziaływań holoenzymu polimerazy RNA z promotorowym DNA wykorzystano fragmenty O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/-10}, O_{-35/1/2-10} oraz A1 znakowane radioaktywnie na końcu 5' nici DNA. W reakcji znakowania wykorzystano enzym kinazę polinukleotydową faga T4 i izotop fosforu ³²P w postaci trifosforanu nukleozydu znakowanego w pozycji γ – [γ -³²P]ATP.

W większości eksperymentów zdecydowano się na znakowanie syntetycznych starterów wykorzystanych następnie w reakcji amplifikacji, a nie restrykcyjnych fragmentów DNA otrzymanych w wyniku cięcia z plazmidu (ryc. 24). Startery są syntetyzowane bez grupy fosforanowej na końcu 5', mogą być więc łatwo wyznakowane poprzez przeniesienie γ -³²P z [γ -³²P]ATP przy pomocy kinazy polinukleotydowej. W związku z tym nie jest konieczna defosforylacja niezbędna w przypadku fragmentów restrykcyjnych. Do eksperymentów poświęconych analizie oddziaływań polimerazy RNA z promotorowym DNA, w zależności od rodzaju doświadczeń, używano fragmentów DNA znakowanych radioaktywnie na końcu jednej z nici DNA lub fragmentów z radioaktywnym fosforem na końcach 5' obu nici DNA. W pierwszym przypadku znakowano radioaktywnie na końcu 5' starter PPA1 (patrz 4.16), by następnie w reakcji PCR otrzymać fragmenty DNA znakowane na końcu 5' nici matrycowej. Aby otrzymać fragmenty DNA znakowane na obu końcach 5' cząsteczki DNA używano dwóch znakowanych starterów PPA1 i PLA1 w przypadku A1, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/-10} i O_{-35/1/2-10}, a także PPA1 i oligoLA1 w przypadku fragmentu O₋₃₅ (patrz 4.16) (ryc. 24).



Ryc. 24. Schemat otrzymywania znakowanych na jednym lub dwóch końcach 5' fragmentów A1, O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/-10} oraz O_{-35/1/2-10} przy zastosowaniu reakcji PCR. Pomarańczowa gwiazdka oznacza radioaktywny fosfor ³²P. Lewa strona rysunku dotyczy sytuacji, gdy do reakcji amplifikacji zastosuje się starter PPA1 znakowany na końcu 5'. Natomiast prawa strona rysunku dotyczy sytuacji, gdy do reakcji amplifikacji zastosuje się oba startery PPA1 i PLA1, a także PPA1 i oligoLA1 znakowane na końcu 5'.

5.2.2 Badanie oddziaływania fragmentów O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10} Z holoenzymem polimerazy RNA – reakcja tworzenia kompleksów binarych.

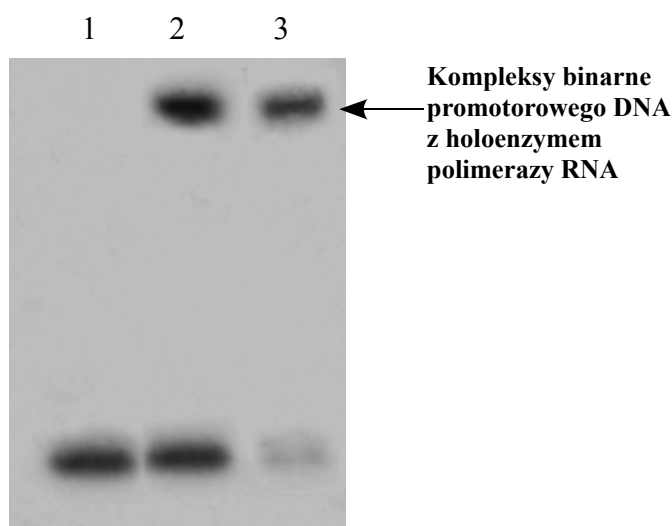
Spośród dostępnych metod analizy oddziaływań białka z DNA wybrano **metodę opóźniania migracji kompleksów w żelu** (ang. *gel retardation*) [47, 60]. Technika ta wykorzystuje znaczną różnicę we właściwościach elektroforetycznych wolnego fragmentu DNA i fragmentu DNA związanego z białkiem, tworzącego zdefiniowane kompleksy. Metoda opóźniania migracji kompleksów w żelu poliakryloamidowym jest jedną z najlepszych metod detekcji kompleksów białko-DNA. Pozwala na ilościowe analizy kompleksów, jeżeli są one wystarczająco stabilne i specyficzne. Analizy te można przeprowadzić w oparciu o analizę intensywności prążków DNA uwidocznionych poprzez

barwienie żelu odpowiednim barwnikiem fluoryzującym, np. bromkiem etydyny wbudowującym się między zasady DNA lub oceniając zaczernienie kliszy w czasie autoradiografii, pochodzące od radioaktywnie znakowanych fragmentów DNA. Bardziej czułym sposobem analizy kompleksów w żelach poliakryloamidowych jest druga z wymienionych metod, która pozwala na analizę kompleksów zawierających nawet pg ilości DNA. Ponadto metoda opóźniania migracji kompleksów w żelu poliakryloamidowym pozwala na analizę kompleksów nawet w niezbyt oczyszczonych preparatach białka. Najważniejszą jednak zaletą metody jest ogromna zdolność rozdzielcza, której nie można porównać z żadną inną techniką analizy.

W eksperymentach tego typu pierwszym ważnym krokiem jest dobranie optymalnych ilości białka i DNA. Polimeraza RNA wiąże się z dwuniciową, liniową cząsteczką DNA zarówno specyficznie, do sekwencji promotora, jak i niespecyficznie do różnych innych sekwencji DNA. Szczególnie silne wiązanie niespecyficzne dotyczy końców cząsteczki DNA. Poza tym stosowane preparaty polimerazy RNA są niejednorodne, ponieważ oprócz holoenzymu występują w nim wolne cząsteczki rdzenia i podjednostki sigma. Oba komponenty, zarówno holoenzym jak i rdzeń, wykazują zdolność do wiązania się z promotorowym DNA z różnym powinowactwem. Wykazują też różne skłonności do wzajemnego oddziaływania, a także do tworzenia agregatów. W mieszaninie istnieją więc współzawodniczące oddziaływania DNA-białko. W związku z tym należy podjąć takie działania, które spowodują preferencyjne osłabienie wiązań niespecyficznych i przesunięcie równowagi w kierunku tworzenia wiązań specyficznych holoenzymu polimerazy RNA z promotorowym DNA. Elementem zwiększającym specyficzność tworzonych kompleksów, jest osłabienie oddziaływań niespecyficznych poprzez zastosowanie heparyny. Związek ten, będąc polianionem, współzawodniczy z DNA o miejsce wiązania z polimerazą RNA poprzez łączenie się z podjednostką β' i osłabia tym samym niespecyficzne wiązanie enzymu m.in. do końców DNA lub do przypadkowych sekwencji w obrębie DNA.

Optymalizując warunki tworzenia kompleksów białko-DNA, testowano odpowiednie proporcje rdzenia i podjednostki sigma w preparatach holoenzymu oraz analizowano wpływ ilości holoenzymu na efekt tworzenia kompleksów (ryc. 25 i ryc. 26). W związku z tym, iż oczyszczony preparat enzymu zawiera substechiometryczne ilości podjednostki sigma, należy go wzbogacić w tą niezależnie oczyszczoną podjednostkę. Także w preparatach rekonstruowanego enzymu, uzyskanych poprzez składanie niezależnie oczyszczonych poszczególnych podjednostek, konieczne jest odpowiednie

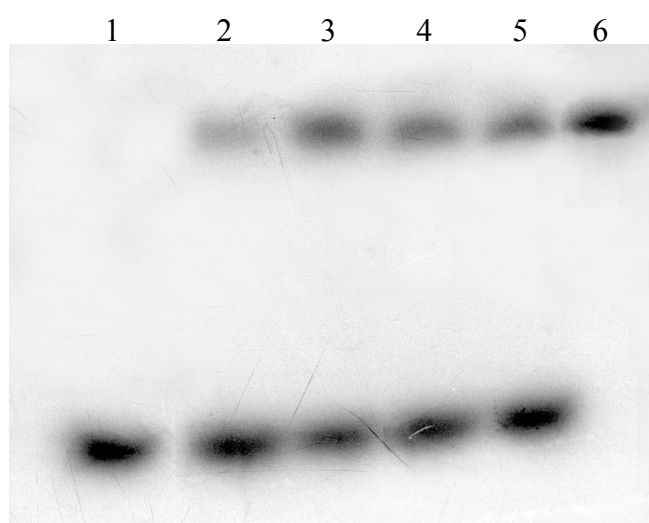
dobranie ilości podjednostki sigma w stosunku do rdzenia, aby uzyskać nadmiar podjednostki sigma w stosunku do cząsteczek rdzenia. Zastosowanie wyższych stężeń molowych podjednostki sigma w stosunku do rdzenia polimerazy owocuje przeprowadzeniem wrażliwego na heparynę kompleksu rdzeń-DNA w oporny na działanie tego kompetytora kompleks holoenzym-DNA. Zwiększa się, zatem ilość kompleksu, maleje natomiast ilość wolnego DNA. Aby ustalić optymalny stosunek sigmy do rdzenia, do mieszaniny zawierającej tę samą ilość DNA i rdzenia dodawano różne ilości podjednostki sigma polimerazy RNA. W doświadczeniu wykorzystano preparat rdzenia o stężeniu 63 mg/ml i podjednostki sigma o stężeniu 44.8 mg/ml oraz promotor A1 faga T7 o stężeniu 89 ng/ μ l. Przykład tej optymalizacji przedstawia rycina 25, w którym względne molowe proporcje podjednostki sigma i rdzenia wynosiły 2:1 i 3:1 (ścieżki 2 i 3).



Ryc. 25. Rozdział elektroforetyczny przedstawiający dobór optymalnych ilości rdzenia i podjednostki sigma z wykorzystaniem promotora A1 faga T7 znakowanego [γ - 32 P]ATP na końcu 5' nici matrycowej. W celu wyeliminowania oddziaływań niespecyficznych zastosowano heparynę o stężeniu około 1 mg/ml. Elektroforezę prowadzono w 3.5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Autoradiografia żelu poliakrylamidowego:
 ścieżka 1 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7
 ścieżka 2 – kompleks binarny fragmentu A1 z holoenzymem polimerazy RNA – stosunek rdzenia do podjednostki sigma 1:2, stężenie rdzenia 0.32 mg/ml, stężenie sigmy 0.11 mg/ml
 ścieżka 3 – kompleks binarny fragmentu A1 z holoenzymem polimerazy RNA – stosunek rdzenia do podjednostki sigma 1:3, stężenie rdzenia 0.32 mg/ml, stężenie podjednostki sigma 0.17 mg/ml.

W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że w warunkach, w których stosunek molowy rdzenia do podjednostki sigma wynosił 1:3, wolny DNA został praktycznie w całości przekształcony w kompleks binarny (ścieżka 3). Podobne relacje uzyskano dla innych preparatów polimerazy RNA /60/.

Kolejnym etapem przy optymalizacji warunków tworzenia kompleksów binarnych było dobranie takich stężeń wolnego DNA i holoenzymu, aby maksymalne ilości DNA znalazły się w kompleksie. Na rycinie 26 przedstawiono przebieg analizy efektywności tworzenia kompleksów binarnych, poprzez miareczkowanie stałej ilości DNA rosnącym stężeniem holoenzymu polimerazy RNA.



Ryc. 26. Autoradiografia przedstawiająca analizę wpływu ilości holoenzymu polimerazy RNA na efekt tworzenia kompleksów binarnych. Stałe ilości DNA miareczkowano wzrastającym stężeniem holoenzymu. Heparynę o stężeniu około 1 mg/ml zastosowano w celu wyeliminowania oddziaływań niespecyficznych. Elektroforezę prowadzono w 3.5% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

ścieżka 1 – wolny fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7

ścieżka 2 – kompleks binarny A1 z holoenzymem mieszany w stosunku molowym 1:1

ścieżka 3 – kompleks binarny A1 z holoenzymem mieszany w stosunku molowym 1:1.5

ścieżka 4 – kompleks binarny A1 z holoenzymem mieszany w stosunku molowym 1:2

ścieżka 5 – kompleks binarny A1 z holoenzymem mieszany w stosunku molowym 1:2.5

ścieżka 6 – kompleks binarny A1 z holoenzymem mieszany w stosunku molowym 1:3

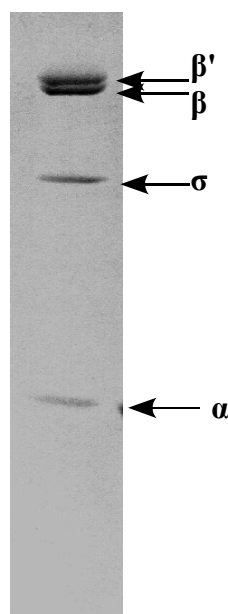
Stosując wzrastające ilości holoenzymu w stosunku do DNA, uzyskuje się większą ilość kompleksu, aż do momentu, kiedy cała ilość DNA zostanie przekształcona w kompleks binarny (ścieżka 6). Taka sytuacja określa maksymalne wysycenie DNA holoenzymem polimerazy RNA i tym samym stanowi o optymalnej stechiometrii obydwu składników kompleksu. Do reakcji tworzenia kompleksów binarnych konieczny jest

nadmiar holoenzymu polimerazy RNA w stosunku do DNA, ze względu na to, iż jak wynika z oznaczania aktywności enzymu [21], tylko około 30-40% cząsteczek enzymu stosowanego w eksperymencie wykazuje aktywność w procesie transkrypcji.

Warunki reakcji optymalizowano w oparciu o niezmienny promotor A1 bakteriofaga T7 znakowany radioaktywnie na końcu 5' nici matrycowej, ponieważ ocena rangi heksamerów -35 i -10 fragmentów promotorowych musi być odniesiona do wzorca, którym w tym przypadku jest promotor A1 typu dzikiego. W dalszej części badań dotyczących efektywności tworzenia kompleksów binarnych przez zmodyfikowane fragmenty promotorowe, wykorzystano optymalne stężenia DNA i holoenzymu, oraz holoenzym o wcześniej eksperymentalnie dobranych optymalnych stężeniach rdzenia i podjednostki sigma (patrz 4.17). W każdym przypadku reakcję tworzenia kompleksów przeprowadzono w temperaturze 37°C, w obecności buforu o niskiej sile jonowej (8 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl). Ważnym elementem tej procedury, po utworzeniu kompleksów binarnych, jest przeprowadzenie dializy w celu usunięcia soli, której obecność w czasie elektroforezy powoduje wzrost temperatury w żelu, destabilizację i rozpad kompleksów. W tym celu zastosowano mikrodializę na odpowiednich filtrach membranowych (VS 0.025 μ m Millipore), w której objętość dializowanej próbki może być równa nawet kilku mikrolitrom. W czasie dializy sól dyfunduje przez membranę do buforu, na którym umieszczona jest membrana. Po dializie, do próbki dodawano heparynę (o stężeniu około 1 mg/ml), która rozbija niespecyficzne kompleksy i nakładano na żel. Optymalne stężenie heparyny (1 mg/ml) wykorzystywane w doświadczeniach tworzenia kompleksów binarnych, ustalono badając szeroki zakres stężeń tego kompetytora (2.5 mg/ml-0.05 mg/ml). Dopiero przy stężeniu 1 mg/ml widoczny był pojedynczy prążek odpowiadający kompleksowi holoenzymu polimerazy RNA z sekwencją promotorową.

Po ustaleniu optymalnych warunków, niezbędnych do tworzenia kompleksów binarnych, w których wykorzystano promotor A1 faga T7, przeprowadzono doświadczenia mające określić efektywność tworzenia kompleksów holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA niosącymi zmienione regiony -10 i -35. W eksperymentach wykorzystano preparaty holoenzymu, który uzyskano w wyniku rekonstrukcji enzymu poprzez złożenie w odpowiednim stosunku molowym rdzenia polimerazy RNA i podjednostki sigma (rdzeń polimerazy RNA został zrekonstruowany z niezależnie nadprodukowanych przez odpowiednie szczepy bakterii *Escherichia coli* i oczyszczonych do homogenności podjednostek α , β , β' przez dr hab. Władysława Werela w Instytucie Maxa Plancka fuer Biochemie w Martinsried). Skład podjednostkowy enzymu

analizowano na 10% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Wynik składowania enzymu przedstawiono na ryc. 27.

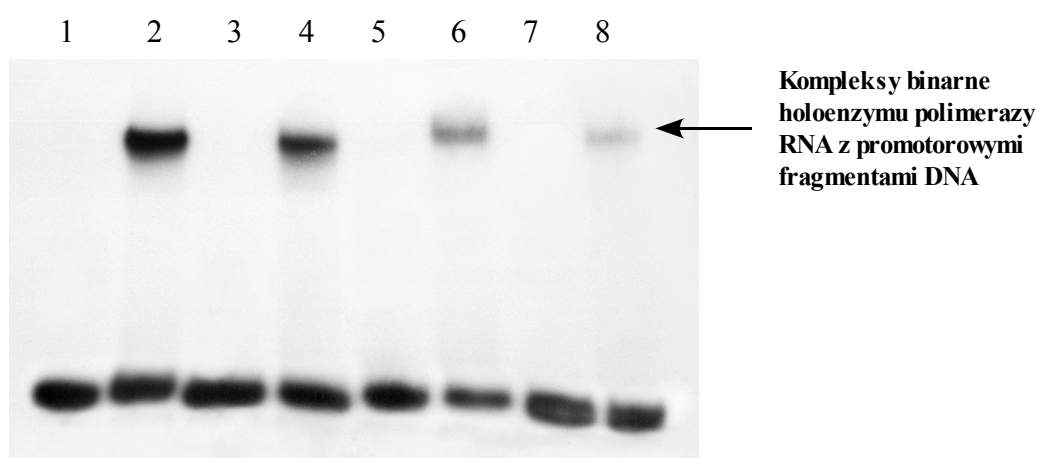


Ryc. 27. Analiza holoenzymu polimerazy RNA otrzymanego w wyniku rekonstrukcji z podjednostek α , β , β' oraz σ na 10% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

Otrzymany w powyższy sposób enzym był następnie wykorzystywany we wszystkich kluczowych eksperymentach analizujących oddziaływanie fragmentów DNA, zawierających zmienione regiony promotora z holoenzymem polimerazy RNA. Ze względu na ograniczoną dostępność enzymu o takim stopniu czystości i stężeniu, a także wysokie koszty i trudności z otrzymaniem tego preparatu, jak również wysokie koszty odpowiedniego enzymu ze źródeł komercyjnych, zdecydowano się opracować metodę izolacji enzymu zawierającego rozszerzenie polihistydynowe (His_6 -tag – sześć reszt histydynowych) związanego z C-terminalną częścią podjednostki β' polimerazy RNA *Escherichia coli* lub C-terminalną częścią podjednostki α (patrz 4.12, 4.13). Rozszerzenie polihistydynowe umożliwia szybkie oczyszczanie enzymu bezpośrednio z ekstraktu komórkowego poprzez adsorpcję na złożu zawierającym jony Ni^{2+} unieruchomione na odpowiednim nośniku (złożo Ni-NTA agarose) [143], a następnie elucję przy pomocy roztworu imidazolu o odpowiednim stężeniu. Enzym uzyskany w ten sposób wykorzystywano w eksperymentach wstępnych dotyczących otrzymywania i analizy kompleksów.

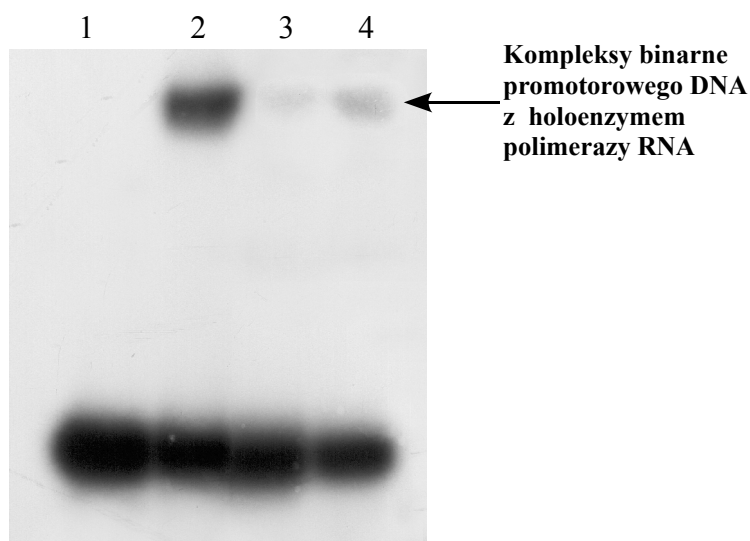
Do eksperymentów poświęconych analizie tworzenia kompleksów binarnych użyto

fragmenty promotorowego DNA o stężeniach : A1 – 89 ng/μl, O₋₁₀ – 40 ng/μl, O_{1/2-10} – 38 ng/μl, O₋₃₅ – 87 ng/μl, O_{-35/-10} – 35 ng/μl, O_{-35/1/2-10} – 36 ng/μl znakowane radioaktywnie na końcu 5'. Podobnie jak w przypadku promotora A1 faga T7 typu dzikiego, również w przypadku zmodyfikowanych fragmentów promotorowych zastosowano kompetytor DNA – heparynę o stężeniu wyjściowym 20 mg/ml (stężenie końcowe w mieszaninie reakcyjnej wynosiło około 1 mg/ml). Skuteczność tworzenia kompleksów binarnych sprawdzano prowadząc elektroforezę w 3.5% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących (patrz 3.17.2, 4.11). Wynik doświadczenia ilustrują ryc. 28 i 29.



Ryc. 28. Autoradiografia przedstawiająca analizę efektywności tworzenia kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA: A1, O_{1/2-10}, O₋₁₀ i O₋₃₅ znakowanymi ³²P na końcu 5' nici matrycowej. W celu wyeliminowania oddziaływań niespecyficznych zastosowano heparynę o stężeniu 1 mg/ml. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

- ścieżka 1 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7
- ścieżka 2 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z A1
- ścieżka 3 – fragment O₋₃₅
- ścieżka 4 – kompleks holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O₋₃₅
- ścieżka 5 – fragment O_{1/2-10}
- ścieżka 6 – kompleks holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{1/2-10}
- ścieżka 7 – fragment O₋₁₀
- ścieżka 8 – kompleks holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O₋₁₀



Ryc. 29. Autoradiografia przedstawiająca analizę efektywności tworzenia kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA: A1, O_{-35/-10} i O_{-35/1/2-10} znakowanymi ³²P na końcu 5' nici matrycowej. W celu wyeliminowania oddziaływań niespecyficznych zastosowano heparynę o stężeniu 1 mg/ml. Elektroforezę prowadzono w 3.5% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

ścieżka 1 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7

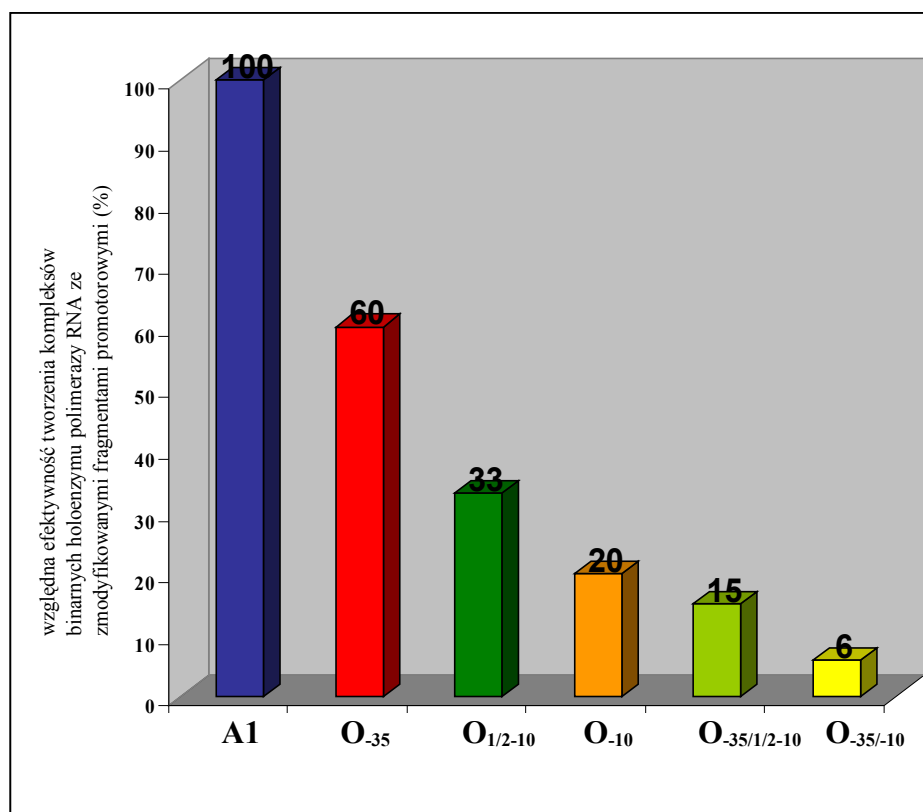
ścieżka 2 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem A1

ścieżka 3 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{-35/-10}

ścieżka 4 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{-35/1/2-10}

Uzyskane wyniki okazały się być zaskakujące, ponieważ nawet w przypadkach, w których heksamery zostały całkowicie zmienione (O₋₃₅, O₋₁₀), otrzymano prążki odpowiadające kompleksowi DNA z holoenzymem polimerazy RNA. Nieznaczne ilości kompleksów binarnych otrzymano również dla fragmentów zawierających zmienione obydwie heksamery jednocześnie (O_{-35/1/2-10}, O_{-35/-10}). W przypadku fragmentu O₋₃₅ prążek odpowiadający kompleksowi holoenzymu polimerazy RNA z tym fragmentem jest mniej intensywny od prążka odpowiadającego kompleksowi RNAP z fragmentem A1, ale intensywności prążków świadczą o wysokiej reaktywności fragmentu niosącego zmieniony region -35. Natomiast kompleksy z fragmentami O_{1/2-10} i O₋₁₀ są znacznie słabsze od kompleksów z fragmentami DNA zawierającymi promotor A1, a nawet w porównaniu z fragmentem zawierający zmieniony heksamer -35 (O₋₃₅). Analizę ilościową kompleksów przeprowadzono stosując program komputerowy Gel Scan ver. 1.13, który umożliwia analizę ilościową intensywności prążków zarejestrowanych na kliszy rentgenowskiej w czasie autoradiografii. Efektywność tworzenia wszystkich kompleksów określano w

odniesieniu do aktywności fragmentu DNA zawierającego promotor A1, którą przyjęto jako 100% (ryc. 30).



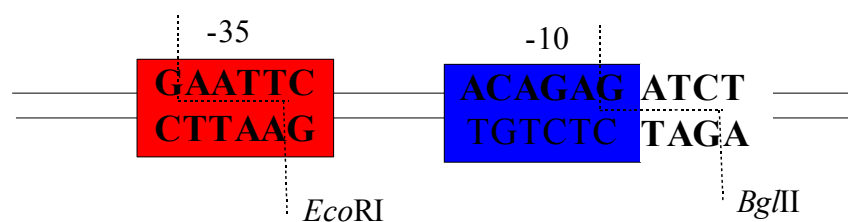
Ryc. 30. Porównanie względnej efektywności tworzenia kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA ze zmodyfikowanymi fragmentami O₋₃₅, O_{1/2-10}, O₋₁₀, O_{-35/1/2-10} i O_{-35/-10}. Cyfry powyżej słupków określają ilość powstałego kompleksu w odniesieniu do fragmentu A1 (100%).

Wyniki eksperymentu świadczą o tym, iż wbrew oczekiwaniom zmiana sekwencji **TTGACT** na sekwencję **GAATTC** w obrębie regionu -35 nie ma drastycznego wpływu na tworzenie kompleksu z holoenzymem polimerazy RNA w porównaniu z niezmienionym fragmentem promotorowego DNA. Fragment promotorowego DNA zawierający zmodyfikowany region -35 wykazuje około 55-65% aktywności promotora A1. Natomiast zmiany w obrębie regionu -10 sekwencji **GATACT** na sekwencję **GATGAG** (O_{1/2-10}) oraz sekwencję **ACAGAG** (O₋₁₀) w większym stopniu zmniejszyły efektywność tworzenia kompleksu o odpowiednio 67% i 80%. We fragmentach O₋₁₀ i O_{1/2-10} obserwujemy tzw. efekt addytywny obu części heksameru -10, ponieważ każda z tych części wnosi wkład w stabilność kompleksu. Zmiana zasad -9, -8 i -7 fragmentu O_{1/2-10} spowodowała osłabienie efektywności tworzenia kompleksu binarnego o około 70%, podczas gdy dodatkowa zmiana drugiej połowy heksameru zmniejszyła efektywność o dalsze 13%. Także w

przypadku fragmentów, w których zmieniono oba regiony, -35 i -10, otrzymano, wbrew oczekiwaniom, kompleksy binarne, jednakże z bardzo niską efektywnością, odpowiadającą około 15 i 6% aktywności promotora A1 faga T7. Silniejszy efekt w przypadku regionu -10 świadczy o tym, że oddziaływanie z tym heksamerem jest ważniejsze dla tworzenia stabilnych kompleksów binarnych, niż tego typu oddziaływania w regionie -35. Pomimo to, iż sekwencja -35 została całkowicie zmieniona, tzn. odpowiednie zasady zostały zastąpione innymi, efektywność tworzenia kompleksu okazała się być wysoka. Również fragmenty $O_{1/2-10}$ i O_{-10} wykazują nieoczekiwanie wysoką efektywność tworzenia kompleksów z polimerazą RNA. Być może spowodowane jest to faktem, że wprowadzone podstawienia zasad w regionach -35 i -10 nie wywołały całkowitego upośledzenia tych heksamerów i szczątkowa aktywność tych sekwencji w wiązaniu enzymu została zachowana. Może to świadczyć również o tym, że do tworzenia kompleksu znaczący wkład mogłyby wносить niespecyficzne sekwencje promotora, inne niż heksamery -35 i -10. Sekwencje te mogłyby być zlokalizowane zatem albo powyżej heksameru -35 albo też poniżej, np. sekwencja łącząca oba heksamery, w pobliżu i poniżej miejsca startu transkrypcji. Być może rolę tę pełni region zlokalizowany powyżej heksameru -35, któremu przypisuje się znaczącą rolę w stabilizacji kompleksu poprzez dodatkowe kontakty z polimerazą RNA (tzw. *wrapping*) /117/.

5.2.3 Badanie kompleksów binarnych za pomocą enzymów restrykcyjnych

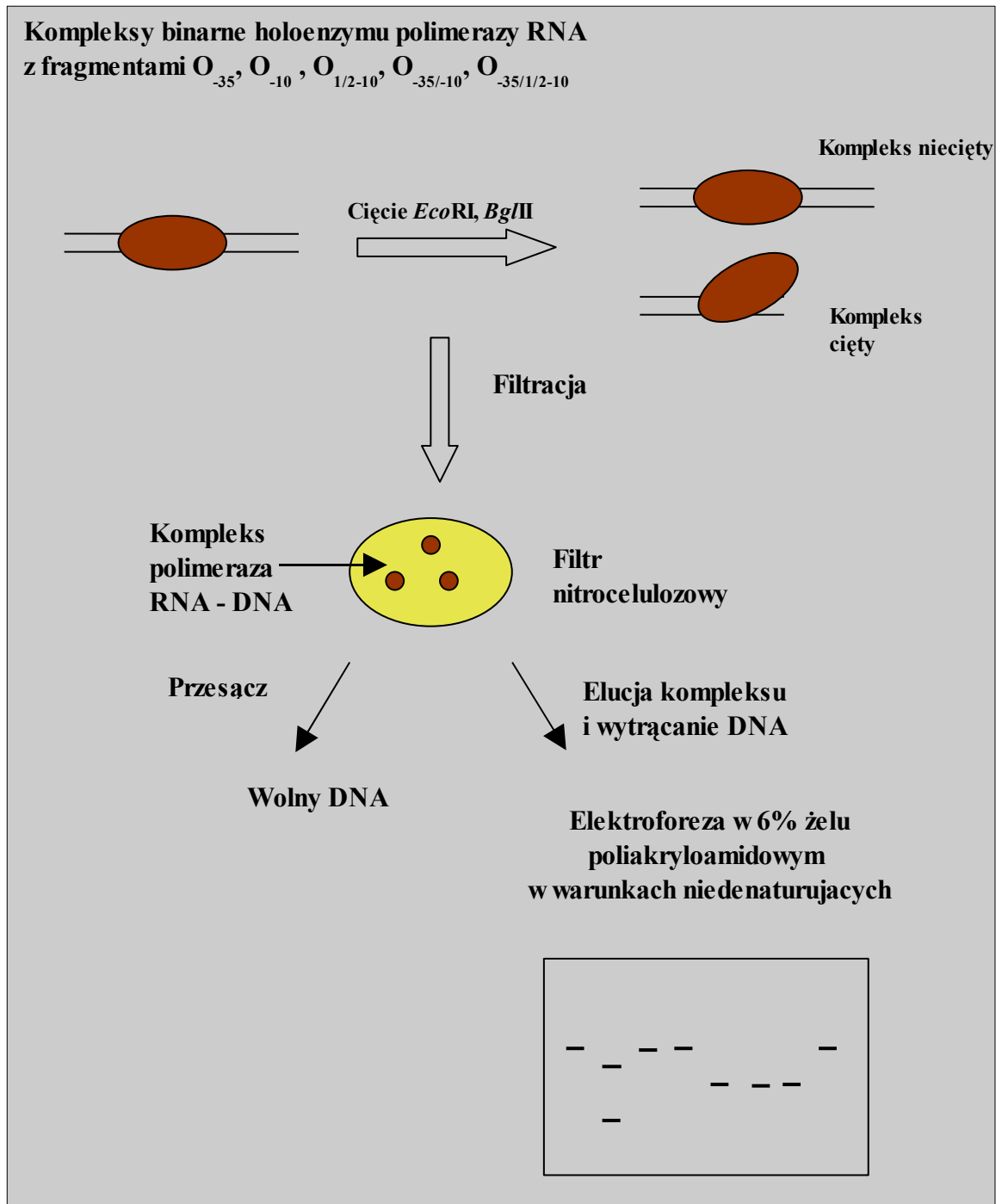
W celu wyjaśnienia przyczyn różnej efektywności tworzenia kompleksów binarnych przez zmodyfikowane w regionach -35 i -10 fragmenty promotorowe, utworzone kompleksy poddano analizie za pomocą enzymów restrykcyjnych. Zastosowano enzymy restrykcyjne trawiące badane fragmenty DNA w ściśle określonych miejscach, mających istotne znaczenie dla tworzenia kompleksów promotora z holoenzymem polimerazy RNA (ryc. 31)



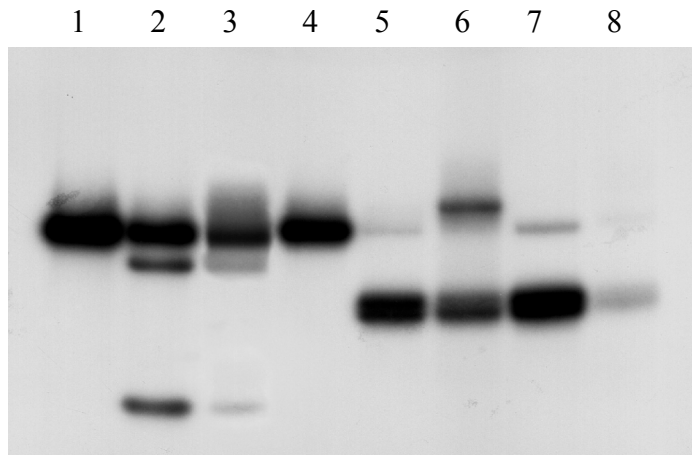
Ryc. 31. Schemat przedstawiający miejsca cięcia enzymów *EcoRI* i *BgIII* w zmodyfikowanych heksamerach -35 i -10 promotora A1 faga T7.

W eksperymentach tych utworzone kompleksy binarne (patrz 4.17) trawiono w obecności heparyny odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi: fragment O_{-35} w kompleksie z holoenzymem polimerazy RNA trawiono enzymem *EcoRI*, kompleksy utworzone przez fragmenty O_{-10} i $O_{1/2-10}$ trawiono enzymem *BgIII*, natomiast kompleksy tworzone przez podwójne mutanty $O_{-35/-10}$ i $O_{-35/12-10}$ trawiono enzymami *EcoRI* i *BgIII* (patrz 4.19). Fragmenty DNA wykorzystane w doświadczeniu znakowane były na obydwu końcach 5', w celu niezależnej analizy obu fragmentów, które mogą powstać w wyniku reakcji trawienia. Trawione kompleksy oddzielono od wolnego DNA poprzez proces filtracji na nitrocelulozowych filtrach membranowych w sposób opisany w punkcie 4.19. Utworzone kompleksy białko-DNA zatrzymywane są na filtrze, natomiast wolny DNA przechodzi do przesączu. Kompleksy immobilizowane na filtrach eluowano, izolowano z nich DNA, które następnie analizowano metodą elektroforezy w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. Schemat eksperymentu przedstawia ryc. 32.

Kontrolę dla tych eksperymentów stanowiło trawienie enzymami *EcoRI* i *BgIII* wolnego DNA (fragmenty O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$, $O_{-35/12-10}$). Kontrolę tę prowadzono w obecności heparyny, aby wykluczyć wpływ tego kompetytora na działanie enzymów restrykcyjnych. Wyniki analiz elektroforetycznych DNA uzyskanych z kompleksów binarnych poddanych działaniu enzymów restrykcyjnych *EcoRI* i *BgIII* przedstawiono na ryc. 33 i 34.



Ryc. 32. Schemat doświadczenia dotyczącego analizy kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami promotorowymi O_{-35} , O_{-10} , $O_{1/2-10}$, $O_{-35/-10}$, $O_{-35/1/2-10}$ za pomocą enzymów restrykcyjnych *EcoRI* i *BglII*.



Ryc. 33. Autoradiografia przedstawiająca analizę restrykcyjną kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami O_{-35} , $O_{1/2-10}$ i O_{-10} . Elektroforezę prowadzono w 6 % żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących:

ścieżka 1 – fragment O_{-35}

ścieżka 2 – fragment O_{-35} trawiony enzymem *EcoRI*

ścieżka 3 – DNA wyizolowany z kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{-35} trawionego enzymem *EcoRI*

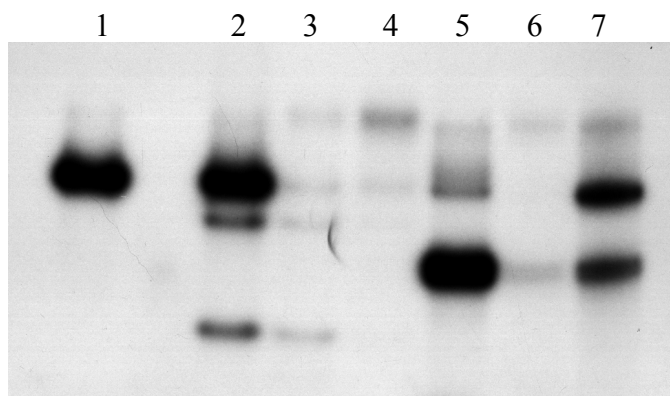
ścieżka 4 – fragment O_{-10}

ścieżka 5 – fragment O_{-10} trawiony enzymem *BglII*

ścieżka 6 – DNA wyizolowany z kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{-10} trawionego enzymem *BglII*

ścieżka 7 – fragment $O_{1/2-10}$ trawiony enzymem *BglII*

ścieżka 8 – DNA wyizolowany z kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{1/2-10}$ trawionego enzymem *BglII*



Ryc. 34. Autoradiografia przedstawiająca analizę restrykcyjną kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami $O_{-35/-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$. Elektroforezę prowadzono w 6 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

ścieżka 1 – fragment $O_{-35/-10}$

ścieżka 2 – fragment $O_{-35/-10}$ trawiony enzymem *EcoRI*

ścieżka 3 – DNA wyizolowany z kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/-10}$ trawionego enzymem *EcoRI*

ścieżka 4 – DNA wyizolowany z kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/1/2-10}$ trawionego enzymem *EcoRI*

ścieżka 5 – fragment $O_{-35/1/2-10}$ trawiony enzymem *BgIII*

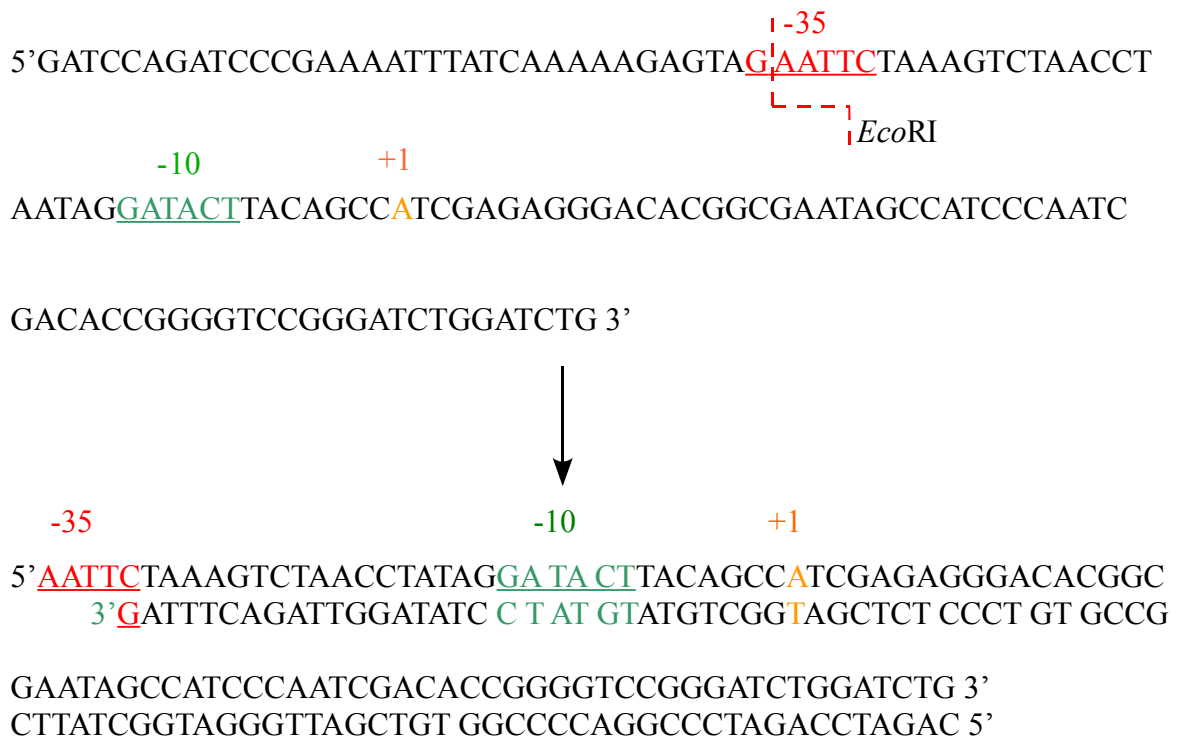
ścieżka 6 – DNA wyizolowany z kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/-10}$ trawionego enzymem *BgIII*

ścieżka 7 – DNA wyizolowany z kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/1/2-10}$ trawionego enzymem *BgIII*.

Trawienie zmodyfikowanych fragmentów promotorowego DNA w kompleksie binarnym z holoenzymem polimerazy RNA okazało się być skuteczne w każdym przypadku. Na ryc. 33 w ścieżce 3 oraz na ryc. 34 w ścieżce 3 i 4 widoczne są dwa prążki DNA o długościach 96 pz i 29 pz powstające w wyniku cięcia enzymem *EcoRI* fragmentów O_{-35} i $O_{-35/-10}$. Fragmenty te, odpowiadające cięciu wolnego DNA, widoczne są również na ścieżce 2. Wyniki te świadczą o tym, że DNA zawierający zmodyfikowany heksamer -35 w kompleksach z polimerazą RNA jest dostępny dla enzymu restrykcyjnego. Oznacza to, że w tym przypadku nie występuje bezpośredni, ścisły kontakt zmodyfikowanego heksameru -35 z polimerazą RNA. Również fragment O_{-10} (całkowicie zmieniony heksamer -10) oraz $O_{1/2-10}$, a także fragmenty $O_{-35/-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$ w kompleksie ulegają działaniu enzymu restrykcyjnego *BgIII*, dając w rezultacie fragment DNA odpowiadający długości około 70 pz (ryc. 33 ścieżka 6 i 8, ryc. 34 ścieżka 6 i 7). W tym przypadku nie można stwierdzić jednoznacznie, czy w kompleksie z polimerazą RNA związane są dwa fragmenty DNA będące produktem trawienia enzymem *BgIII*, czy też tylko jeden fragment. Cięcie DNA przez enzym restrykcyjny *BgIII* w kompleksach

binarnych świadczy o tym, że przyczyną małej efektywności tworzenia kompleksów obserwowanych w przypadku zmodyfikowanych promotorów O_{-10} i $O_{1/2-10}$ jest bardzo słabe oddziaływanie regionu -10 z polimerazą RNA (podjednostką σ polimerazy). W wyniku tego enzym nie może trwale związać sekwencji zlokalizowanej w regionie -10, nie może więc powstać zadowalająca ilość stabilnego wobec heparyny kompleksu binarnego (ryc. 28, 29).

W celu analizy potencjalnego wpływu niespecyficznych oddziaływań sekwencji DNA zlokalizowanej powyżej heksameru -35 na wiązanie polimerazy RNA wykorzystano fragment O_{-35} , który został tak zaprojektowany, że w regionie -35 znalazło się miejsce restrykcyjne dla enzymu *EcoRI*. Enzym ten tnąc DNA w obrębie heksameru -35 usuwa sekwencję zlokalizowaną powyżej regionu -35. Powinno to prowadzić do osłabienia oddziaływań niespecyficznych i zmniejszyć efektywność tworzenia kompleksów enzym-DNA. W celu realizacji tego założenia fragment O_{-35} , zawierający zmieniony region -35, trawiono enzymem *EcoRI* (patrz 4.4), generując fragment DNA przedstawiony na rysunku 35. Otrzymany fragment został nazwany O_{1-35} (ryc. 35).



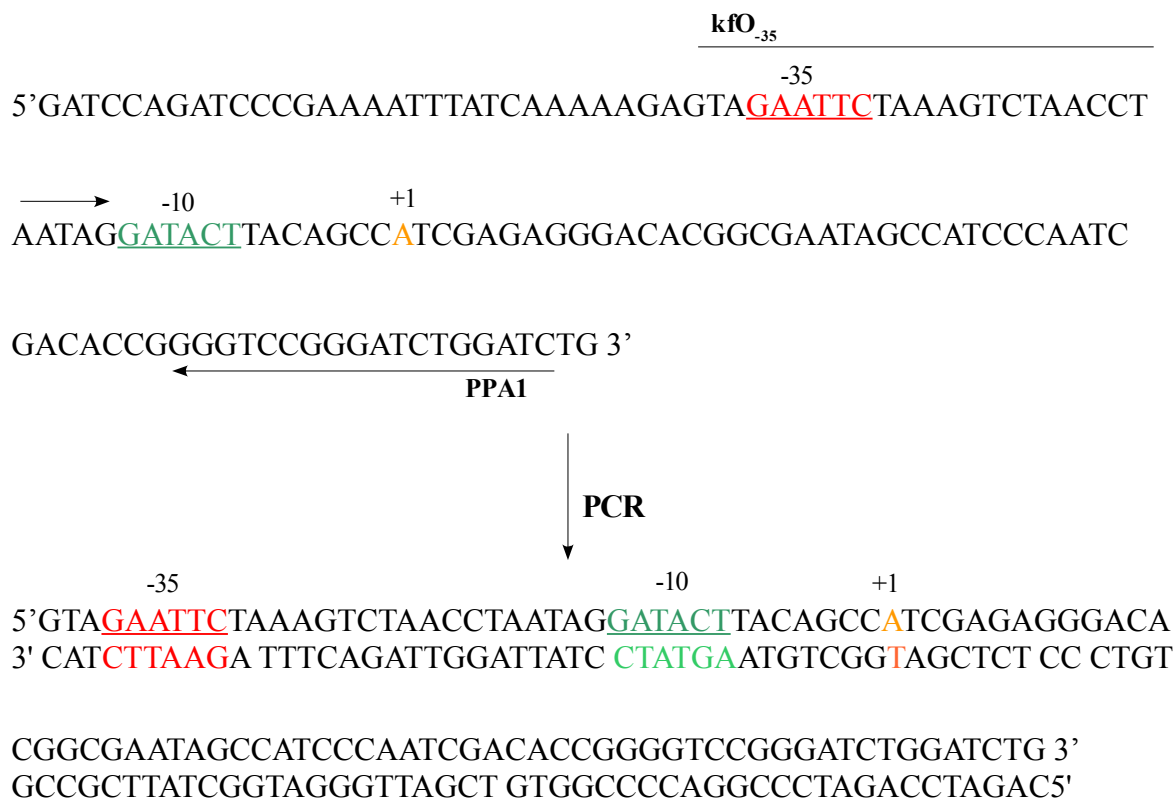
Ryc. 35. Schemat cięcia fragmentu O_{-35} (niemmatrycowa fragmentu DNA zawierającego zmieniony region -35) enzymem *EcoRI*. Poniżej dwuniciowy produkt cięcia.

Fragment ten wykazuje znacznie mniejszą efektywność tworzenia kompleksów binarnych z holoenzymem polimerazy RNA (ryc. 36). Sugeruje to, że niespecyficzne oddziaływania, odpowiedzialne za dużą efektywność tworzenia kompleksów binarnych przez fragment ze zmienionym heksamerem -35 (O_{-35}), zlokalizowane są powyżej heksameru -35, a nie w dolnej części promotora.



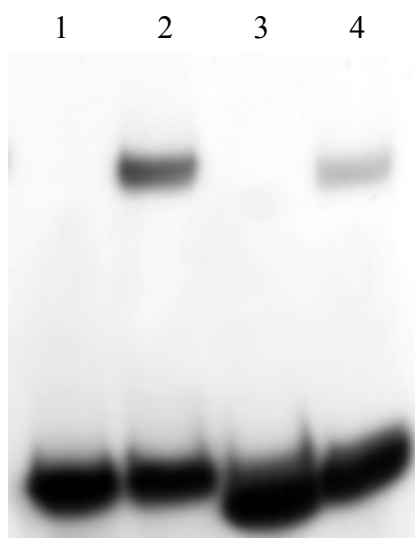
Ryc. 36. Autoradiografia przedstawiająca analizę kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA: O_{-35} i $O1_{-35}$ (fragment uzyskany w wyniku cięcia O_{-35} enzymem restrykcyjnym *EcoRI*). Kompleksy utworzono w obecności heparyny o stężeniu 1 mg/ml. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:
 ścieżka 1 – kompleks holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{-35}
 ścieżka 2 – kompleks holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O1_{-35}$

Aby wykluczyć możliwość, że osłabienie oddziaływań polimerazy RNA z fragmentem $O1_{-35}$, otrzymanym w wyniku działania enzymu restrykcyjnego *EcoRI* (ryc. 36) jest nie wynikiem odcięcia sekwencji zlokalizowanej powyżej regionu -35, lecz wynikiem upośledzenia funkcji heksameru -35 (powstał fragment krótszy o jedną zasadę w nici niematrixowej i częściowo jednoniciowy), wykonano eksperyment z całkowicie dwuniciowym fragmentem DNA. Fragment ten (kO_{-35}) zawiera nieuszkodzony, dwuniciowy heksamer -35 i 3 pz powyżej tego heksameru. Otrzymano go w wyniku reakcji PCR (patrz 4.1) z użyciem starterów kfO_{-35} i PPA1 (patrz 3.6) (ryc. 37).



Ryc. 37. Sposób otrzymywania fragmentu promotora A1 faga T7 zawierającego zmieniony region -35 – pozbawionego sekwencji powyżej heksameru -35 (powyżej zasady w pozycji -39); kfo₋₃₅ i PPA1 oznaczają startery wykorzystane w reakcji PCR. Poniżej dwuniciowy produkt reakcji PCR – fragment kO₋₃₅. W podobny sposób otrzymano drugi skrócony fragment promotora A1 faga T7 typu dzikiego.

Fragment ten wykorzystano do reakcji tworzenia kompleksów binarnych z holoenzymem polimerazy RNA i stwierdzono, że wykazuje on podobną aktywność w oddziaływaniach z polimerazą RNA jak częściowo jednoniciowy w regionie -35 fragment, otrzymany w wyniku działania enzymu restrykcyjnego *EcoRI* (ryc. 38).



Ryc. 38. Autoradiografia przedstawiająca analizę efektywności tworzenia kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA: O_{-35} (promotor A1 faga T7 zawierający całkowicie zmieniony region -35), kO_{-35} (fragment O_{-35} pozbawiony sekwencji zlokalizowanej powyżej zasad w pozycji -39, otrzymany w wyniku reakcji PCR) znakowanymi ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. W celu wyeliminowania oddziaływań niespecyficznych zastosowano heparynę o stężeniu 1 mg/ml. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących:

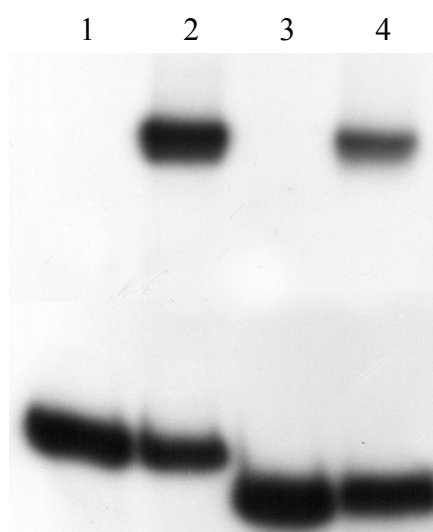
ścieżka 1 – fragment O_{-35}

ścieżka 2 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{-35}

ścieżka 3 – fragment kO_{-35}

ścieżka 4 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem kO_{-35}

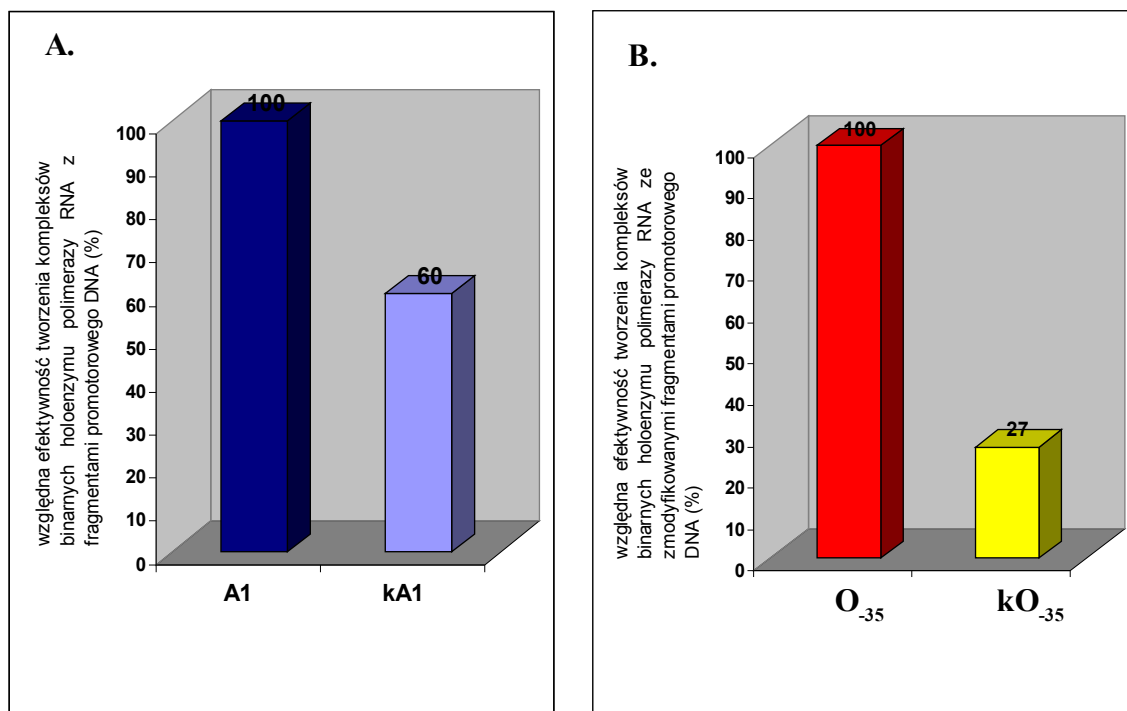
Świadczy to jednoznacznie, że dla tworzenia kompleksów z polimerazą RNA nie ma znaczenia czy skrócony fragment, w przypadku zmodyfikowanego heksameru -35, jest dwuniciowy, jednoniciowy, krótszy czy też dłuższy o 3 pz. Eksperymenty te pozwalają również wysunąć sugestię, że także w przypadku promotora A1 faga T7 typu dzikiego sekwencje zlokalizowane powyżej regionu -35 wnoszą znaczący wkład w tworzenie kompleksów binarnych. W celu doświadczalnej weryfikacji tej sugestii otrzymano za pomocą reakcji PCR (patrz 4.1), z użyciem starterów kfA1 i PPA1 (patrz 3.6), skrócony fragment promotora A1 (kA1) o identycznej długości jak fragment kO_{-35} . Fragment ten wykorzystano następnie do analizy tworzenia kompleksów z polimerazą RNA. Wynik doświadczenia przedstawia ryc. 39.



Ryc. 39. Autoradiografia przedstawiająca analizę efektywności tworzenia kompleksów binarnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA: A1 i kA1 (promotor A1 faga T7 pozbawiony sekwencji powyżej zasady w pozycji -39) znakowanymi ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. W celu wyeliminowania oddziaływań niespecyficznych zastosowano heparynę o stężeniu 1 mg/ml. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:
ścieżka 1 – fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7
ścieżka 2 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z A1
ścieżka 3 – fragment kA1
ścieżka 4 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem kA1

Również w tym przypadku kompleksy z polimerazą RNA tworzone są z mniejszą efektywnością, stanowiącą około 60 % aktywności promotora A1 typu dzikiego o długości 130 pz.

Analizę ilościową kompleksów przedstawionych na rysunkach 38 i 39 przeprowadzono stosując program komputerowy Gel Scan ver. 1.13 (ryc. 40).



Ryc. 40. Porównanie względnej efektywności tworzenia kompleksów holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA: A1, kA1 oraz O₋₃₅, kO₋₃₅. Cyfry powyżej słupków oznaczają ilość powstałego kompleksu w odniesieniu do A1 (wykres A) lub O₋₃₅ (wykres B).

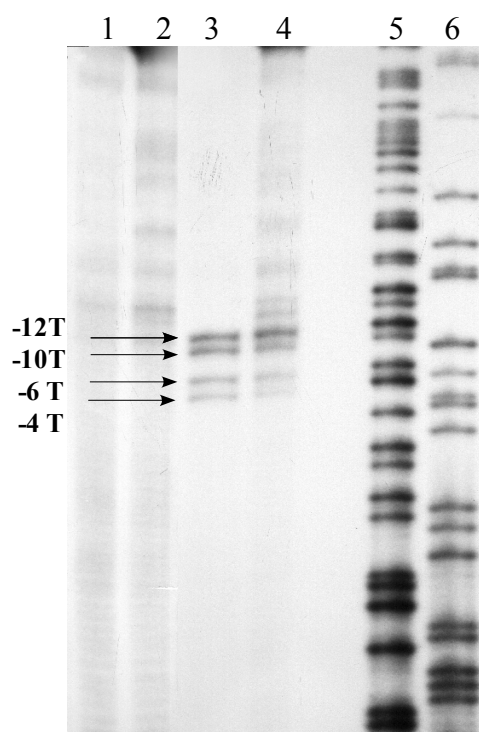
Z zestawienia na ryc. 40 wynika, że usunięcie sekwencji zlokalizowanej powyżej heksameru -35 powoduje znaczące zmniejszenie efektywności tworzenia kompleksów zarówno w przypadku promotora typu dzikiego, jak i promotora ze zmodyfikowaną sekwencją -35. W tym drugim przypadku jest to jednak efekt znacznie silniejszy, stanowiący około 73 % aktywności fragmentu DNA o pełnej długości (O₋₃₅). Oznacza to również, że zmniejszenie efektywności tworzenia kompleksów binarnych w stosunku do promotora typu dzikiego spada do wartości zbliżonej do 10 %, a więc do poziomu niespecyficznego oddziaływania DNA z białkiem. Świadczy to również o addytywnym efekcie sekwencji zlokalizowanej powyżej regionu -35 i heksameru -35 w tworzeniu kompleksów binarnych. Skrócenie fragmentu DNA zawierającego promotor A1 typu dzikiego powoduje, że swoją funkcję w stabilizacji kompleksu może nadal pełnić obecny w promotorze niezmieniony heksamer -35. Fragment O₋₃₅ jest pozbawiony heksameru -35, dlatego też usunięcie sekwencji powyżej tego regionu promotora, w dużo większym stopniu eliminuje zdolność tworzenia kompleksów binarnych.

5.2.3 Badanie rodzaju kompleksu binarnego tworzonego przez promotor A1 faga T7 zawierającego zmieniony region -35 (O₋₃₅) z holoenzymem polimerazy RNA *E. coli*.

Tworzenie kompleksów binarnych opornych na heparynę w szerokim zakresie stężeń (0.05-2.5 mg/ml) przez promotor A1 faga T7 zawierający zmieniony heksamer -35 sugeruje, iż są to kompleksy otwarte. W tych warunkach kompleksy zamknięte są wrażliwe na wysokie stężenia heparyny. Dodatkowym argumentem przemawiającym za tym, że kompleksy tworzone z fragmentem O₋₃₅ są kompleksami otwartymi jest utrzymywanie w kompleksie obu produktów cięcia DNA enzymem *EcoRI* (34 i 97 pz) (ryc. 33). Dłuższy fragment obejmujący sekwencję od -35 do +60 mógłby pozostać związany z polimerazą RNA, gdyby enzym obejmował DNA, zapewniając pełną protekcję w regionie -10, zgodnie z modelami kompleksu otwartego. W tych samych warunkach w kompleksie zamkniętym (jak wynika z obrazów protekcji DNA przed działaniem rodników hydroksylowych) jest tylko jedno miejsce kontaktu enzymu z zasadami regionu -10 i tylko po jednej stronie helisy DNA /125/. Kontakt ten byłby niewystarczający dla utrzymania tego fragmentu w kompleksie. Ponadto w temperaturze eksperymentu (37°C) zgodnie z kinetyką tworzenia kompleksów transkrypcyjnych, kompleks zamknięty jest jedynie krótko żyjącym stadium, który natychmiast przekształca się w kompleks pośredni i izomeryzuje następnie w kompleks otwarty. W temperaturze 37°C nie obserwuje się występowania stadiów poprzedzających kompleks otwarty. Przemawia za tym również zachowanie się kompleksów binarnych przy próbie transkrypcji (patrz 5.2.4).

Dla kompleksu otwartego charakterystyczne jest lokalne rozplecenie nici, które ma miejsce w obrębie regionu -10 /8, 58/. W wyniku rozdzielania nici w tym obszarze tworzy się pętla transkrypcyjna, która obejmuje pozycje od -11 do +3 (-12 do +2) /12, 64/. Rozstrzygającym dowodem na to, że obserwowane kompleksy polimerazy RNA z fragmentem DNA zawierającym zmieniony region -35 są kompleksami otwartymi, może być wykazanie, że w kompleksach tych obie nici DNA w regionie -10 są rozdzielone. Obecność jednoniciowych fragmentów DNA można stwierdzić stosując odczynniki chemiczne modyfikujące zasady w jednoniciowym DNA, np. nadmanganian potasu /84/. Nadmanganian potasu jest wysoce reaktywnym związkiem zdolnym do utleniania grup funkcyjnych wielu związków organicznych, włączając podwójne wiązania C=C. W przypadku analizy DNA, KMnO₄ utlenia podwójne wiązanie pierścienia aromatycznego tyminy w pozycji 5,6 do odpowiednich diglikoli. Reaktywność tych zasad w jednoniciowym DNA jest znacznie większa niż w dwuniciowym DNA /84/. Ta właściwość

nadmanganianu potasu pozwala na wykorzystanie tego związku w badaniach nad tworzeniem kompleksu otwartego. Aby stwierdzić czy DNA w kompleksie fragmentu promotorowego zawierającego całkowicie zmieniony region -35 ma charakter jednoniciowy, a tyminy regionu -10 wykazują zwiększoną reaktywność w stosunku do KMnO_4 , utworzony w 37°C kompleks polimerazy RNA z fragmentem O_{-35} modyfikowano nadmanganianem potasu (patrz 4.20). Jako kontrolę stosowano kompleksy holoenzymu polimerazy RNA z promotorem A1 faga T7 typu dzikiego. Zmodyfikowane fragmenty DNA wyizolowane z kompleksu analizowano w 8 % żelu sekwencyjnym (patrz 3.17.4; 4.20). Wyniki doświadczeń przedstawia ryc. 41.



Ryc. 41. Autoradiografia przedstawiająca wynik eksperymentu dotyczącego analizy dostępności tymin nici matrycowej promotorowego DNA w kompleksie binarnym z wykorzystaniem 1.5 mM KMnO_4 . Elektroforezę prowadzono w 8 % żelu sekwencyjnym w warunkach denaturujących:
 ścieżka 1 – fragment A1 faga T7 modyfikowany KMnO_4
 ścieżka 2 – fragment O_{-35} modyfikowany KMnO_4
 ścieżka 3 – fragment A1 faga T7 w kompleksie z holoenzymem polimerazy RNA modyfikowany KMnO_4
 ścieżka 4 – fragment O_{-35} w kompleksie z holoenzymem polimerazy RNA modyfikowany KMnO_4
 ścieżka 5 – wzorzec T uzyskany na drodze reakcji sekwencjonowania promotora A1 faga T7 (nie matrycowa)
 ścieżka 6 – wzorzec G uzyskany na drodze reakcji sekwencjonowania promotora A1 faga T7 (nie matrycowa)
 -12, -10, -6 i -4 oznaczają pozycje tymin nici matrycowej dostępnych dla KMnO_4 w kompleksie otwartym.

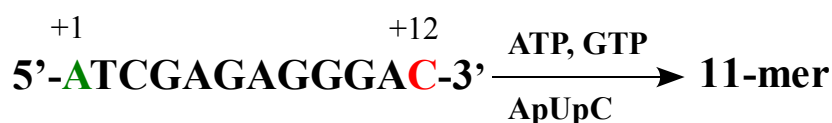
Wyniki eksperymentów z wykorzystaniem nadmanganianu potasu świadczą o tym, że zarówno w przypadku kompleksów holoenzymu polimerazy RNA z promotorem A1 faga T7 zawierającym całkowicie zmieniony region -35 jak i promotorem A1 faga T7 typu dzikiego, tyminy w pozycjach -12, -10, -6 i -4 są modyfikowane przez nadmanganian potasu. Natomiast kontrole, w których wykorzystano wolne dwuniciowe fragmenty promotorowego DNA (A1, O₋₃₅) wykazały brak reaktywności zasad tyminowych w tych pozycjach. Wyniki te są bezpośrednim dowodem na to, że kompleksy promotora A1 faga T7 typu dzikiego i zawierającego całkowicie zmieniony region -35, z holoenzymem polimerazy RNA, są kompleksami otwartymi.

5.2.4 Badanie aktywności kompleksu inicjacyjnego w procesie transkrypcji

W celu pełniejszej funkcjonalnej analizy uzyskanych konstruktów wykonano eksperymenty transkrypcji *in vitro* by stwierdzić, czy kompleksy uzyskane w wyniku wiązania holoenzymu polimerazy RNA do zmienionych promotorów (O₋₁₀, O_{1/2-10}, O₋₃₅, O_{-35/-10}, O_{-35/1/2-10}) są zdolne do przejścia do produktywnej fazy transkrypcji i syntezy RNA. Jeśli kompleksy te są aktywnymi kompleksami otwartymi to w czasie transkrypcji powinny przekształcić się z kompleksów binarnych w kompleksy potrójne. Kompleks potrójny jest to kompleks, w którym enzym polimeraza RNA pozbawiona jest podjednostki sigma i jest kompleksem trójskładnikowym (ang. *ternary complex*) zawierającym, oprócz DNA i enzymu, powstającą cząsteczkę RNA.

Transkrypcję *in vitro* prowadzono w warunkach limitowania substratów. Jeśli do reakcji transkrypcji użyto by wszystkich czterech nukleotydów (ATP, UTP, GTP i CTP) w obecności jonów magnezu i heparyny, polimeraza RNA osiągnęłaby koniec cząsteczki DNA, dając transkrypt typu *run off*, a kompleks DNA-polimeraza RNA uległby dysocjacji. Przeprowadzenie kolejnych rund transkrypcji, ze względu na obecność heparyny, byłoby niemożliwe. Prowadząc transkrypcję w sposób kontrolowany poprzez ograniczanie liczby nukleotydów, możemy uzyskać produkt RNA o pożądanej długości. W takich warunkach polimeraza RNA zatrzyma się w miejscu, w którym powinien być wbudowany brakujący nukleotyd. Kontrolując w ten sposób proces transkrypcji poprzez limitowanie substratów i zatrzymując transkrypcję w odpowiedniej pozycji, uzyskujemy tzw. „zatrzymane kompleksy”, które są kompleksami stabilnymi, jeżeli osiągną fazę produktywną (produkt RNA o długości minimum 9-10 nukleotydów).

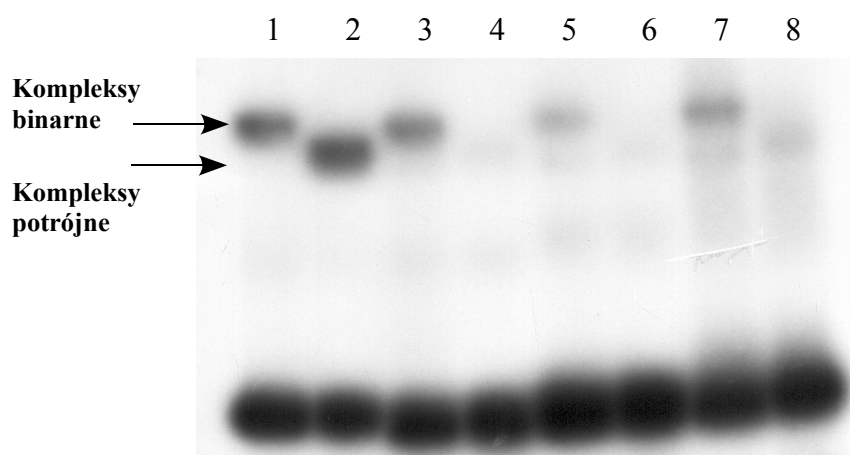
W pracy reakcję transkrypcji przeprowadzono, stosując starter ApUpC oraz dwa z czterech rybonukleotydów (ATP i GTP). W takich warunkach powstaje produkt RNA o długości 11 nukleotydów. Wynika to z sekwencji DNA promotora A1 faga T7, który w nici niematrixowej w pozycji od +1 (miejsce startu transkrypcji) do +12 zawiera następujące nukleotydy: 5'-ATCGAGAGGGAC-3'. W związku z tym, prowadząc reakcje transkrypcji w warunkach limitowania substratów, otrzymujemy RNA o długości 11 nukleotydów (ryc. 42).



Ryc. 42. Schemat reakcji transkrypcji w warunkach limitowania nukleotydów.

Powstający kompleks potrójny charakteryzuje się nieco większą od kompleksu binarnego ruchliwością elektroforetyczną. Wzrost ruchliwości kompleksu potrójnego w stosunku do kompleksów binarnych związany jest z jednej strony z usunięciem podjednostki sigma z holoenzymu, z drugiej zaś, ze wzrostem ładunku ujemnego nadawanego kompleksowi przez RNA, będącego produktem reakcji. Powstający potrójny kompleks widoczny jest na żelu dzięki znakowanemu na końcu 5' DNA, natomiast produkt RNA dzięki znakowanemu radioaktywnie starterowi ApUpC.

W limitowanej reakcji transkrypcji wykorzystano sześć kompleksów binarnych uzyskanych z fragmentami A1, O₋₁₀, O_{1/2-10}, O₋₃₅, O_{-35/-10}, O_{-35/1/2-10} (patrz 4.18). Kontrolę stanowił fragment DNA zawierający niezmienny promotor A1 faga T7. Wynik reakcji analizowano w 3.5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących (ryc. 43 i 44).



Ryc. 43. Autoradiografia przedstawiająca analizę elektroforetyczną kompleksów binarnych i potrójnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami A1, O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10}, znakowanymi radioaktywnym ³²P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

ścieżka 1 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem A1

ścieżka 2 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem A1

ścieżka 3 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O₋₃₅

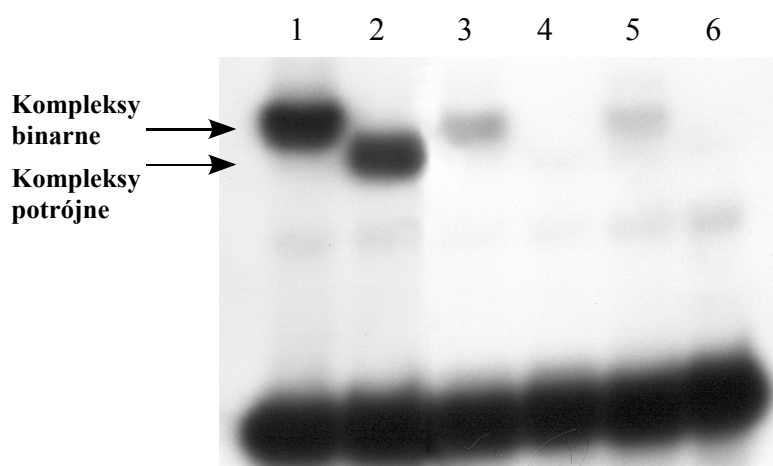
ścieżka 4 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O₋₃₅

ścieżka 5 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O₋₁₀

ścieżka 6 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O₋₁₀

ścieżka 7 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{1/2-10}

ścieżka 8 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem O_{1/2-10}



Ryc. 44. Autoradiografia przedstawiająca analizę elektroforetyczną kompleksów binarnych i potrójnych holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami A1, $O_{-35/1/2-10}$, $O_{-35/-10}$ znakowanymi radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej. Elektroforezę prowadzono w 3.5 % żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących:

ścieżka 1 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem A1

ścieżka 2 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem A1

ścieżka 3 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/1/2-10}$

ścieżka 4 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/1/2-10}$

ścieżka 5 – kompleks binarny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/-10}$

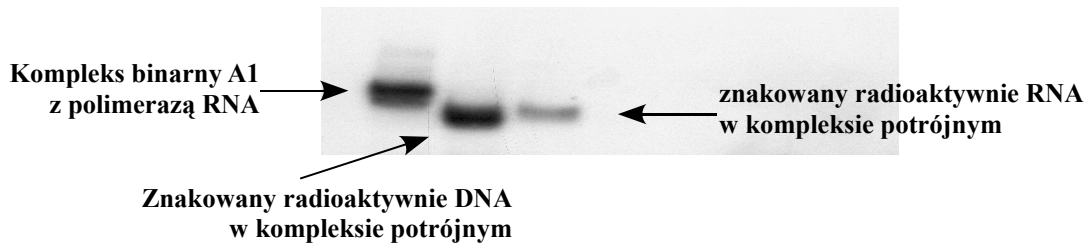
ścieżka 6 – kompleks potrójny holoenzymu polimerazy RNA z fragmentem $O_{-35/-10}$

Wyniki reakcji transkrypcji *in vitro* w warunkach limitowanych substratów (dla znakowanych radioaktywnie fragmentów DNA) analizowane w żelach poliakryloamidowych w warunkach niedenaturujących, wykazały we wszystkich przypadkach modyfikowanych promotorów jedynie śladowe ilości radioaktywności w pozycji odpowiadającej pozycjom kompleksów potrójnych, o wyraźnie większej ruchliwości elektroforetycznej (ryc. 43, ścieżki 4, 6, 8) w porównaniu do prążków kompleksów binarnych (ryc. 43, ścieżki 3, 5, 7). Prążki odpowiadające kompleksom potrójnym są lepiej widoczne przy długich czasach ekspozycji kliszy rentgenowskiej. Takie prążki odpowiadające pozycjom kompleksów potrójnych, wprawdzie o bardzo małej intensywności, powstały również w przypadku fragmentów zawierających całkowicie i częściowo zmieniony region -10. Natomiast fragmenty zawierające zmienione obydwa heksamery jednocześnie ($O_{-35/-10}$ i $O_{-35/1/2-10}$) praktycznie nie wykazują zaczernienia kliszy w tej pozycji. Należało oczekiwać, że fragmenty promotorowego DNA zawierające zmienione regiony -10 będą być może zdolne do tworzenia kompleksów binarnych, ale nie będą zdolne do transkrypcji, podobnie jak fragmenty zawierające zmienione heksamery -35 i -10 jednocześnie. Wszystkie kompleksy o większej ruchliwości elektroforetycznej

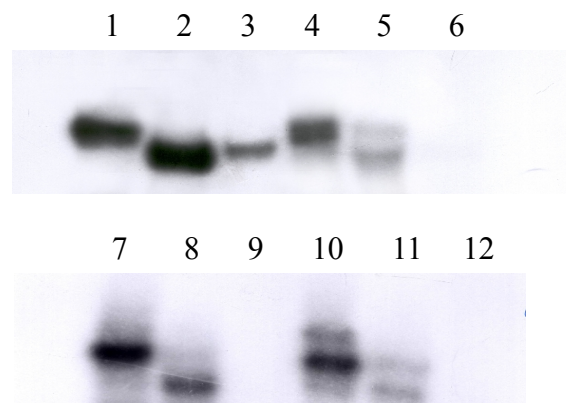
odpowiadające zmodyfikowanym promotorom są znacznie mniej intensywne od kompleksu potrójnego z fragmentem A1. Wydaje się, że bardzo słabe pasma obserwowane w pozycjach odpowiadających położeniu kompleksów potrójnych tworzonych przez zmodyfikowane w heksamerze -10 fragmenty promotorowe mogą być raczej “zanieczyszczeniami” pochodzącymi od kompleksów binarnych enzymu z DNA. Takie słabe prążki są widoczne na ścieżkach zawierających kompleksy binarne. Zastanawiający jest fakt, szczególnie dobrze widoczny w przypadku fragmentu O₋₃₅, że przy próbie transkrypcji zaczernienie kliszy znika z pozycji kompleksu binarnego, nie pojawia się jednak, lub jedynie w śladowej ilości, w pozycji kompleksu potrójnego. Gdyby chociaż część kompleksu binarnego przekształciła się w transkrybujący kompleks potrójny, to zmianie intensywności prążków odpowiadających kompleksom binarnym powinien towarzyszyć proporcjonalny wzrost natężenia prążków odpowiadających kompleksom potrójnym. W przypadku, gdy kompleks binarny całkowicie przekształci się w kompleks potrójny zaczernienie kliszy w pozycji kompleksu binarnego maleje do zera, a proporcjonalnie wzrasta zaczernienie kliszy w pozycji kompleksu potrójnego. Taka sytuacja ma istotnie miejsce w przypadku niezmienionego promotora A1 faga T7. Zanik kompleksów binarnych, w przypadku zmodyfikowanego w heksamerze -35 promotora A1 faga T7, i brak ich transformacji w kompleksy potrójne świadczy o tym, że podczas próby transkrypcji kompleksy inicjacyjne ulegają destabilizacji i rozpadowi.

Zdolność zmodyfikowanych fragmentów promotorowych do przeprowadzenia reakcji transkrypcji *in vitro* dodatkowo zweryfikowano w doświadczeniach, w których zastosowano znakowany radioaktywnie starter ApUpC, dający w wyniku reakcji znakowany produkt transkrypcji. Wyniki tych eksperymentów wykazały, że aktywnym transkrypcyjnie kompleksem jest jedynie kompleks holoenzymu polimerazy RNA z niezmienionym fragmentem promotora A1 faga T7 (ryc. 45, 46). W przypadku fragmentu DNA zawierającego zmieniony region -35, tylko przy długiej ekspozycji na kliszy rentgenowskiej zaobserwowano delikatny prążek odpowiadający produktowi RNA. Prążek ten nie jest jednak, ze względu na małą intensywność, widoczny na zdjęciu (ryc. 46, ścieżka 6). Z kolei w eksperymentach z fragmentami DNA zawierającymi całkowicie i częściowo zmieniony region -10 nie stwierdzono obecności produktu RNA (ryc. 46), nawet przy bardzo długiej ekspozycji kliszy rentgenowskiej (brak zaczernienia kliszy w ścieżkach 9 i 12). W przypadku promotora A1 faga T7 zawierającego częściowo zmieniony heksamer -10 pewna część radioaktywności z kompleksu binarnego pojawia się w pozycji kompleksu potrójnego (widoczna przy długiej ekspozycji na ryc. 46, ścieżka 8), co

mogłoby sugerować, że kompleks binarny jest zdolny do przejścia, z niską wydajnością, do produktywnej fazy transkrypcji. Jednak brak znakowanego produktu RNA (ścieżka 9) nie pozwala definitywnie stwierdzić, że transkrypcja w tym przypadku dochodzi do skutku. Wydaje się również, że w obu przypadkach promotorów zmienionych w regionie -10 ($O_{1/2-10}$ i O_{-10}) kompleksy binarne przy próbie transkrypcji stają się wrażliwe na heparynę.



Ryc. 45. Autoradiografia przedstawiająca wynik reakcji transkrypcji *in vitro* kompleksu binarnego promotora A1 faga T7 z holoenzymem polimerazy RNA. W reakcji wykorzystano radioaktywnie znakowany starter ApUpC, dający w rezultacie znakowany produkt RNA, lub znakowany fragment DNA zawierający promotor A1 faga T7.



Ryc. 46. Autoradiografia przedstawiająca analizę reakcji transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem znakowanego produktu RNA. Elektroforeza w 3.5 % żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących:

ścieżki 1,4,7,10 – kompleksy binarne holoenzymu polimerazy RNA z fragmentami DNA, odpowiednio A1, O_{-35} , $O_{1/2-10}$, O_{-10} znakowane radioaktywnym ^{32}P na końcu 5' nici matrycowej
 ścieżki 2,5,8,11 – kompleksy potrójne holoenzymu polimerazy RNA ze znakowanymi ^{32}P fragmentami odpowiednio A1, O_{-35} , $O_{1/2-10}$, O_{-10}

ścieżka 3 – produkt RNA w kompleksie potrójnym utworzonym przez polimerazę RNA związaną z promotorem A1 faga T7. Produkt RNA został uwidoczniony dzięki znakowanemu radioaktywnym ^{32}P starterowi ApUpC.

ścieżka 6 – śladowe ilości produktu RNA

ścieżki 9, 12 – brak produktu RNA

Na zdjęciu przedstawiono autoradiogram żelu poddanego bardzo długiemu czasowi ekspozycji.

6. DYSKUSJA

Momentem krytycznym w procesie transkrypcji jest etap inicjacji, w którym holoenzym polimerazy RNA (podjednostka sigma) specyficznie rozpoznaje dwa konserwowane ewolucyjnie regiony -35 i -10. Obok oddziaływań specyficznych z tymi heksamerami istnieje szereg oddziaływań niespecyficznych, wśród nich stosunkowo silne wiązanie polimerazy RNA do końców cząsteczki w formie liniowej, ale także wiązania do każdej innej, przypadkowej sekwencji w obrębie DNA. Te niespecyficzne oddziaływania ułatwiają polimerazie RNA szybsze odszukanie sekwencji promotora we wczesnych fazach inicjacji transkrypcji /152/. Wiadomo, że regiony -35 i -10 odgrywają istotną rolę w inicjacji transkrypcji i że są miejscem kontaktu z polimerazą RNA /135, 136, 23/, a wszelkie manipulacje w obrębie tych heksamerów powodują zmiany w powinowactwie polimerazy RNA do promotora i wpływają na siłę promotora /135, 160/. Rola regionu -35, jakkolwiek istotna dla wiązania enzymu, nie jest jednoznacznie określona. Natomiast uważa się, że region -10 jest głównie zaangażowany w proces separacji nici i tworzenia kompleksu otwartego. Na podstawie wcześniejszych badań można sądzić, że ranga obu heksamerów nie jest równocenna i że chociaż współdziałają ze sobą w wiązaniu polimerazy RNA to pełnione przez nie funkcje mogą być odmienne.

Bardzo silnym argumentem na kluczową rolę regionu -35 w tworzeniu kompleksu promotora z polimerazą RNA są wyniki uzyskane w pracy, w której wykorzystano technikę interferencji rodników hydroksylowych (ang. *radical interference*) /156/. Metoda ta polega na działaniu wolnymi rodnikami hydroksylowymi na dwuniciowy promotorowy DNA. Rodniki działają na cząsteczkę DNA, usuwając losowo z jednej nici pojedynczy nukleozyd, uszkadzając w ten sposób DNA i eliminując ewentualne miejsce kontaktu z polimerazą RNA /55, 133, 147/. Z pracy tej wynika, iż delecje nukleozydów w obrębie sekwencji promotorowej wpływają w znaczący i zróżnicowany sposób na powinowactwo enzymu do promotora, obniżając je istotnie w odniesieniu do regionu -35. Analizy wpływu delecji w szerszym kontekście sekwencji promotorowej wskazują jednak, że w zależności od pozycji usuniętej zasady, następuje zwiększenie bądź znaczne zmniejszenie efektywności tworzenia kompleksu. Delecje w obrębie regionu -35 znacznie zmniejszyły powinowactwo polimerazy RNA do DNA. Natomiast delecje w heksamerze -10, nie tylko nie wpływają negatywnie na siłę wiązania, ale powodują nawet zwiększenie efektywności tworzenia kompleksu holoenzymu polimerazy RNA z promotorowym DNA.

Doświadczenie zostało przeprowadzone w temperaturze 4°C, w której polimeraza RNA nie tworzy stabilnego kompleksu otwartego z promotorowym natywnym DNA. Zwiększone powinowactwo enzymu do DNA w tym regionie wynika więc prawdopodobnie ze zwiększonej giętkości torsyjnej cząsteczki DNA na skutek delecji pojedynczego nukleozydu, co prawdopodobnie umożliwia DNA przybranie odpowiedniej, korzystnej konformacji i utworzenie stabilnego kompleksu otwartego, nawet w 4°C /156/. Możliwe jest także, że zarówno negatywny jak i pozytywny efekt delecji nukleozydu obserwowany dla różnych regionów promotorowego DNA jest wynikiem anizotropowego załamania DNA powstającego w wyniku delecji /51/.

W innych pracach, w których wprowadzano mutacje w obrębie regionu -35, poprzez substytucje pojedynczych nukleotydów wykazano również, iż manipulacje w tym heksamerze prowadzą do znacznego spadku powinowactwa polimerazy RNA do promotora, ale także wpływają na szybkość izomeryzacji kompleksu zamkniętego w otwarty /66, 141/. Podstawienia w pozycji -32 promotora *lac* UV5 spowodowało znaczne zmniejszenie powinowactwa polimerazy RNA do DNA niezależnie od tego, jaką zasadą zastąpiono cytozynę. Natomiast podstawienie zasady -34G na A lub C spowodowało spadek zarówno powinowactwa enzymu do DNA, jak i zdolności tworzenia kompleksu otwartego /66/.

Niejednoznaczne i niekiedy sprzeczne wyniki eksperymentów skłaniają do postawienia pytań o fundamentalnym znaczeniu dla zrozumienia procesu inicjacji transkrypcji jaka jest rola regionów -35 i -10 oraz jaki wnoszą one wkład w oddziaływanie z polimerazą RNA. Należy także odpowiedzieć na pytania, czy oba heksamery w równym stopniu odpowiadają za wiązanie polimerazy RNA, czy też któryś z heksamerów jest ważniejszy, czy może istotną rolę odgrywają tutaj wiązania niespecyficzne, a także w jaki sposób modyfikacje w obrębie tych regionów będą wpływały na te oddziaływania.

Ważnym elementem pracy był wybór odpowiednio silnego promotora, dającego stabilne kompleksy z białkiem. Takim promotorem jest promotor A1 bakteriofaga T7, który tworzy bardzo stabilne kompleksy w szerokim zakresie stężeń soli i temperatury /125/. Jest to jeden z najsilniejszych znanych promotorów.

Analiza fragmentów DNA zawierających zmienione heksamery -35 i -10, pod względem ich zdolności do tworzenia kompleksów binarnych wykazała, że te zmienione fragmenty promotorowe wykazują zmniejszone powinowactwo do polimerazy RNA w stosunku do niezmienionego promotora A1 faga T7. Jednakże efekt ten jest różny w zależności od tego, który z heksamerów modyfikowano, a także jaki typ zmian

wprowadzano do sekwencji heksamerów. Wydaje się, że całkowita zmiana sekwencji DNA w regionie -35 nie ma tak dużego wpływu na oddziaływanie z polimerazą RNA jak zmiana w regionie -10. Z eksperymentów wynika, że nawet częściowa zmiana w heksamerze -10 (zmienione zasady -10, -9, -8) przy niezmienionej części "górnej" tego regionu (zasady -13, -12 i -11), powoduje znaczne osłabienie oddziaływania, aż o około 70%. Wszystkie doświadczenia przeprowadzane były w obecności heparyny, w związku z tym można sądzić, że kompleksy, które powstają w tych warunkach to stabilne kompleksy promotorowego DNA z polimerazą RNA, być może o charakterze kompleksów pośrednich lub otwartych. Szczególną cechą kompleksu otwartego jest jego oporność na wysokie stężenia heparyny. Oznacza to, że polimeraza RNA musi być prawidłowo zlokalizowana w sekwencji promotora, a nie w innej, przypadkowej sekwencji lub na końcach cząsteczki DNA.

Wyniki eksperymentów tej pracy wskazują na zasadnicze różnice w stosunku do wyników i wniosków uzyskanych za pomocą metody, w której wykorzystano interferencję rodników hydroksylowych (ang. *radical interference*) /156/. W pracy tej sugerowano, że dominującą rolę w funkcji promotora pełni heksamer -35 /156/. Jednakże metoda interferencji rodników ujawnia inne aspekty funkcjonowania regionów promotora, niż oddziaływanie sekwencji promotorowej w natywnym, nieuszkodzonym DNA. W eksperymentach z zastosowaniem rodników hydroksylowych wykazano, że usunięcie pojedynczego nukleozydu w obrębie heksameru -35 powodowało efekt widoczny tylko dla nici matrycowej i polegał na eliminacji takiego DNA z kompleksu. Takiego efektu nie wykazywała nić niemmatrycowa, co świadczy o tym, że wkład każdej z tych nici w tym regionie jest asymetryczny. Ponadto, jeżeli usunięcie nukleozydu z tej części nici niemmatrycowej, a więc uszkodzenie regionu -35, nie wpływa negatywnie na tworzenie kompleksu może to oznaczać, że w wiązaniu heksameru -35 przez polimerazę RNA przez zaangażowana jest tylko nić matrycowa. Natomiast w przypadku nici niemmatrycowej, jeśli w ogóle bierze ona udział w wiązaniu enzymu, znaczenie ma nie określona sekwencja heksameru, ale inne niż wysoce specyficzne oddziaływania między białkiem i DNA. Rzeczywiście, eksperymenty ze zmienionym regionem -35 (ryc. 28) wykazały, że nawet całkowita zmiana sekwencji -35, nie ma bardzo istotnego znaczenia dla tworzenia kompleksów binarnych. Całkowita zamiana sekwencji promotora regionu -35 powoduje zmniejszenie efektywności tworzenia kompleksów o około 35-45 %. Istotne jest również to, że modyfikując ten heksamer, zmieniono jego sekwencję, ale sumaryczna ilość wiązań wodorowych pozostała niezmienną. Z energetycznego punktu widzenia sekwencje

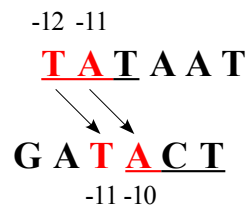
regionu -35 w niezmienionym promotorze A1, jak i zmienionym fragmencie O₋₃₅ są równocenne. Ten słaby efekt modyfikacji potwierdza zatem sugestie wynikające z analiz interferencyjnych, na podstawie których można stwierdzić, że delecja nukleozydu w regionie -35 nici niematrixowej nie wywiera negatywnego efektu na wiązanie polimerazy RNA niezależnie od tego, jaką pozycję zajmował usuwany nukleozyd. Brak wyraźnego związku efektu delekcji i jej lokalizacji, w przypadku nici matrycowej, przemawia za czysto fizycznymi efektami wpływającymi na tworzenie kompleksu binarnego z DNA poddanym działaniu rodników hydroksylowych, a nie osłabieniem specyficznych oddziaływań białko-DNA. Sugeruje to, że znaczny wkład w stabilność kompleksu mogą wносить oddziaływania niespecyficzne, w tym również również niespecyficzne oddziaływania regionu -35. Dobitnie przemawia za tym również fakt, że skrócone fragmenty DNA pozbawione sekwencji powyżej regionu -35, uzyskane w wyniku reakcji PCR lub poprzez cięcie enzymem *EcoRI* (odpowiednio fragmenty kO₋₃₅ i O1₋₃₅), wykazują znacznie mniejszą zdolność wiązania polimerazy RNA (około 10-15%) (ryc. 36, 38 i 40). Jest to prawdopodobnie wynikiem osłabienia niespecyficznych wiązań wnoszonych przez część promotora położoną powyżej regionu -35. Także w przypadku skróconego fragmentu DNA zawierającego promotor A1 faga T7 typu dzikiego (kA1) zaobserwowano spadek efektywności tworzenia kompleksów binarnych (ryc. 39, 40). Może to sugerować addytywny wkład sekwencji zlokalizowanej powyżej heksameru -35 i regionu -35 w oddziaływaniu z polimerazą RNA przy tworzeniu kompleksów binarnych. Stosunkowo wysoka efektywność (około 60%) tworzenia kompleksów binarnych w przypadku skróconego promotora A1 faga T7 typu dzikiego świadczy, że w stabilizację takiego kompleksu ma w dalszym ciągu wkład niezmodyfikowany heksamer -35. Natomiast w przypadku fragmentu O₋₃₅, zawierającego całkowicie zmieniony region -35, usunięcie całej sekwencji powyżej tego heksameru powoduje drastyczny spadek aktywności (około 10-15% aktywności promotora A1 typu dzikiego), ponieważ brak jest ścisłych kontaktów z polimerazą RNA zarówno sekwencji zlokalizowanej powyżej regionu -35, jak i samego heksameru. Aktualne modele kompleksów binarnych polimerazy RNA z promotorowym DNA rzeczywiście zakładają, że DNA w kompleksie jest owinięte wokół białka (*wrapping*), wnosząc znaczący wkład w stabilizację kompleksu poprzez dodatkowe kontakty z polimerazą RNA, zlokalizowane powyżej regionu -35 [25, 117, 146]. Należy również podkreślić fakt, że niezależnie od tego czy skrócony fragment DNA ze zmienionym regionem -35, zawierał całkowicie dwuniciowy heksamer -35 (produkt reakcji PCR) czy też w większości jednoniciowy (efekt cięcia enzymem restrykcyjnym *EcoRI*),

efektywność tworzenia kompleksów binarnych była podobna (ryc. 36, ryc. 38). Może to sugerować brak ścisłego kontaktu polimerazy RNA ze zmodyfikowanym regionem -35. Jest to oczywiste w świetle eksperymentów poświęconych działaniu enzymu restrykcyjnego *EcoRI* na kompleksy binarne polimerazy RNA z fragmentami zawierającymi zmodyfikowany heksamer -35, w których wykazano, że sekwencja ta jest dostępna dla enzymu *EcoRI*, a więc nie ma bezpośredniego kontaktu enzymu ze zmodyfikowanym heksamerem. Taki ścisły kontakt polimerazy RNA z heksamerem -35 ma miejsce w promotorze *trp* *Salmonella typhimurium*, który w regionie -35 zawiera naturalnie występujące miejsce restrykcyjne dla enzymu *HincII*. W tym przypadku w kompleksie otwartym miejsce to nie jest dostępne dla enzymu restrykcyjnego /108/.

Podobne eksperymenty przeprowadzono w odniesieniu do zmienionych w obrębie heksameru -10 fragmentów promotorowych O_{-10} i $O_{1/2-10}$, wskazujących na odmienne niż w przypadku regionu -35 zachowanie się tych promotorów. W tym przypadku całkowita lub częściowa zmiana w sekwencji tego regionu w bardzo znaczny sposób osłabia wiązanie takiego DNA do polimerazy RNA (ryc. 28). Wszystkie wprowadzone zmiany ograniczały się do heksamerów, a więc nie dotyczyły sekwencji oddzielających regiony -35 i -10, ani nie wpłynęły na odległość tych heksamerów od miejsca startu transkrypcji (+1). Oba heksamery pozostały w typowej odległości dla niezmienionego promotora A1 (17 pz). Wykluczyć należy zatem, że przyczyny słabego wiązania polimerazy RNA przez fragmenty zawierające zmienione sekwencje -10, są wynikiem różnic w przestrzennej orientacji obu heksamerów. Analiza kompleksów binarnych z fragmentami O_{-10} i $O_{1/2-10}$ wskazuje, że zmiana „dolnej” części sekwencji heksameru -10 (zasady -10, -9, -8) zmniejsza efektywność tworzenia kompleksu o około 70 %. Dodatkowa zmiana zasad -13, -12, -11 (całkowicie zmieniony heksamer -10) zmniejsza efektywność tworzenia kompleksów tylko o dalsze 13%. Sugeruje to, że większy efekt wywiera modyfikacja „dolnej” części regionu, niż części „górnej”. Może to być odbiciem zróżnicowanej funkcji obu części tego heksameru w oddziaływaniu z enzymem. Sugestia ta wydaje się być sprzeczna z informacją, że kluczowe znaczenie mają zasady -12, -11, -10 heksameru -10 /37, 43, 44, 52, 85, 118/, które są zaangażowane w oddziaływania z aromatycznymi aminokwasami zlokalizowanymi w domenie 2.4 podjednostki sigma. Zasady te najprawdopodobniej w oddziaływaniach z polimerazą RNA „reprezentują” dwuniciowy DNA. Dolna część tego konsensusowego heksameru odgrywa zapewne mniejszą rolę w tworzeniu specyficznych oddziaływań jako dwuniciowy DNA, natomiast uczestniczy w stabilizacji kompleksu otwartego. Najprawdopodobniej proces „otwierania” DNA

zapoczątkowany zostaje w „górnjej” części heksameru -10 i rozszerza się w kierunku sekwencji „dolnej” (w kierunku miejsca startu transkrypcji) i obejmuje kolejne zasady tego heksameru /44, 85/. Można by więc oczekiwać, że zmiana w obrębie regionu -10 spowoduje dramatyczny efekt zarówno ze względu na osłabienie oddziaływań z dwuniciową determinantą heksameru, jak i upośledzenie wkładu jednoniciowego DNA, co istotnie wykazano.

Przeprowadzone w tej pracy eksperymenty sugerują, że dominującą rolą regionu -10 w funkcjonowaniu promotora jest jego funkcja w utrzymaniu „otwartego” DNA i tworzeniu pętli transkrypcyjnej. Mniejszą rolę w procesie inicjacji transkrypcji należałoby natomiast przypisać, w przypadku promotora A1, oddziaływaniom zasad -13, -12 i -11. Byłoby to sprzeczne z powszechnie akceptowanymi poglądami o dominującej roli trzech zasad -12, -11, -10 (A1 -13, -12, -11) w tworzeniu kompleksu otwartego. Mało prawdopodobne jest, że przyczyną tak silnego efektu związanego ze zmianą „dolnej” części heksameru -10 może być drastyczne zwiększenie stabilności dwuniciowej helisy DNA. Modyfikacja zasad -10, -9 i -8, mianowicie zastąpienie sekwencji ACT sekwencją GAG powoduje, że liczba wiązań wodorowych wzrasta tylko o jedno wiązanie tzn., że wkład liczby wiązań wodorowych w stabilizację nici DNA rośnie tylko nieznacznie (podstawienie CT zasadami AG z energetycznego punktu widzenia całkowicie się kompensuje). Jeśli więc ta część heksameru -10 promotora A1 stabilizuje DNA w formie „otwartej” przez mało specyficzne oddziaływania z białkiem, to mało prawdopodobne jest by zmiana taka tak drastycznie wpływała na tworzenia kompleksu binarnego. Sensowną propozycją wyjaśnienia tak silnego wpływu modyfikacji zasad -8, -9, -10 na wiązanie polimerazy RNA może być sugestia, że ma to związek z adeniną w pozycji -10 i jej zmianą na guaninę. Gdyby promotor A1 funkcjonował tak jak promotor konsensusowy TATAAT, to „dolna” trójka zasad heksameru -10 promotora A1 powinna wносить znacznie mniejszy wkład w wiązanie polimerazy niż „górnja” trójka zasad. W przypadku promotora A1, to jednak zmiana pierwszych trzech zasad heksameru od strony miejsca startu transkrypcji wywołuje osłabienie wiązania o około 70%, podczas gdy pozostała trójka osłabia je dodatkowo tylko o około 10-15% (ryc. 30). Jeśli więc poszukiwać elementu sekwencji promotorowej, który mógłby być odpowiedzialny za ten efekt, to powinna to być zasada zlokalizowana w dolnej części heksameru -10 promotora A1, a w szczególności adenina w pozycji -10. Przesunięcie heksameru konsensusowego z pozycji -12 - -7 do pozycji -13 - -8 dla promotora A1 generuje nową lokalizację silnie konserwowanej pary TA w położeniu -11, -10 promotora A1 (ryc. 47).



Ryc. 47. Schemat przedstawia położenie zasad regionu -10 w promotorze konsensusowym i odpowiadający mu układ zasad w tym regionie promotora A1 faga T7. Widoczne przesunięcie sekwencji -10 z pozycji -12 - -7 w promotorze konsensusowym do -13 - -8 w promotorze A1 faga T7, powoduje, że silnie konserwowany dinukleotyd TA jest przesunięty w stosunku do położenia TA w promotorze konsensusowym (-12,-11) i zajmuje pozycję -11,-10.

Kluczowa dla funkcjonowania sekwencji promotorowej adenina -11 promotora konsensusowego zajmuje obecnie pozycję -10 w promotorze A1 faga T7. Musi więc pełnić te same funkcje co adenina -11 promotora konsensusowego. Odpowiednie domeny polimerazy RNA rozpoznające pary TA (-12, -11) promotora konsensusowego, muszą ze względów stereochemicznych rozpoznać, w przypadku promotora A1, pary TA w pozycji -11, -10. W związku z tym zrozumiałą staje się fakt, że zmiana adeniny -10 promotora A1 wywołuje również drastyczne zmiany w funkcjonowaniu promotora, jak modyfikacja adeniny -11 promotora konsensusowego. Zmiana zasady -10 z A na G wpływa, w przypadku częściowo zmienionego heksameru -10 ($O_{1/2-10}$), nie tylko na rozpoznanie sekwencji promotorowej i „otwieranie” DNA, ale również na oddziaływanie zasad z aminokwasami podjednostki σ i stabilność kompleksu otwartego. Konsekwencją tego mogłoby być zatem brak ścisłego kontaktu zmodyfikowanego heksameru -10 z polimerazą RNA. W takim przypadku sekwencja *Bgl*II obecna w tym obszarze zmodyfikowanych promotorów, mogłaby być dostępna dla enzymu restrykcyjnego. Taki rezultat istotnie pokazano na ryc. 33 i 34, z którego wynika, że działanie enzymem *Bgl*II na kompleks binarny generuje fragment o długości około 70 pz. Na podstawie ryc. 33 i 34 nie można stwierdzić, czy oba fragmenty, powstające w wyniku działania enzymu *Bgl*II, pozostają nadal związane z polimerazą RNA, ponieważ długości tych fragmentów są zbliżone. Jednocześnie można stwierdzić, że również w przypadku częściowo zmienionego regionu -10, cięcie DNA w kompleksie ma miejsce. Wynik taki byłby zgodny z eksperymentami, w których pokazano, że mutacje w obrębie regionu -10 (-11/-12) promotora *trp* *Salmonella typhimurium* spowodowały znaczne zmniejszenie protekcji tego regionu przez polimerazę RNA, czyniąc go dostępnym dla enzymu restrykcyjnego /108/. Fakt, że enzym

restrykcyjny ma dostęp do sekwencji *Bgl*III (AGATCT; od pozycji -9 do -4) nie wyklucza możliwości, iż kompleks binarny, nawet o charakterze kompleksu pośredniego lub otwartego, z niską wydajnością jednak powstaje. Oznacza jedynie, że w takim przypadku ustala się stan równowagi, w którym przewagę ma ten typ kompleksu, w którym sekwencja -10 nie jest związana z enzymem. Wydajność tworzenia kompleksów w tym przypadku jest znacznie niższa niż ma to miejsce w przypadku promotora A1 typu dzikiego. Trudno jest zatem określić na drodze eksperymentalnej z jakim typem kompleksu mamy do czynienia.

Weryfikację założenia, że zmodyfikowane w heksamerach (-35 i -10) fragmenty promotorowe są związane w kompleksach binarnych o charakterze kompleksów otwartych, mogą stanowić próby transkrypcji przeprowadzone na zmodyfikowanych fragmentach promotorowego DNA. W eksperymentach tych transkrypcja prowadzona jest w kontrolowany sposób tak, by produktem reakcji był RNA o długości 11 zasad. Wynika to z sekwencji promotorowego DNA, który w regionie od +1 do +12 zawiera nukleotydy 5'ATCGAGAGGGAC3' (nić niematrycowa). W związku z tym, wykorzystując starter ApUpC oraz dwa z czterech nukleotydów, ATP i GTP, otrzymujemy transkrypt o długości 11 zasad, ponieważ reakcja transkrypcji zatrzymuje się przy nukleotydzie +12, czyli tym, którego brakuje w pozycji +12 rosnącego transkryptu. Należy również zaznaczyć, że transkrypcja jest przeprowadzana w obecności heparyny. Jeśli w mieszaninie reakcyjnej byłyby obecne wszystkie nukleotydy, mielibyśmy do czynienia z transkrypcją typu *run off*, polimeraza RNA osiągnęłaby koniec fragmentu DNA, kompleks polimeraza RNA-DNA uległby dysocjacji, a heparyna obecna w mieszaninie zapobiegłaby tworzeniu nowego kompleksu binarnego i nowej rundzie transkrypcji. Prowadziłoby to do zaniku radioaktywności w prążkach odpowiadających kompleksom binarnym i potrójnym. Kontrolując zatem proces transkrypcji poprzez limitowanie substratów i zatrzymując go w pozycji +11, uzyskujemy możliwość ilościowej analizy przechodzenia kompleksów binarnych w transkrybujące. W taki sposób wykonano transkrypcję z udziałem wszystkich zmodyfikowanych promotorów DNA i kontrolnego promotora A1 faga T7 (ryc. 43 i 44). Eksperyment przedstawiony na ryc. 43 dobitnie ilustruje różnice w transkrypcji pomiędzy zmodyfikowanymi fragmentami O₋₃₅, O₋₁₀, O_{1/2-10} i dzikim promotorem A1, znakomicie również uzupełnia wnioski uzyskane z pozostałych doświadczeń. Mianowicie uderzający jest fakt, że fragment O₋₃₅ (zawierający zmieniony region -35) bardzo efektywnie tworzy kompleksy binarne, natomiast charakteryzuje się bardzo niską skutecznością transkrypcji. W tym przypadku wydaje się, że zmieniona sekwencja -35 nie przeszkadza w tworzeniu

kompleksu otwartego, natomiast zawodzi we wczesnych fazach produktywnej transkrypcji. Analizując skuteczność przechodzenia kompleksu binarnego w kompleks potrójny w przypadku fragmentu O₋₃₅ i porównując to z zachowaniem się promotora typu dzikiego, można stwierdzić, że modyfikacja sekwencji -35 powoduje, że próba transkrypcji na tym promotorze prowadzi do znaczącego zmniejszenia całkowitej radioaktywności odpowiadającej kompleksom binarnym i potrójnym. W przypadku niezmodyfikowanego promotora A1 faga T7, cały radioaktywny DNA z kompleksu binarnego znalazł się w kompleksie potrójnym. Natomiast w przypadku promotora zawierającego zmienioną sekwencję regionu -35 obserwujemy całkowity zanik radioaktywności w pozycji kompleksu binarnego. Radioaktywność ta, jednak tylko w znikomej ilości, pojawia się w pozycji kompleksu potrójnego. Świadczy to jednoznacznie o tym, że promotor tego typu wykazuje znacznie zredukowaną zdolność do zainicjowania syntezy RNA, a kompleks binarny po dodaniu jonów Mg²⁺, nukleotydów oraz ApUpC staje się wrażliwy na heparynę i ulega rozpadowi. Może oznaczać to, że transformacja kompleksu binarnego w kompleks potrójny zostaje zatrzymana na którymś z dyskretnych stadiów pośrednich tej transformacji, wrażliwym na działanie heparyny. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika zatem wniosek o fundamentalnym znaczeniu dla funkcjonowania promotora. A mianowicie zmiana sekwencji heksameru -35 tylko w niewielkim stopniu upośledza funkcjonowanie promotora na jednym z wczesnych stadiów inicjacji, tj. tworzenia kompleksów najpierw zamkniętego, a następnie otwartego. W radykalny sposób zmniejsza jednak prawdopodobieństwo zajścia dalszych etapów inicjacji transkrypcji działając na którymś z dalszych dyskretnych stadiów tego procesu.

Fakt, że kompleks utworzony z fragmentem pozbawionym konsensusowej sekwencji -35 jest bardzo stabilny wobec heparyny sugeruje, że jest to kompleks otwarty. Przemawia za tym również wynik trawienia kompleksu z polimerazą RNA enzymem restrykcyjnym *EcoRI* (ryc. 33). Fakt, że sekwencja ta w obrębie heksameru -35 jest dostępna dla enzymu restrykcyjnego, i że oba produkty trawienia o długościach 104 i 29 pz pozostają związane w kompleksie świadczy o tym, że DNA ma ścisły kontakt z białkiem w regionach położonych poza heksamerem -35. Krótszy fragment DNA (29 pz) pozostaje silnie związany z sekwencją zlokalizowaną powyżej regionu -35 promotora, natomiast „dolny” fragment (104 pz) z sekwencją poniżej heksameru -35. Gdyby kompleks ten był kompleksem zamkniętym, to pod wpływem heparyny natychmiast uległby rozpadowi, a słaba protekcja poniżej regionu -35 /125/ sugeruje, że uwolniony zostałby dłuższy fragment DNA. Ta część promotora w kompleksie zamkniętym wykazuje tylko dwa

ograniczone miejsca protekcji DNA. Dłuższy fragment DNA powstający w wyniku działania enzymu *EcoRI* może pozostać związany w kompleksie tylko wówczas, jeśli enzym obejmowałby całkowicie DNA, zapewniając pełną protekcję typową dla kompleksu otwartego /125/. Kolejnym argumentem, że musi to być kompleks bardziej zaawansowany w procesie inicjacji transkrypcji niż zamknięty, są analizy kinetyczne i strukturalne stadiów pośrednich transkrypcji /87, 125/, które wykazały, że w temperaturze 37°C mogą egzystować jedynie stabilne wobec heparyny kompleksy otwarte. W takim przypadku zarówno kompleks zamknięty jak i kompleks pośredni są szybko izomeryzującymi w kompleks otwarty stadiami pośrednimi. Również próba transkrypcji, po dodaniu jonów Mg^{2+} i nukleotydów sugeruje, że musi to być kompleks otwarty, podejmujący próbę transkrypcji, bo tylko w takim przypadku destabilizacja kompleksu binarnego i brak transformacji w kompleks potrójny jest uzasadniona. Ostatecznym i rozstrzygającym dowodem na to, że zmodyfikowany w heksamerze -35 promotor A1 faga T7 tworzy z polimerazą RNA kompleks otwarty jest reakcja modyfikacji niesparowanych reszt tyminy promotorowego DNA pod wpływem $KMnO_4$. W eksperymentach tych pokazano, że zmieniony w regionie -35 promotor, podobnie jak i promotor A1 typu dzikiego, wykazuje modyfikacje reszt tyminowych w pozycjach -12, -10, -6 i -4. Kontrolny dwuniciowy DNA, w tych samych warunkach, nie ulega działaniu $KMnO_4$.

Z eksperymentów wykonanych na zmodyfikowanym w heksamerze -35 promotorze A1 faga T7 wynika, że najważniejszą funkcją tego heksameru jest zatem nie samo wiązanie polimerazy RNA do promotorowego DNA i w efekcie tworzenie kompleksu otwartego, ale przeprowadzenie kompleksu przez wczesną fazę syntezy pierwszych wiązań fosfodiesterowych tworzącego się transkryptu i transformację w kompleks elongacyjny. Eksperymenty te przeczą hipotezie, że wiązanie polimerazy RNA do obu heksamerów, wprowadza do DNA takie zmiany strukturalne, które wykorzystując szczególne właściwości powstałego kompleksu, umożliwiają otwarcie DNA w obszarze pętli transkrypcyjnej i utworzenie tym samym kompleksu otwartego. W naszym przypadku kompleks otwarty powstaje w wyniku współdziałania nie obu heksamerów -10 i -35, lecz tylko heksameru -10 i oddziaływań niespecyficznych w regionie -35, a zwłaszcza niespecyficznych oddziaływań sekwencji zlokalizowanej powyżej tego heksameru.

Eksperymenty te wskazują, że nie tylko ranga obu heksamerów jest różna w procesie wiązania polimerazy RNA i transkrypcji, ale każda z tych sekwencji ważnych dla promotora pełni odmienne i uzupełniające się funkcje. Heksamer -10 jest bezwzględnie konieczny zarówno do wiązania polimerazy RNA jak i wszystkich kolejnych etapów

transkrypcji. Ma to związek z wysoce specyficznymi oddziaływaniami białko-DNA niezbędnymi do stabilizacji kompleksu otwartego i przede wszystkim z funkcją otwierania DNA na etapie tworzenia kompleksu otwartego /156/. Natomiast rola regionu -35 wydaje się mieć raczej charakter „ilościowy”, niezbędny do zapewnienia odpowiedniej stabilności kompleksu na etapie transformacji kompleksu binarnego w potrójny. Zastąpienie heksameru -35 całkowicie inną sekwencją zapewnia, dzięki oddziaływaniom niespecyficznym, powstanie wystarczająco trwałego kompleksu binarnego, natomiast nie zapewnia trwałego kontaktu tej sekwencji z odpowiednią domeną polimerazy RNA podczas przemieszczania się domen względem siebie, w czasie tworzenia przejściowych, nietrwałych kompleksów związanych z wczesnymi stadiami syntezy RNA. Zbyt słabe oddziaływania zmodyfikowanego heksameru -35 z odpowiednią domeną polimerazy RNA powoduje przy próbie transkrypcji zerwanie tego kontaktu i ekspozycję podjednostki β' na heparynę, co prowadzi do dysocjacji kompleksu. Jest to pierwsze, niezależne (inne niż analiza abortywnych produktów transkrypcji) /90/ potwierdzenie hipotezy Straneya i Crothersa o występowaniu stadium zwanego *stressed intermediate* we wczesnej fazie inicjacji transkrypcji /140/. Stadium to jest wynikiem przemieszczania się domen polimerazy RNA w fazie poprzedzającej powstanie kompleksu elongacyjnego.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują również, iż w pierwszej fazie inicjacji transkrypcji, tzn. na etapie lokalizacji promotora i tworzenia kolejnych kompleksów inicjacyjnych, ważniejszą rolę odgrywa sekwencja zlokalizowana powyżej regionu -35, a nie sama sekwencja -35. Fragment DNA zawierający całkowicie zmieniony heksamer -35 jest zdolny do tworzenia kompleksów z polimerazą RNA do stadium kompleksu otwartego włącznie. Naturalną konsekwencją tego faktu jest stwierdzenie, że rozpoznanie promotora ma charakter sekwencyjny, w którym dominującą rolę odgrywa sekwencja zlokalizowana powyżej heksameru -35, a nie sam region -35. Sugestia ta znalazła już potwierdzenie w wykonanych ostatnio analizach kinetyki wiązania polimerazy RNA z promotorem A1 faga T7 z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego (ang. *time-resolved x-ray-generated hydroxyl radical footprinting*) /126/.

7. STRESZCZENIE

Inicjacja transkrypcji jest procesem, w którym holoenzym polimerazy RNA specyficznie wiąże się do sekwencji promotorowych tworząc kompleks zamknięty, który przez stadia pośrednie izomeryzuje w kompleks otwarty, zdolny do zainicjowania produktywnej fazy transkrypcji. Istotną rolę odgrywają na tym etapie specyficzne oddziaływania z heksamerami -35 i -10, a także oddziaływania niespecyficzne z regionem zlokalizowanym powyżej rdzenia promotora oraz innymi sekwencjami. Rola heksamerów w poszczególnych etapach inicjacji transkrypcji była szeroko badana, jednakże ich ranga i wkład w oddziaływania z holoenzymem polimerazy RNA nie zostały definitywnie określone. Dotychczasowe prace, w tym również ostatnie analizy wykorzystujące matryce widełkowe (ang. *fork junction*), dotyczą roli poszczególnych zasad w funkcjonowaniu promotora. Nie zbadano natomiast jaki wpływ na oddziaływanie z polimerazą RNA, na poszczególnych etapach inicjacji transkrypcji, miałyby zmiany całych sekwencji konsensusowych. W związku z tym, za pomocą metod inżynierii genetycznej, skonstruowano fragmenty promotorowego DNA, będące pochodną silnego promotora A1 faga T7, zawierające zmienione heksamery -35 i -10. Przeprowadzono analizy funkcjonalne zmodyfikowanych fragmentów promotorowych, sprawdzając ich zdolność do tworzenia kompleksów binarnych z polimerazą RNA oraz analizując efektywność przechodzenia kompleksów binarnych w kompleksy potrójne charakterystyczne dla produktywnej fazy transkrypcji. Stwierdzono, że fragment promotorowego DNA zawierający zmodyfikowany region -35 (fragment O₋₃₅) bardzo efektywnie tworzy kompleksy binarne o charakterze kompleksów otwartych, nie jest natomiast zdolny do syntezy RNA i przy próbie transkrypcji ulega rozpadowi. Promotory o zmienionych całkowicie i częściowo sekwencjach regionu -10 tworzą z niską wydajnością odporne na heparynę kompleksy binarne, które podobnie jak fragment promotorowy, zawierający zmodyfikowany heksamer -35, nie są zdolne do transkrypcji *in vitro*. Jeżeli w tym przypadku tworzą się kompleksy binarne bardziej zaawansowane niż kompleksy zamknięte, to są one mało stabilne i pozostają w równowadze ze stadium poprzedzającym kompleksem zamkniętym lub pośrednim.

Eksperymenty z próbami cięcia DNA w kompleksach za pomocą enzymu *EcoRI* (cięcie w regionie -35) i *BglII* (cięcie w heksamerze -10) świadczą o tym, że DNA jest dostępny dla enzymu restrykcyjnego i że przyczyną, która uniemożliwia powstanie

kompleksów otwartych (w przypadku fragmentów zawierających zmieniony heksamer-10) i przeprowadzenie kompleksów binarnych w kompleksy elongacyjne (w przypadku fragmentów zawierający zmieniony region -35), jest brak stabilnych kontaktów z białkiem.

Efektywne tworzenie kompleksów binarnych w przypadku, gdy zmieniono sekwencję heksameru -35, świadczy o dużej roli oddziaływań niespecyficznych w regionie promotora. Miarą niespecyficznych oddziaływań polimerazy RNA z fragmentami promotorowymi mogą być wyniki analiz zdolności tworzenia kompleksów binarnych polimerazy RNA z fragmentami promotorowego DNA zawierającymi równocześnie zmienione obydwie heksamery, które wykazują jednak pewną zdolność tworzenia kompleksów binarnych (około 10% aktywności promotora A1).

Z pracy wynika, że sekwencja regionu -35 odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu promotora, jednak na etapie rozpoznania promotora może być zastąpiona sekwencją niespecyficzną, bez szkody dla efektywności tworzenia kompleksu zamkniętego i otwartego. Natomiast brak tej sekwencji znacznie zmniejsza szanse na przejście takich kompleksów w kompleksy transkrybujące. Świadczyć to może o tym, że w odniesieniu do promotora A1 faga T7, najważniejszą rolą regionu -35 nie jest samo związanie polimerazy RNA, lecz przeprowadzenie kompleksu otwartego przez następne fazy inicjacji transkrypcji. Jest to sprzeczne z hipotezą, która mówi, że do związania polimerazy RNA i utworzenia kompleksu otwartego niezbędne są dwa heksamery, -35 i -10. W tym wypadku funkcję całkowicie zmienionego heksameru -35 w wiązaniu polimerazy RNA i otwieraniu DNA przejmuje sekwencja zlokalizowana powyżej regionu -35. Usunięcie tej sekwencji powoduje znaczny spadek efektywności wiązania polimerazy RNA do promotora i tworzenia kompleksu otwartego.

Szczegółowa analiza przyczyn defektu związanego z transformacją kompleksu otwartego, utworzonego przez fragment DNA zawierający całkowicie zmieniony region -35, w elongacyjny i upośledzenie syntezy RNA sugeruje, że ma to związek z osłabieniem oddziaływań specyficznych w obrębie regionu -35. Prowadzi to do zerwania kontaktów z holoenzymem polimerazy RNA, destabilizacji i rozpadu kompleksu we wstępnej fazie produktywnej transkrypcji. Jest to pierwszy eksperymentalny dowód (inny niż analiza abortywnych produktów transkrypcji) potwierdzający hipotezę Straneya i Crothersa, która mówi o tzw. napięciu stanu pośredniego (ang. *stressed intermediate*), związanego z etapem przejścia z kompleksu otwartego w kompleks elongacyjny.

Eksperymenty wykonane w tej pracy świadczą również o tym, że proces lokalizacji i rozpoznania promotora, a także tworzenie kompleksów binarnych ma charakter

sekwencyjny, i że dominującą rolę pełni w nim region zlokalizowany powyżej heksameru -35, a nie sam heksamer.

8. DODATEK

8.1. Pisownia i skróty

- W celu zwiększenia przejrzystości tekstu pracy, w ułamkach dziesiętnych użyto kropki jako separatora;
- Słowa i zwroty pisane w języku angielskim zostały wyróżnione kursywą (zarówno te, które posiadają odpowiedniki polskie, jak i ich nie posiadające);

Objaśnienia skrótów

A1 – silny promotor bakteriofaga T7

O₋₃₅ – promotor A1 bakteriofaga T7 zawierający zmienioną sekwencję regionu -35

O₋₁₀ – promotor A1 bakteriofaga T7 zawierający całkowicie zmieniony region -10

O_{1/2-10} – promotor A1 faga T7 zawierający częściowo zmieniony region -10

O_{-35/-10} – promotor A1 bakteriofaga T7 zawierający całkowicie zmienione regiony -35 i -10

O_{-35/1/2-10} – promotor A1 bakteriofaga T7 zawierający całkowicie zmieniony region -35 i częściowo -10

R – fragment „prawy” promotora A1 uzyskiwany w wyniku reakcji PCR za pomocą starterów: TBL i PPA1

L₁ - fragment „lewy” całkowicie zmienionego w obrębie regionu -10 promotora A1 (**O₋₁₀**) uzyskiwany w wyniku reakcji PCR za pomocą starterów: PLA1 i TBR1

L₂ - fragment „lewy” częściowo zmienionego w obrębie regionu -10 promotora A1 (**O_{1/2-10}**) uzyskiwany w wyniku reakcji PCR za pomocą starterów: PLA1 i TBR2

L₃ – fragment „lewy” całkowicie zmienionego w obrębie regionów -35 i -10 promotora A1 (**O_{-35/-10}**) uzyskiwany w wyniku reakcji PCR na matrycy fragmentu **O₋₃₅**, za pomocą starterów: PLA1 i TBR1

L₄ – fragment „lewy” całkowicie zmienionego w obrębie regionu -35 i częściowo w obrębie regionu -10 promotora A1 (**O_{-35/1/2-10}**) uzyskiwany w wyniku reakcji PCR na matrycy fragmentu **O₋₃₅** za pomocą starterów: PLA1 i TBR2

kA1 – promotor A1 faga T7 pozbawiony sekwencji powyżej regionu -35 (od zasady w pozycji -39)

kO₋₃₅ - promotor A1 faga T7 zawierający całkowicie zmieniony region -35 i pozbawiony

sekwencji powyżej tego regionu (od zasady w pozycji -39)

O1₋₃₅ – promotor A1 faga T7 zawierający całkowicie zmieniony region -35, uzyskany w wyniku cięcia enzymem *EcoRI* w pozycji -36 heksameru -35.

pz – par zasad

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

IPTG – izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd

NTA – kwas nitrylotriacetylowy

PMSF – fenylometylosulfonylo fluorek

SDS – sól sodowa kwasu dodecyłowego

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

8.2. Sekwencja plazmidu pDS1 z fragmentem A1 wstawionym w miejscu cięcia enzymu *Bam*HI

- ✓ miejsca rozpoznawane przez enzym *Bam*HI oznaczono kolorem czerwonym
- ✓ miejsca rozpoznawane przez enzym *Ava*II oznaczono kolorem niebieskim
- ✓ sekwencję promotora A1 bakteriofaga T7 wstawioną w miejsce rozpoznawane przez enzym *Bam*HI podkreślono kolorem czarnym

gaattcctcgaggaattccgGATCCTCGAGCTCCAGATCCCCGGACCCGGTGTTCGATTGG
gATGGCTATTCGCCGTGTCCCTCTCGATGGCTGTAAGTATCCTATAGGTTAGACTTTAAG
tCAATACTCTTTTTGATAAATTTTCGGGATCTCGAGgattccggccatcatggttcgacat
 tgaactgcatcgctcgccgtgtcccaaatatggggattggcaagaacggagacctaccct
 ggcctccgctcaggaacgagttcaagtacttccaaagaatgaccacaacctcttcagtgg
 aaggtaaacagaatctggtgattatgggtaggaaaacctggttctccattcctgagaaga
 atcgaccttaaaggacagaattaatatagttctcagtagagaactcaaagaaccaccac
 gaggagctcattttcttgccaaaagtttgatgatgccttaagacttattgaaacaaccgg
 aattggcaagtaaagtagacatggtttgatagtcggaggcagttctgtttaccaggaag
 ccatgaatcaaccaggccaccttagactctttgtgacaaggatcatgcaggaatttgaaa
 gtgacacgtttttccagaaattgatttggggaaatataaacttctcccagaataaccag
 gcgtcctctctgaggtccaggaggaaaaaggcatcaagtataagtttgaagtctacgaga
 agaaagactaacaggaagatgctttcaagttctctgctcccctcctaaagctatgcattt
 ttataagacctgggacttttgctggcttttagatccggccaagcttggactcctgttgat
 agatccagtaatgacctcagaactccatctggatttgttcagaacgctcggttgcccggc
 ggcgttttttattggtgagaatccaagcttggcgagattttcaggagctaaggaagctaa
 aatggagaaaaaatcactggatataaccaccgcttgatataatcccaatggcatcgtaaaga
 acattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgctcagctgga
 tattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttat
 tcacattcttgcccgcctgatgaatgctcatccggaattccgataggcaatgaaagacgg
 tgagctggtgatatgggatagtgttcacccttgttacaccgttttccatgagcaaacctga
 aacgttttcatcgctctggagtgaataaccacgacgatttccggcagtttctacacatata
 ttcgcaagatgtggcgtgttacgggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattga
 gaatatgtttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttccaccagttttgatttaaacgt
 ggccaatatggacaacttcttcgcccccgttttcaccatgggcaaatattatacgcaagg
 cgacaaggctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtctgtgatggcttcca
 tgtcggcagaatgcttaatgaattacaacagtactgcatgagtgaggcagggcgggcgta
 attttttaaggcagttattggtgcccttaaaccgctggggtaatgactctctagagctg
 cctcgcgctttcggatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctccccgagacggt
 cacagcttgctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcggg
 tgttggcgggtgtcggggcgagccatgaccagtcacgtagcgatagcggagtgataac

tggcttaactatgCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAA
ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGTCTC
ACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTGCGGTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCG
GTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGC
CAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA
CTATAAGATAACAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACC
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAA
TGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCGTT CAGCCCAGCGCTGCGCTTATCCGGTA ACTATCGTCTTGAGTCC
AACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACT
AGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA
AGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCG
ATCTGTCTATTTGTT CATCCATAGCTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATA
CGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG
GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCC
GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGC
TCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTC CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGA
TCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGT CAGAAGT
AAGTTGGCCGAGTGT TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTCTTACTGTCT
ATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT GAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATAACCGCGCA
CATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCA
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA ACTGATCT
TCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCC
GCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT
TAGAAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTT
CGTCTTCAA

9. BIBLIOGRAFIA

1. Aiyar, S.E., Gourse, R.L., and Ross, W., (1998) Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with RNA polymerase α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95, 14652-14657.
2. Amouyal, M., and Buc, H., (1987) Topological unwinding of strong and weak promoters by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 195, 795-808.
3. Ansari, A.Z., and O'Halloran, T.V., (1994) An emerging role for allosteric modulation of DNA structure in transcription. In Conaway, R.C., and Conaway, J. W., (eds) *Transcription: mechanisms and regulation*. Raven Press, Ltd, New York, pp. 369-386.
4. Artsimovitch, I., Chu, C., Lynch, A.S., Landick, R., (2003) A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. *Science*, 302, 650-654.
5. Ayers, D.G., Auble, D.T., deHaseth, P.L., (1989) Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Role of spacer DNA in functional complex formation. *J. Mol. Biol.*, 207, 749-756.
6. Borukhov, S., Goldfarb, A., (1993) Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunits and *in vitro* assembly. *Protein expression and purification*, 4, 503-511.
7. Bowater, R. P., Chen, DF., and Lilley, D.M., (1994) Modulation of *tyrT* promoter activity by template supercoiling *in vitro*. *EMBO J.*, 13, 5647-5655.
8. Bown, J.A., Owens, J.T., Meares, C.F., Fujita, N., Ishihama, A., Busby, S.J.W., and Minchin, S.D., (1999) Organization of open complexes at *Escherichia coli* promoters. *J. Biol. Chem.*, 274, 2263-2270.
9. Brodolin, K., Buckle, M., (2001) Differential melting of the transcription start site associated with changes in RNA polymerase-promoter contacts in initiation transcription complexes. *J. Mol. Biol.*, 307, 25-30.
10. Buckle, M., Pemberton, I.K., Jacquet, M.A., and Buc, H., (1999) The kinetics of sigma subunit directed promoter recognition by *E. coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 285, 955-964.
11. Buckle, M., and 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.
12. Buckle, M., and Buc, H., (1989) Fine mapping of single-stranded regions using base-specific probes: Study of an open complex formed between RNA polymerase and the *lacUV5* promoter. *Biochemistry*, 28, 4388-4396.
13. Burns, H.D., Belyaeva, T.A., Busby S.J.W., and Minchin, S.D., (1996)

- Temperature-dependence of open complex formation at two *Escherichia coli* promoters with extended -10 sequences. *Biochem. J.*, 317, 305-311.
14. Bustamante, C., Guthold, M., Zhu, X., and Yang, G., (1999) Facilitated target location on DNA by individual *Escherichia coli* RNA polymerase molecules observed with the scanning force microscope operating in liquid. *J. Biol. Chem.*, 274, 16665-16668.
 15. Busby, S., Spassky, A., Chan, B., (1987) RNA polymerase makes important contacts upstream from base pair -49 at the *Escherichia coli* galactose operon *P_I* promoter. *Gene*, 53, 145-152.
 16. Campbell, E.A., Pavlova, O., Zenkin, N., Leon, F., Irschik, H., Jansen, R., Severinov, K., and Darst, S.A., (2005) Structural, functional and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *EMBO J.*, 24, 674-682.
 17. Campbell, E.A., Muzzin, 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. *Molecular Cell*, 9, 527-539.
 18. Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A., (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104, 901-912.
 19. Cassani, G., Burgess, R.R., Goodman, H.M., Gold, L., (1971) Inhibition of RNA polymerase by streptolydigin. *Nat. New Biol.*, 230, 197-200.
 20. Chamberlin, M.J., (1995) New models for the mechanism of transcription elongation and its regulation. In *The Harvey Lectures*, Willey-Liss, Inc., New York, pp. 1-21.
 21. Chamberlin, M.J., Nierman, W.C., Wiggs, J., Neff, N., (1979) A quantitative assay for bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, 254, 10061-10069.
 22. Chan, C.L., and Landick, R., (1994) New perspectives on RNA chain elongation and termination by *E. coli* RNA polymerase. In Conaway, R.C., and Conaway, J.W., (eds) *Transcription Mechanisms and Regulation*. Raven Press, Ltd., New York, pp. 297-321.
 23. Chenchick, A., Beabealashvilli, R., Mirzabekov, A., (1981) Topography of interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits with *lacUV5* promoter. *FEBS Letters*, 128, 46-50.
 24. Cook, D.N., Ma, D., Pon, N.G., and Hearst, J.E., (1992) Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10603-10607.
 25. Craig, M.L., Suh, W.C., and Record, M.T., Jr., (1995) HO· And Dnase I probing of $E\sigma^{70}$ RNA polymerase- λP_R promoter open complexes: Mg^{2+} binding and its structural consequences at the transcription start site. *Biochemistry*, 34, 15624-

- 15632.
26. Cramer, P., (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12, 89-97.
 27. Dai, X., Rothman-Denes, L.B., (1999) DNA structure and transcription. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2, 126-130.
 28. Darst, S.A., (2004) New inhibitors targeting bacterial RNA polymerase. *TRENDS in Biochemical Sciences.*, 29, 159-162.
 29. Darst, S.A., Opalka, N., Chacon, P., Polyakov, A., Richter, C., Zhang, G., and Wriggers, W., (2002) Conformational flexibility of bacterial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 4296-4301.
 30. Darst, S.A., (2001) Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11, 55-162.
 31. Darst, S.A., Polyakov, A., Richter, C., Zhang, G., (1998) Insights into *Escherichia coli* RNA polymerase structure from a combination of x-ray and electron crystallography. *J. Struct. Biol.*, 124, 115-122.
 32. 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, 730-732.
 33. Darst, S.A., Polyakov, A., Richter, C., Zhang, G., (1998) Structural studies of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, LXIII, 269-276.
 34. Daube, S.S., and von Hippel, P.H., (1999) Interactions of *Escherichia coli* σ^{70} within the transcription elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 83-95.
 35. Davis, C.A., Capp, M.W., Record, M., Saecker, R.M., (2005) The effect of upstream DNA on open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 285-290.
 36. Delgado, M.A., Rintoul, M.R., Farias, R.N., Salomon, R.A., (2001) *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.*, 183, 4543-4550.
 37. Dombroski, A.J., (1997) Recognition of the -10 promoter sequence by partial polypeptide of σ^{70} *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 272, 3487-3497.
 38. Drolet, M., Bi, X., and Liu, L.F., (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 269, 2068-2074.
 39. Dunn, J.j., Studier, F.W., (1983) Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetics elements. *J. Mol. Biol.*, 166, 477-535.

40. Estrem, S.T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z.W.S., Niu, W., Ebright, R.H., (1999) Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Genes Dev.*, 13, 2134-2147.
41. Estrem, S.T., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R., (1998) Identification of UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9761-9766.
42. Fenton, M.S., and Gralla, J.D., (2003) Roles for inhibitory interactions in the use of the -10 promoter element by σ^{70} holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 278, 39669-39674.
43. 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.
44. 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.
45. Figureoa, N., and Bossi, L., (1988) Transcription induces gyration of the DNA template in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9416-9420.
46. Finn, R.D., Orlova, E.V., Gowen, B., Buck, M., van Heel, M., (2000) *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures. *EMBO J.*, 19, 6833-6844.
47. Garner, M.M., Revzin, A., (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: applications to components of *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucl. Acids Res.*, 9, 3047-3060.
48. Geszvain, K., and Landick, R., The structure of bacterial RNA polymerase. www.bact.wisc.edu/landick
49. Gourse, R.L., Ross, W., and Gaal, T., (2000) Ups and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alfa subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Molec. Microbiol.*, 37, 687-695.
50. Greenblatt, J., (1992) Protein-protein interactions as critical determinants of regulated initiation and termination of transcription. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 203-226.
51. Guo, H., and Tullius, T.D., (2003) Gapped DNA is anisotropically bent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3743-3747.
52. Guo, Y., and Gralla, J.D., (1998) Promoter opening via a DNA fork junction binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11655-11660.
53. Guthold, M., Zhu, X., Rivetti, C., Yang, G., Thompson, N.H., Kasas, S., Hansma, H.G., Smith, B., Hansma, P.K., and Bustamante, C., (1999) Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biophys. J.*, 77, 2284-2293.

54. Hawley, D.K., McClure, W.R., (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter sequences. *Nucl. Acids Res.*, 11, 2237-2255.
55. Hayes, J., and Tullius, T.D., (1989) The missing nucleoside experiment: a new technique to study recognition of DNA by protein. *Biochemistry*, 28, 9521-9527.
56. Heisler, L.M., Suzuki, H., Landick, R., and Gross, C.A., (1993). Four contiguous amino acids define the target for streptolydigin resistance in the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 268, 25369-25375.
57. Heumann, H., Zaychikov, E., Denissowa, L., and Hermann, T., (1997) Translocation of DNA-dependent *E. coli* RNA polymerase during RNA synthesis. In Eckstein, F., and Lilley, D.M.J., (eds) *Nucleic acids and molecular biology*, vol. 11, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 151-177.
58. Heumann, H., Schickor, P., Hermann, T., Palecek, E., Metzger, W., (1992) Protein DNA interface of the complex of T7 A1 promoter and DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*. In Structural tools for the analysis of protein-nucleic acids complexes. Advances in life sciences. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 223-240.
59. 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, 4379-4381.
60. Heumann, H., Metzger, W., and Niehorester, M., (1986) Visualization of intermediary transcription states in the complex between *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerases and a promoter-carrying DNA fragment using the gel retardation method. *Eur. J. Biochem.*, 158, 675-679.
61. Hirota, Y., Takashi, O., (1995) Adjacent upstream superhelical writhe influence an *Escherichia coli* promoter as measured by *in vivo* strength and *in vitro* open complex formation. *J. Mol. Biol.*, 254, 566-578.
62. Jin, D.J., Gross, D.A., (1988) Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.*, 202, 45-58.
63. 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.
64. Kirkegaard, K., Buc, H., Spassky, A., Wang, J.C., (1983) Mapping of single-stranded regions in duplex DNA at the sequence level: single-strand-specific cytosine methylation in RNA polymerase-promoter complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2544-2548.
65. Knaus, R., and Bujard, H., (1990) Principles governing the activity of the *E. coli* promoters. In Eckstein, F., and Lilley, D.M., (eds) *Nucleic acids and molecular biology*, vol. 4, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 110-123.

66. 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.
67. Komissarova, N., Kashlev, M., (1998) Functional topography of nascent RNA in elongation intermediates of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14699-14704.
68. Komissarova, N., Kashlev, M., (1997) RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J. Biol. Chem.*, 272, 15329-15338.
69. Komissarova, N., Kashlev, M., (1997) Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1755-1760.
70. Koo, H.S., Wu, H.M., and Crothers, D.M., (1986) DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature*, 320, 501-506.
71. Korzheva, N., and Mustaev, A., (2001) Transcription elongation complex: structure and function. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 119-125.
72. Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Darst, S.A., (2000) A structural model of transcription elongation. *Science*, 289, 619-625.
73. Korzheva, N., Mustaev, A., Nudler, E., Nikiforov, V., Goldfarb, A., (1998) Mechanistic model of the elongation complex of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, LXIII, 337-345.
74. Kovacic, R.T., (1987) The 0°C closed complexes between *Escherichia coli* RNA polymerase and two promoters, T7-T3 and *lacUV5*. *J. Biol. Chem.*, 262, 13654-13661.
75. 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 not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length. *EMBO J.*, 21, 1369-1378.
76. Landick, R., (2001) RNA polymerase clamps down. *Cell*, 105, 567-570.
77. Lefevre, J.F., Lane, A.N., and Jardetzky, O., (1988) A description of conformational transitions in the Pribnow box of the *trp* promoter in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 27, 1086-1094.
78. Levin, J.R., Blake, J.J., Ganunis, R.A., and Tullius, T.D., (2002) The roles of specific template nucleosides in the formation of stable complexes by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 275, 6885-6893.

79. Li, X.Y., and McClure, W.R., (1998) Characterization of the closed complex intermediate formed during transcription initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 273, 23549-23557.
80. Lim, H.M., Lee, H.J., Roy, S., Adhya, S., (2001) A “master” in base unpairing during isomerization of a promoter upon RNA polymerase binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14849-14852.
81. Lissner, S., and Margalit, H., (1993) Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucl. Acids Res.*, 21, 1507-1516.
82. Liu, CL., Martin, C.T., (2002) Promoter clearance by T7 RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 277, 2725-2731.
83. Liu-Johnson, H.N., Gartenberg, MR., and Crothers, D.M., (1986) The DNA binding domain and bending angle of *E. coli* CAP protein. *Cell*, 47, 995-1005.
84. Łoziński, T., Wierzchowski, K.L., (2005) Mg²⁺-modulated KMnO₄ reactivity of thymines in the open transcription complex reflects variation in the negative electrostatic potential along the separated DNA strands. Footprinting of *Escherichia coli* RNA polymerase complex at the λ P_R promoter revisited. *FEBS J.*, 272, 2838-2853.
85. Malhotra, A., Severinova, E., Darst, S.A., (1996) Crystal structure of a σ^{70} subunit fragment from RNA polymerase. *Cell*, 87, 127-136.
86. Matlock, D.L., Heyduk, T., (2000) Sequence determinants for the recognition of the fork junction DNA containing the -10 region of promoter DNA by *E. coli* RNA polymerase. *Biochemistry*, 39, 12274-12283.
87. McClure, W.R., (1980) Rate-limiting steps in RNA chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5634-5638.
88. McClure, W.R., Cech, C.L., (1978) On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 253, 8949-8956.
89. Mekler, V., Kortkhonjia, E., Mukhopadhyay, J., Knight, J., Revyakin, A., Kapaidis, N., Niu, W., Ebright, Y.W., Levy, R., and Ebright, RH., (2002) Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*, 108, 599-614.
90. Metzger, W., Schickor, P., Meier, T., Werel, W., and Heumann, H., (1993) Nucleation of RNA chain formation by *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 232, 35-49.
91. Metzger, W., Schickor, P., Heumann, H., (1989) A cinematographic view of *Escherichia coli* RNA polymerase translocation. *EMBO J.*, 8, 2745-2754.
92. Metzger, W., (1988) Untersuchungen zum Mechanismus der Translokation der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-

Maximilians-Universität, München.

93. Mishra, R.K., Gopal, V., and Chattarji, D., (1990) Correlation between the DNA supercoiling and the initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase *in vitro*: role of the sequences upstream of the promoter region. *FEBS Lett.*, 260, 273-276.
94. Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R.M., Ebright, R.H., (2004) Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol. Cell*, 14, 739-751.
95. Mukhopadhyay, J., Kapanidis, A.N., Mekler, J., Kortkhonja, 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.
96. Murakami, K.S., and Darst, S.A., (2003) Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13, 31-39.
97. Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O., Darst, S.A., (2002) Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, 296, 1285-1290.
98. Mustaev, A., Kozlov, M., Markovtsov, V., Zaychikov, E., Denissova, L., Goldfarb, A., (1997) Modular organization of the catalytic center of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6641-6645.
99. Naryshkin, N., Revyakin, A., Kim, Y., Mekler, V., Ebright, R.H., (2002) Structural organization of the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*, 101, 601-611.
100. Nudler, E., (1999) Transcription elongation: structural basis and mechanisms. *J. Mol. Biol.*, 288, 1-12.
101. Nudler, E., Gusarov, I., Avetissova, E., Kozlov, M., Goldfarb, A., (1998) Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*. *Science*, 281, 424-428.
102. Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., Goldfarb, A., (1997) The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell*, 89, 33-41.
103. Nudler, E., Avetissova, E., Markovtsov, V., Goldfarb, A., (1996) Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex. *Science*, 273, 211-217.
104. Nudler, E., Kashlev, M., Nikiforov, V., and Goldfarb, A., (1995) Coupling between transcription termination and RNA polymerase inchworming. *Cell*, 81, 352-357.
105. Nudler, E., Goldfarb, A., Kashlev, M., (1994) Discontinuous mechanism of transcription elongation. *Science*, 265, 793-796.

106. Ohlsen, K.L., Gralla, J.D., (1992) DNA melting within stable closed complexes at the *Escherichia coli* *rrnBP1* promoter. *J. Biol. Chem.*, 267, 19813-19818.
107. Opalka, N., Mooney, R.A., Richter, C., Severinov, K., Landick, R., Darst, S.A., (1999) Direct localization of a β subunit domain on the three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 617-622.
108. Oppenheim, D.S., Yanofsky, C., (1980) Functional analysis of wild type and altered tryptophan operon promoters of *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 144, 143-161.
109. Ovchinnikov, Y.A., Monastyrskaya, G.S., Guriev, S.O., Kalinina, N.F., Sverdlov, E.D., Gragerov, A.I., Bass, I.A., Kiver, I.F., Moiseyeva, E.P., Igumnov, V.N., Mindlin, S.Z., Nikoforov, V.G., Khesin, R.B., (1983) RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli*: sequence changes and dominance. *Mol. Gen. Genet.*, 190, 344-348.
110. Ozoline, O.N., and Tsyganov, M.A., (1995) Structure of open complexes with *Escherichia coli* RNA polymerase as revealed by Dnase I footprinting technique: compilation analysis. *Nucl. Acids Res.*, 23, 4533-4541.
111. Pruss, G.J., Drlica, K., (1989) DNA supercoiling and procaryotic transcription. *Cell*, 56, 521-523.
112. QIAquick Spin Handbook for QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, 1997.
113. Qiu, J., Helmann, J.D., (1999) Adenines at -11, -9 and -8 play a key role in the binding of *Bacillus subtilis* $E\sigma^A$ RNA polymerase to -10 region single-stranded DNA. *Nucl. Acids Res.*, 27, 4541-4546.
114. Rao, L., Ross, W., Appleman, J.A., Gaal, T., Leirmo, S., Schlax, P.J., (1994) Factor independent activation of *rrnBP1*. An 'extended' promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. *J. Mol. Biol.*, 235, 1421-1435.
115. Reznikoff, W.S., McClure, W.R., *E. coli* promoters. In Reznikoff, W., Gold, L., (eds) Maximizing gene expression. Butterworths, Boston London Durban.
116. Ricchetti, M., Metzger, W., and Heumann, H., (1988) One-dimensional diffusion of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase: a mechanism to facilitate promoter location. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4610-4614.
117. Rivetti, C., Guthold, M., Bustamante, C., (1999) Wrapping of DNA around the *E. coli* RNA polymerase open promoter complex. *EMBO J.*, 18, 4464-4475.
118. Roberts, C.W., Roberts, J.W., (1996) Base-specific recognition of the nontemplate strand of promoter DNA by *E. coli* RNA polymerase. *Cell*, 86, 495-501.

119. Ross, W., Gourse, R.L., (2005) Sequence-independent upstream DNA- α CTD interactions strongly stimulate *Escherichia coli* RNA polymerase-*lacUV5* promoter association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 291-296.
120. Ross, W., Aiyar, S.E., Salomon, J., and Gourse, R.L., (1998) *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strength: modular structure of bacterial promoters. *J. Bacteriol.*, 180, 5375-5383.
121. Ross, W., Gosink, K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R., (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science*, 262, 1407-1411.
122. Saecker, R.M., Tsodikov, O.V., McQuade, K.L., Schlax, P.E., Jr., Capp, M.W., and Record, M.T., Jr, (2002) Kinetic studies and structural models of association of *E. coli* σ^{70} RNA polymerase with λP_R promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates. *J. Mol. Biol.*, 319, 649-671.
123. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual, second edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
124. Salomon, R.A., and Farias, R.N., (1992) Microcin-25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 174, 7428-7435.
125. Schickor, P., Metzger, W., Werel, W., Lederer, H., Heumann, H., (1990) Topography of intermediates in transcription initiation of *E. coli*. *EMBO J.*, 7, 2215-2220.
126. 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, 4706-4711.
127. Sensi, P., (1983) History of the development of rifampin. *Rev. Infect. Dis.*, 5, 402-406.
128. Sensi, P., Greco, A.N., Ballota, R., (1960) Isolation and properties of rifamycin B and rifamycin complex. *Antibiot. Ann 1959-1960*, 7, 262-270.
129. Severinov, K., Markov, D., Severinova, E., Nikiforov, V., Landick, R., Darst, S.A., Goldfarb, A., (1995) Streptolydigin-resistant mutants in a evolutionary conserved region of the β' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 270, 23926-23929.
130. Severinov, K., Sushko, M., Goldfarb, A., Nikiforov, V., (1994) Rif^R mutations in the beginning of the *Escherichia coli rpoB* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 244, 120-126.
131. Severinov, K., Soushko, M., Goldfarb, A., Nikiforov, A., (1993) Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 268, 14820-14825.

132. Severinova, E., Severinov, K., Fenyo, D., Marr, M., Brody, E.N., Roberts, J.W., Chait, B.T., Darst, S.A., (1996) Domain organization of the *Escherichia coli* σ^{70} . *J. Mol. Biol.*, 263, 637-647.
133. Shafer, G.E., Price, M.A., Tullius, T.D., (1989) Use of the hydroxyl radical and gel electrophoresis to study DNA structure. *Electrophoresis*, 10, 397-404.
134. Shimamoto, N., (1999) One-dimensional diffusion of proteins along DNA. *J. Biol. Chem.*, 274, 15293-15296.
135. 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.
136. Simpson, R.B., (1979) The molecular topography of RNA polymerase-promoter interaction. *Cell*, 18, 277-285.
137. Solbiati, J.O., Ciaccio, M., Farias, R.N., Gonzalez-Pastor, J.E., Moreno, F., Salomon, R.A., (1999) Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.*, 181, 2659-2662.
138. Spassky, A., (1986) Visualization of the movement of the *Escherichia coli* RNA polymerase along the *lacUV5* promoter during the initiation of the transcription. *J. Mol. Biol.*, 188, 99-103.
139. Stefano, J.E., Gralla, J.D., (1982) Spacer mutations in the *lac p^s* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1069-1072.
140. Straney, D.C., Crothers, D.M., (1987) Comparison of the open complexes formed by RNA polymerase at the *Escherichia coli lacUV5* promoter. *J. Mol. Biol.*, 193, 279-292.
141. 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.
142. Tang, H., Severinov, K., Goldfarb, A., and Ebright, R.H., (1995) Rapid RNA polymerase genetics: One-day, no column preparation of reconstituted recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4902-4906.
143. The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAGEN, 1997.
144. Tomsic, M., Tsujikawa, L., Panaghie, G., Wang, Y., Azok, J., and deHaseth, P.L., (2001) Differential roles for basic and aromatic amino acids in conserved region 2 of *Escherichia coli* σ^{70} in the nucleation and maintenance of the single-stranded DNA bubble in open RNA Polymerase-Promoter complexes. *J. Biol. Chem.*, 276, 31891-31896.

145. Tolume, F., Mosrin-Hauman, C., Sparkowski, J., Das, A., Leng, M., and Rahmouni, A.R., (2000) GreA and GreB proteins revive backtracked RNA polymerase *in vivo* by promoting transcript trimming. *EMBO J.*, 19, 6853-6859.
146. Travers, A., DNA-Protein interaction. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge UK, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, SE.
147. Tullius, T.D., and Dombroski, B.A., (1986) Hydroxyl radical "footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to λ repressor and cro protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5469-5473.
148. Vassylyev, D.G., Sekine, S-I., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M.N., Borukov, S., and Yokoyama, S., (2002) Crystal structure of bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2,6 Å resolution. *Nature*, 417, 712-719.
149. von Hippel, P.H., Yager, T.D., and Gill, S.C., (1992) Quantitative aspects of the transcription cycle in *Escherichia coli*. In McKnight, S., and Yamamoto, K., (eds) *Transcriptional regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 179-201.
150. von Hippel, P.H., and Yager, T.D., (1992) The elongation-termination decision in transcription. *Science*, 255, 809-812.
151. von Hippel, P.H., Berg, O.G., (1989) Facilitated target location in biological systems. *J. Biol. Chem.*, 264, 675-678.
152. von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D., McSwiggen, J.A., (1984) Protein-nucleic acid interactions in transcription: A molecular analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 389-446.
153. Voskuil, M.I., Chambliss, G.H., (2002) The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. *J. Mol. Biol.*, 322, 521-532.
154. Voskuil, M.I., Voepel, K., and Chambliss, G.H., (1995) The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 17, 271-279.
155. Wagner, R., (2000) Transcription regulation in prokaryotes. Oxford University Press Inc., New York.
156. Werel, W., Schickor, P., and Heumann, H., (1991) Flexibility of the DNA enhances promoter affinity of *Escherichia coli* RNA polymerase. *EMBO J.*, 10, 2589-2594.
157. Wilson, K.S., Conant, C.R., and von Hippel, P.H., (1999) Determinants of the stability of transcription elongation complexes: interactions of nascent RNA with the DNA template and the RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 289, 1179-1194.
158. Wu, H.Y., Shyy, S., Wang, J.C., and Liu, L.F., (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, 53, 433-440.
159. Xu, J., McCabe, B.C., and Koudelka, G.B., (2001) Function-based selection and

- characterization of base-pair polymorphisms in a promoter of *Escherichia coli* RNA polymerase- σ^{70} . *J. Bacteriol.*, 183, 2866-2873.
160. Youderian, P., Bouvier, S., Susskind, M.M., (1982) Sequence determinants of promoter activity. *Cell*, 30, 843-853.
161. Yuzenkova, J., Delgado, M., Nechaev, S., Savalia, D., Epshtein, V., Artsimovitch, I., Mooney, R.A., Landick, R., Farias, R.N., Salomon, R., Severinov, K., (2002) Mutations of Bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *J. Biol. Chem.*, 277, 50867-50875.
162. Zaychikov, E., Denissova, L., Guckenberger, R., and Heumann, H., (1999) *Escherichia coli* RNA polymerase translocation is accompanied by periodic bending of the DNA. *Nucl. Acids Res.*, 27, 3645-3652.
163. Zaychikov, E., Denissova, L., Meier, T., Goette, M., and Heumann, H., (1997) Influence of Mg^{2+} and temperature on formation of the transcription bubble. *J. Biol. Chem.*, 272, 2259-2267.
164. Zaychikov, E., Martin, E., Denissova, L., Kozlov, M., Markovtsov, V., Kashlev, M., Heumann, H., Nikoforof, V., Goldfarb, A., Mustaev, A., (1996) Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science*, 273, 107-109.
165. 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. Acad. Sci. USA*, 92, 1739-1743.
166. Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S.A., (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98, 811-824.
167. Zhang, G., Darst, S.A., (1998) Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit amino-terminal domain. *Science*, 281, 262-266.
168. Zinkel, S.S., Crothers, D.M., (1990) Comparative gel electrophoresis measurement of the DNA bend angle induced by the catabolite activator protein. *Biopolymers*, 29, 29-38.