

**RNA-polymeraasin
peruuttamisen mekanismi
transkription pysähtymisessä**

**Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Biokemian laitos
Biokemia
Elokuu 2018**

Janne Mäkinen

Turun yliopiston laatuajrjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos/Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Mäkinen Janne: RNA-polymeraasin peruuttamisen mekanismi transkription pysähtymisessä

Pro gradu -tutkielma, 91 sivua

Ohjaajat: FT Matti Turtola, dosentti Georgiy Belogurov

Biokemia, biokemian tutkinto-ohjelma

Elokuu 2018

Geenien ilmenemisen ensimmäisessä vaiheessa, transkriptiossa, RNA-polymeraasi syntetisoi RNA:ta DNA:n emäsjärjestyksen mukaisesti. Transkription aikana RNA-polymeraasi satunnaisesti peruuttaa eli liikkuu taaksepäin DNA-juostetta pitkin työntäen RNA:n 3'-pään pois aktiivisesta keskuksesta. Peruutustilassa RNA:n pidentyminen estyy ja transkriptio pysähtyy. Poistuaan peruutustilasta RNA-polymeraasin on (i) liikuttava eteenpäin tai (ii) leikattava nukleotidejä RNA:n 3'-päästä, jotta aktiivinen keskus vapautuu. RNA-polymeraasin peruuttaminen on tärkeä osa geenien ilmenemisen säätelyä ja RNA-polymeraasin tekemien virheiden korjaamista kaikilla eliöillä. Peruutustilan muodostumisen ja RNA:n leikkautumisen mekanisme ei kuitenkaan vielä täysin tunneta.

Tutkimuksessani selvitin peruutustilasta palautumisen ja RNA:n leikkautumisen mekanisme lyhyissä peruutustiloissa. Tätä varten kehitimme koeasetelmia, jotka mahdollistavat peruutustilan määrän ja stabiilisuuden tarkastelun. Hyödynsin entsyymikineettisiä menetelmiä ja RNA-polymeraasin aktiiviseen keskukseen kohdistettuja mutaatioita selvittääkseni, miten RNA-polymeraasin rakennemuutokset vaikuttavat peruutustilaan ja RNA:n leikkautumiseen. Tuloksemme osoittavat, että aktiivisen keskuksen liikkuvan domeenin, liipaisinsilmukan, laskostunut muoto stabiloi peruutustilaa ja ohjaa RNA:n leikkautumista peruutustilassa. Lisäksi havaitsimme, että sekundääriskanavan juuressa oleva E-kohta suojaa peruutustilassa olevaa RNA:ta leikkautumiselta.

Selvitin edelleen, miten eri transkriptiotekijät vaikuttavat peruutustilaan. Tutkin transkription leikkaamistekijöiden GreA ja GreB indusoiman leikkautumisen mekanisme kohdennetulla mutageneesillä. Mutaatiot Gre-tekijän kärjessä vaikuttivat siihen, mistä kohdasta se ohjaa RNA:ta leikkautumaan. Lisäksi havaitsin, että σ^{70} tehostaa RNA-polymeraasin siirtymistä peruutustilaan, millä voi olla merkitystä transkription aloitusvaiheen säätelyssä.

Asiasanat: geeni, RNA-polymeraasi, RNA, DNA, transkriptio, peruuttaminen

Sadulle

Sisällys

1. Johdanto	5
1.1 RNA-polymeraasin rakenne.....	6
1.2 Transkription vaiheet.....	8
1.2.1 Transkription aloitus.....	9
1.2.2 Transkription pidennysvaihe.....	10
1.2.3 Transkription terminaatio.....	12
1.3 RNA:n synteesi tapahtuu nukleotidin liittymissykleinä.....	13
1.4 Peruutustilassa RNA:n synteesi estyy.....	18
1.4.1 Peruutustilan muodostuminen.....	19
1.4.2 Peruutustilasta palautuminen takaisin nukleotidin liittymissykliin.....	21
1.5 Peruutustilan merkitys transkriptiossa.....	24
1.5.1 Transkription oikoluku parantaa RNA:n synteessin tarkkuutta.....	24
1.5.2 RNA-polymeraasin pysähtely säätelee transkription nopeutta.....	25
1.5.3 Peruutustila osana transkriptioon kytkettyä DNA-vaurioiden korjausta.....	29
1.5.4 Peruutustila aiheuttaa DNA-vaurioita RNA-polymeraasin ja replisomin välisissä yhteentörmäyksissä.....	30
2. Työn tavoitteet	32
3. Materiaalit ja menetelmät	33
3.1 Reagenssit.....	33
3.2 Proteiinien kohdennettu mutageneesi.....	33
3.3 Proteiinien tuotto ja puhdistus.....	35
3.4 Transkription elongaatiokompleksin kokoaminen.....	36
3.5 Kineettiset menetelmät.....	37
3.5.1 Nukleotidin liittyminen.....	37
3.5.2 RNA:n leikkautumisen seuraaminen aikaerotteisesti.....	37
3.5.3 RNA:n leikkautumisen seuraaminen 2AP:n fluoresenssin avulla.....	38
3.5.4 RNA-polymeraasin translokaation seuraaminen 6MI-leiman avulla...	38
3.5.5 RNA-geelien kuvantaminen ja analyysi.....	38
3.5.6 Kineettisten tulosten analysointi.....	38

4. Tulokset	40
4.1 Peruutustilan tuottaminen	40
4.2 Aktiivisen keskuksen konformaation vaikutus peruutustilaan	46
4.3 Aktiivisen keskuksen aminohapot RNA:n leikkautumisessa	49
4.4 Gre-tekijöiden kärkiosan aminohapot RNA:n leikkautumisessa	56
4.5 Transkription aloitustekijän σ^{70} vaikutus peruutustilan muodostumiseen	61
5. Tulosten tarkastelu	68
5.1 Liipaisinsilmukan laskostuminen ja magnesium stabiloivat peruutustilaa	68
5.2 RNA:n leikkautuminen riippuu liipaisinsilmukan laskostumisesta sekä vuorovaikutuksista P-kohdan ja E-kohdan kanssa	68
5.3 Gre-tekijän kärkiosan aminohapot ohjaavat RNA:n leikkautumista eri kohdista	72
5.4 RNA leikkautuu tehokkaasti ja spesifisesti kahden guaniiniemäksen välistä	73
5.5 Tehostamalla peruutustilaan siirtymistä σ^{70} voi säädellä siirtymistä transkription aloituksen ja pidennysvaiheen välillä	74
6. Yhteenveto	75
Lähteet	76

Lyhenteet

2AP	2-aminopuriini
6MI	6-metyyli-isoxanthopteriini
A	adeniini
ATP	adenosiinitrifosfaatti
C	sytosiini
CTP	sytosiinitrifosfaatti
CMPCPP	sytidiini-5'-[(α,β)-metyylieno]-trifosfaatti
DNA	deoksiribonukleinihappo
dA	2'deoksiadenosiini
dC	2'deoksisytidiini
dG	2'deoksiguanosiini
dNTP	deoksiribonukleotiditrifosfaatti
dT	2'deoksitymidiini
dsDNA	kaksoiskiertainen DNA
ep	emäspari
G	guaniini
GTP	guanosiinitrifosfaatti
LS	liipaisinsilmukka
NTP	nukleotiditrifosfaatti
ntDNA	nontemplaatti-DNA
PDB	protein data bank
PPi	pyrofosfaatti
RNA	ribonukleinihappo
RNAP	RNA-polymeraasi
rA	2'oksiadeniini
rNTP	ribonukleotiditrifosfaatti
SK	siltakierre
T	tymiini
TEC	transkription elongaatiokompleksi
TIC	transkription initiaatiokompleksi
tDNA	templaatti-DNA
U	urasiili

Aminohappotähteiden lyhenteet

Ala, A = alaniini

Val, V = valiini

Leu, L = leusiini

Ile, I = isoleusiini

Gly, G = glysiini

Ser, S = seriini

Thr, T = treoniini

Cys, C = kysteiini

Met, M = metioniini

Pro, P = proliini

Phe, F = fenyyialaniini

Tyr, Y = tyrosiini

Trp, W = tryptofaani

Asp, D = aspartaatti

Glu, E = glutamaatti

Asn, N = asparagiini

Gln, Q = glutamiini

Lys, K = lysiini

Arg, R = arginiini

His, H = histidiini

1. Johdanto

Kaikki eliöt ovat riippuvaisia geenien ilmenemisen oikeasta ajoituksesta, tehokkuudesta ja tarkkuudesta. Eliöiden on ilmennettävä oikeita geenejä oikeaan aikaan voidakseen muuttaa toimintaansa olosuhteiden vaatimalla tavalla. Transkriptio on geenien ilmenemisen ensimmäinen vaihe, jossa RNA-polymeraasi syntetisoi DNA:n emäsjärjestyksen mukaisesti RNA:ta. RNA-molekyyleillä on solussa monia tehtäviä: lähetti-RNA määrää proteiinin aminohappojärjestyksen translaatiossa, ribosomaalinen RNA toimii ribosomin rakenneosana, ja siirtäjä-RNA:t kuljettavat aminohappoja ribosomille. RNA-polymeraasilla on hyvin keskeinen rooli geenien ilmenemisessä, mistä johtuen geenien säätelyä tapahtuu RNA-polymeraasin kautta. Transkriptiotekijöiksi kutsutut proteiinit vuorovaikuttavat RNA-polymeraasin kanssa ohjaten sen toimintaa ja siten geenien ilmenemistä koko transkription ajan. Evoluution aikana RNA-polymeraasin rakenne on muuttunut ja sen alayksiköiden lukumäärä on kasvanut merkittävästi, mikä kuvastaa geenien säätelyn kehittymistä korkeammassa organismeissa. Huolimatta rakenteellisista eroista RNA-polymeraasin ulommissa osissa sen aktiivisen keskuksen rakenne, ja siten myös RNA-synteesin mekanismi, on säilynyt samankaltaisena koko eliökunnan kehityksen ajan (**kuva 1**)(Lane & Darst, 2010a; Lane & Darst, 2010b; Werner & Grohmann, 2011).

RNA-polymeraasi liikkuu kaksijuosteista DNA:ta pitkin erottaen DNA-juosteet toisistaan. Toinen DNA-juoste, templaatti-DNA (tDNA) määrää, mitä nukleotidejä RNA-polymeraasi liittää yksitellen kasvavan RNA:n 3'-päähen. RNA-polymeraasi liikkuu DNA:ta pitkin lämpöliikkeen avulla, mistä johtuen se voi liikkua sekä eteen että taaksepäin. Transkription aikana RNA-polymeraasi satunnaisesti liikkuu taaksepäin kaksijuosteista DNA:ta pitkin päätyen RNA:n synteesistä poikkeavaan peruutustilaan (Komissarova & Kashlev, 1997; Nudler ym. 1997). Liikkuessaan taaksepäin DNA:ta pitkin RNA-polymeraasi työntää samalla syntetisoimaansa RNA-juostetta kohti kanavaa, jota pitkin nukleotidit saapuvat aktiiviseen keskukseen. Peruutustilassa RNA:n 3'-pää siirtyy ohi katalyyttisestä kohdasta aktiivisessa keskuksessa, jolloin nukleotidin liittyminen RNA:han estyy eli transkriptio pysähtyy. RNA-polymeraasi voi vapautua

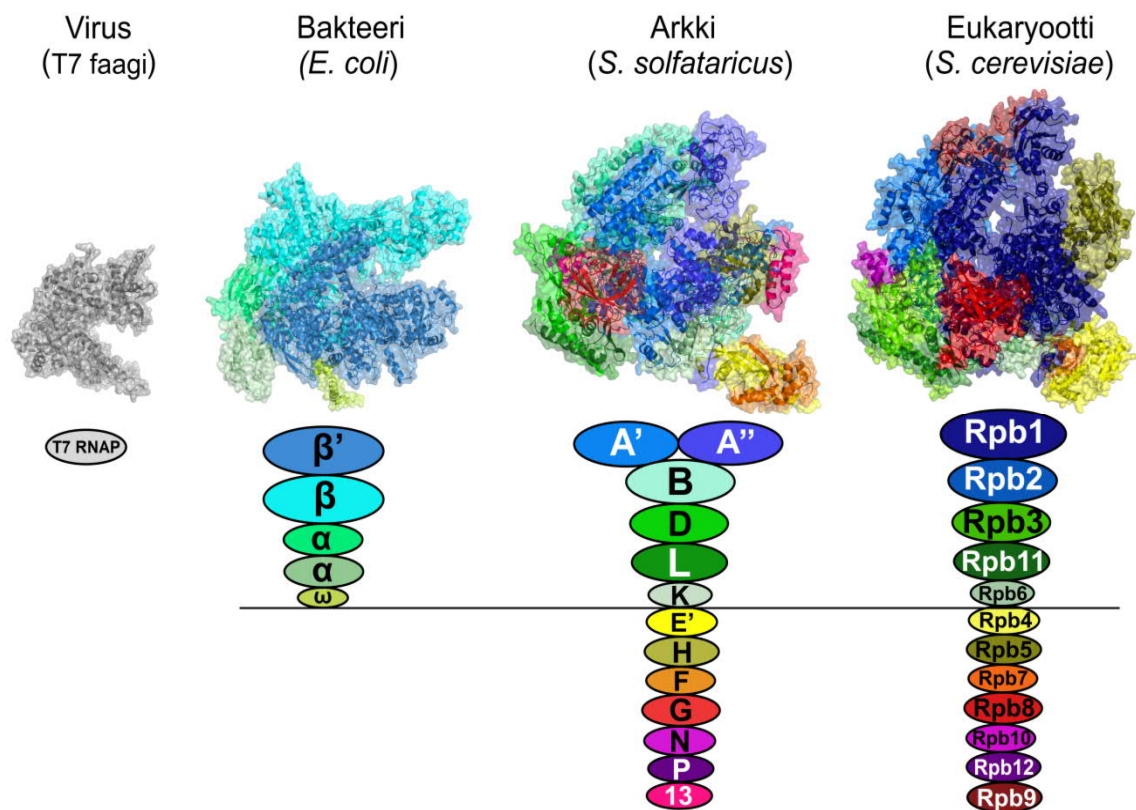
peruutustilasta (i) liikkumalla eteenpäin spontaanisti tai muiden proteiinien avustamana, tai (ii) katkaisemalla nukleotidejä RNA:n 3'-päästä, kunnes katalyyttinen kohta vapautuu (Ephstein & Nudler, 2003; Orlova ym. 1995; Borukhov ym. 1993).

Vaikka RNA-polymeraasin peruuttaminen väliaikaisesti pysäyttää RNA:n synteessin, peruutustila on tärkeä osa transkriptiota. Liittäessään väärän nukleotidin RNA:han RNA-polymeraasi siirtyy helpommin peruutustilaan, jossa se voi leikata väärän nukleotidin pois RNA:sta ja yrittää uudestaan liittää oikean nukleotidin RNA:han näin parantaen transkription tarkkuutta (Zenkin ym. 2006; Sydow ym. 2009). RNA-polymeraasin peruuttaminen toimii myös tapana säädellä transkription nopeutta. Taukosekvensseiksi kutsutut osat DNA:ssa hidastavat transkriptiota ohjaamalla RNA-polymeraasin syntetisoimaan RNA:n, joka helpottaa peruutustilaan siirtymistä tai pysäyttää sen muulla tavalla (Artsimovitch & Landick, 2000; Larson ym. 2014). Promoottorin läheinen pysähtyminen on yksi esimerkki RNA-polymeraasin peruuttamiseen perustuvasta transkription säätelystä, jota on havaittu bakteereilla (Ring ym. 1996) ja monilla selkäjännteisillä (Kwak & Lis, 2013). RNA-polymeraasin peruuttaminen on yhdistetty myös DNA-vaurioiden syntymiseen RNA-polymeraasin ja replisomin välisissä yhteentörmäyksissä (Dutta ym. 2011). RNA-polymeraasin peruuttaminen on siis keskeinen osa transkriptiota ja geenien säätelyä niin bakteereilla kuin eukaryooteillakin. Luvussa 1 perehdytään yksityiskohtaisesti transkription mekanismiin, peruutustilan muodostumiseen ja geenien ilmenemisen säätelyyn peruutustilan kautta.

1.1 RNA-polymeraasin rakenne

RNA-polymeraasin rakenne ja toiminta on säilynyt samankaltaisena eliöiden kehityksen ajan. RNA-polymeraasin aktiivisen keskuksen rakenne on konservoitunut, mistä johtuen myös RNA-synteessin mekanismin oletetaan olevan sama kaikilla eliöillä. Sitä vastoin RNA-polymeraasin ulompien osien rakenne vaihtelee eliökunnan eri päähaaroissa (**kuva 1**). Bakteerit ilmentävät yhtä viidestä alayksiköstä koostuvaa RNA-polymeraasia, joka syntetisoi kaikkia bakteerisolun RNA-molekyylejä (Zhang ym. 1999). Evoluution aikana

eukaryooteille on kehittynyt kolme rakenteellisesti samankaltaista RNA-polymeraasia: Pol I valmistaa ribosomaalista RNA:ta, Pol II valmistaa lähetti-RNA:ta ja Pol III pieniä RNA molekyylejä, kuten siirtäjä-RNA:ta (Cramer, 2002). Arkkien RNA-polymeraasi on rakenteellisesti hyvin samankaltainen eukaryoottien Pol II:n kanssa (Jun ym. 2011). Eräillä viruksilla sekä mitokondrioilla on myös omat RNA-polymeraasinsa, jotka koostuvat vain yhdestä yksiköstä, eivätkä ole evolutiivisesti samaa alkuperää monialayksikköisten RNA-polymeraasien kanssa (Hengrung ym. 2015; Schwinghammer ym. 2013).



Kuva 1. RNA-polymeraasin rakenne eliökunnan eri tasoilla. Kuvassa on esitetty yksi RNA-polymeraasin kiderakenne kustakin eliökunnan päähaarasta sekä eritelty kunkin RNA-polymeraasin alayksiköt kaaviona. Keskenään samankaltaiset alayksiköt eri RNA-polymeraaseissa on esitetty samankaltaisella värillä sekä kiderakenteissa että kaaviossa. Kaaviossa vaakasuoran viivan yläpuolella olevat alayksiköt muodostavat polymeraasin ytimen, joka on rakenteellisesti samankaltainen kaikissa eliökunnissa (poislukien yhden alayksikön RNA-polymeraasit). Järjestys vasemmalta oikealle: T7 faagin RNA-polymeraasi ("Protein Data Bank", PDB: 3E3J), Escherichia coli RNA-polymeraasi (PDB: 4YG2), Sulfolobus solfataricus RNA-polymeraasi (PDB: 3HKZ), ja Saccharomyces cerevisiae Pol II (PDB: 1Y1W).

Transkription tutkimuksessa paljon käytetty malli on *Escherichia coli* RNA-polymeraasi, jonka kaksi α -alayksikköä, β , β' ja ω muodostavat toiminnallisen polymeraasin. Kaksi α -alayksikköä (αI ja αII) muodostavat ensin keskenään dimeerin, jossa αI sitoutuu β -alayksikköön ja αII β' -alayksikköön tuoden ne yhteen (Ishihama ym. 1987; Zhang ym. 1999). β - ja β' -alayksiköt (Rbp1 ja Rbp2 eukaryooteilla) muodostavat yhdessä aktiivisen keskuksen ja ne ovat rakenteellisesti hyvin konservoituneita kaikissa eliöissä, vaikka niiden aminohapposekvensseissä onkin merkittäviä eroja (Lane & Darst, 2010a; Lane & Darst, 2010b). β - ja β' -alayksiköt muodostavat ravun kouraa muistuttavan rakenteen, jonka väliin muodostuvia kanavia pitkin kaksijuosteinen DNA ja yksijuosteinen RNA ohjautuvat eri suuntiin RNA-polymeraasin liikkeessa eteenpäin (Zhang ym. 1999, Cramer ym. 2001). RNA-polymeraasin ytimeen kuuluu vielä ω -alayksikkö, joka sitoutuu β' -alayksikköön ja allosteerisesti vaikuttaa RNA-polymeraasin toimintaan (Vrentas ym. 2005).

Arkeilla ja eukaryooteilla RNA-polymeraasin ytimen ympärillä on lukuisia muita alayksiköitä, jotka tuovat lisää domeeneja ja vuorovaikutuspinta-alaa RNA-polymeraasiin (Cramer, 2002; Werner ja Grohmann, 2011). Useimmat nukleiinihappoja ympäröivistä rakenteista ja domeeneista ovat yhteneväisiä bakteerien ja eukaryoottien välillä (Vassilyev ym. 2007a; Land & Darst, 2010b), joten tutkielmassa esitetyt käsitteet noudattavat selkeyden vuoksi bakteeri-RNA-polymeraasille vakiintunutta käsitteistöä, ellei toisin mainita.

1.2 Transkription vaiheet

Transkriptio jaetaan yleisesti kolmeen vaiheeseen: aloitukseen (initiaatio), pidentymiseen (elongaatio) ja päättymiseen (terminaatio). Kaikkia näitä vaiheita kontrolloi joukko transkriptiotekijöiksi kutsuttuja proteiineja osana geenien ilmenemisen säätelyä. Selkeyden vuoksi käsittelen transkription vaiheita ainoastaan bakteerisolujen näkökulmasta.

1.2.1 Transkription aloitus

Bakteereilla transkription aloituksessa RNA-polymeraasin ja aloitustekijän (σ -tekijän) muodostama kompleksi, holoentsyymi, sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han muodostaen suljetun kompleksin (*engl.* "closed complex")(Cook & deHaseth, 2007), joka ei vielä kykene syntetisoimaan RNA:ta. Ensin RNA-polymeraasin täytyy avata kaksijuosteista DNA:ta ja ohjata sekä tDNA että ntDNA oikeisiin kanaviin aktiivisessa keskuksessa. RNA-polymeraasin aktiivisen keskuksen domeenit avaavat kaksijuosteista DNA:ta alavirrassa samalla kun σ -tekijä avaa DNA:ta ylävirrassa näin erottaen tDNA:n ja ntDNA:n toisistaan (Saecker ym. 2002). Kahden välivaiheen (I_1 ja I_2) kautta muodostuu avoin kompleksi (*engl.* "open complex")(Kontur ym. 2008; Gries ym. 2010). Puristimeksi kutsuttu domeeni (*engl.* "clamp") nimensä mukaisesti puristaa β - ja β' -alaysiköiden muodostamaa ravun kouraa kiinni RNA-polymeraasin sitouduttua DNA:han. Kouran sulkeutuminen estää DNA:ta ja RNA:ta irtoamasta RNA-polymeraasista transkription aikana (Landick, 2001).

RNA-polymeraasi ei tarvitse aluketta, vaan se voi aloittaa RNA:n synteessin *de novo*. Aloittaakseen RNA:n synteessin RNA-polymeraasin on ohjattava kaksi ensimmäistä nukleotiditriposfaattia (NTP) sekä tDNA oikeisiin aseisiin toisiinsa nähden, jotta nukleotidit liittyisivät toisiinsa (Basu ym. 2014). RNA-polymeraasi jatkaa muodostuvan RNA:n synteesiä ohjaten seuraavien nukleotidien liittymistä kahden ensimmäisen nukleotidin perään. RNA-polymeraasin, σ -tekijän ja promoottori-DNA:n muodostamaa kompleksia, joka alkaa syntetisoida RNA:ta, kutsutaan yleisesti transkription initiaatiokompleksiksi (*engl.* "transcription initiation complex", TIC). TIC syntetisoi ja vapauttaa useita lyhyitä RNA-transkripteja (*engl.* "abortive initiation")(Carpousis & Gralla, 1980). Tehdessään näin RNA-polymeraasi pysyy paikallaan promoottorialueella ja vetää DNA:ta itseensä (*engl.* "schrunching")(Revyakin ym. 2006), jolloin transkriptiokupla laajenee (Tchernachenko ym. 2008). Syntetisoidessaan vähintään 10 nukleotidiä pitkän RNA-juosteen RNA-polymeraasi lopettaa DNA:n vetämisen ja alkaa sen sijaan liikkua eteenpäin DNA:ta pitkin nukleotidi kerrallaan (Grachev & Zaychikov, 1980). Tällöin RNA-polymeraasi "pakenee" promoottorin luota (*engl.* "promoter escape") ja transkriptio siirtyy pidennysvaiheeseen.

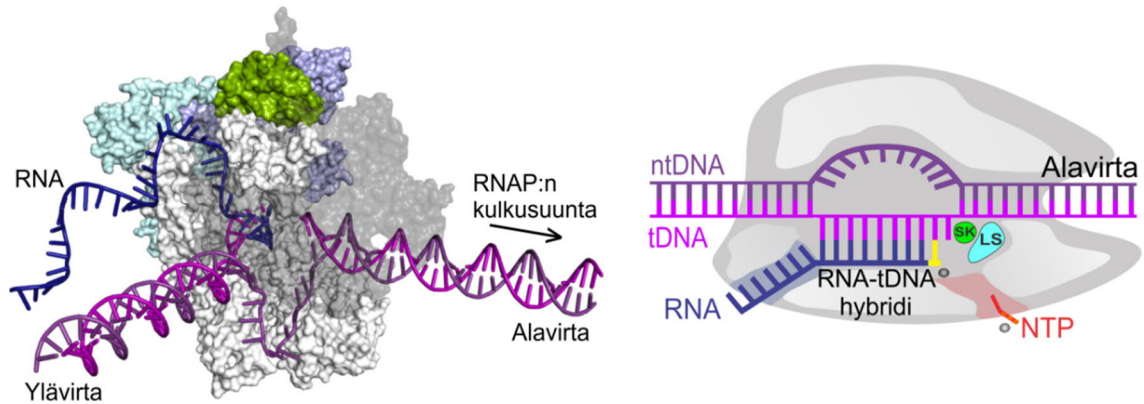
1.2.2 Transkription pidennysvaihe

Transkription pidennysvaiheessa RNA-polymeraasi alkaa tehokkaasti syntetisoida RNA:ta. RNA-polymeraasin ja nukleiinihappojen muodostama kokonaisuus, joka on paennut promoottorialueelta ja voi itsenäisesti liittää nukleotidejä RNA:han, kutsutaan yleisesti transkription elongaatiokompleksiksi (tästä eteenpäin TEC, *engl.* "transcription elongation complex")(kuva 2). TEC on hyvin stabiili rakenne, jossa RNA-polymeraasi ei dissosioitu DNA:sta korkeissa lämpötiloissa (60 °C) eikä korkeissa suolapitoisuuksissa (1.0 M NaCl)(Landick, 2001). TEC:n korkean stabiilisuuden saavat aikaan lukuisat RNA-polymeraasin ja nukleiinihappojen väliset vuorovaikutukset.

Pääkanava, RNA-tDNA-hybridiä sitova tasku ja RNA:n poistumiskanava ovat positiivisesti varautuneita, minkä johdosta ne sitovat negatiivisesti varautuneita nukleiinihappoja DNA-sekvenssistä riippumattomalla tavalla (Cramer ym. 2001, Gnatt ym. 2001, Wilson ym. 1999). Lukuisat domeenit ohjaavat RNA-polymeraasin ja nukleiinihappojen välisiä vuorovaikutuksia transkription aikana. Kytkimiksi kutsutut domeenit (*engl.* "switches") stabiloivat sekä kouran sulkeutumista että RNA-polymeraasin ja nukleiinihappojen välisiä vuorovaikutuksia (Lane & Darst, 2010b). Alavirran kaksijuosteinen DNA kulkeutuu RNA-polymeraasin sisään pääkanavan kautta. RNA-polymeraasin sisällä tDNA ohjautuu kohti polymeraasin aktiivista keskusta samalla kun nontemplaatti-DNA (ntDNA) ohjautuu pois päin aktiivisesta keskuksesta.

Aluetta, jossa tDNA ja ntDNA ovat eronneet toisistaan, kutsutaan transkriptiokuplaksi (*engl.* "transcription bubble"). Transkriptiokuplan rakennetta ylläpitää kolme domeenia: kansi- (*engl.* "lid loop"), peräsin- (*engl.* "rudder loop") ja vetoketjusilmukka (*engl.* "zipper loop")(Cramer ym. 2001, Gnatt ym. 2001)(kuva 3). Lisäksi haarukkasilmukka 2 (*engl.* "fork loop 2") estää kaksijuosteista DNA:ta työntymästä aktiiviseen keskukseen samalla estäen avautuneen DNA-juosteen uudelleenpariutumista alavirrassa (Gnatt ym. 2001). Kaksijuosteinen DNA avautuu kymmenen nukleotidin verran ja pariutuu uudelleen ylävirrassa (Vassylyev ym. 2007a). RNA:han liitettävät nukleotidit kulkeutuvat aktiiviseen keskukseen kapeaa sekundääriskanavaa pitkin. RNA-

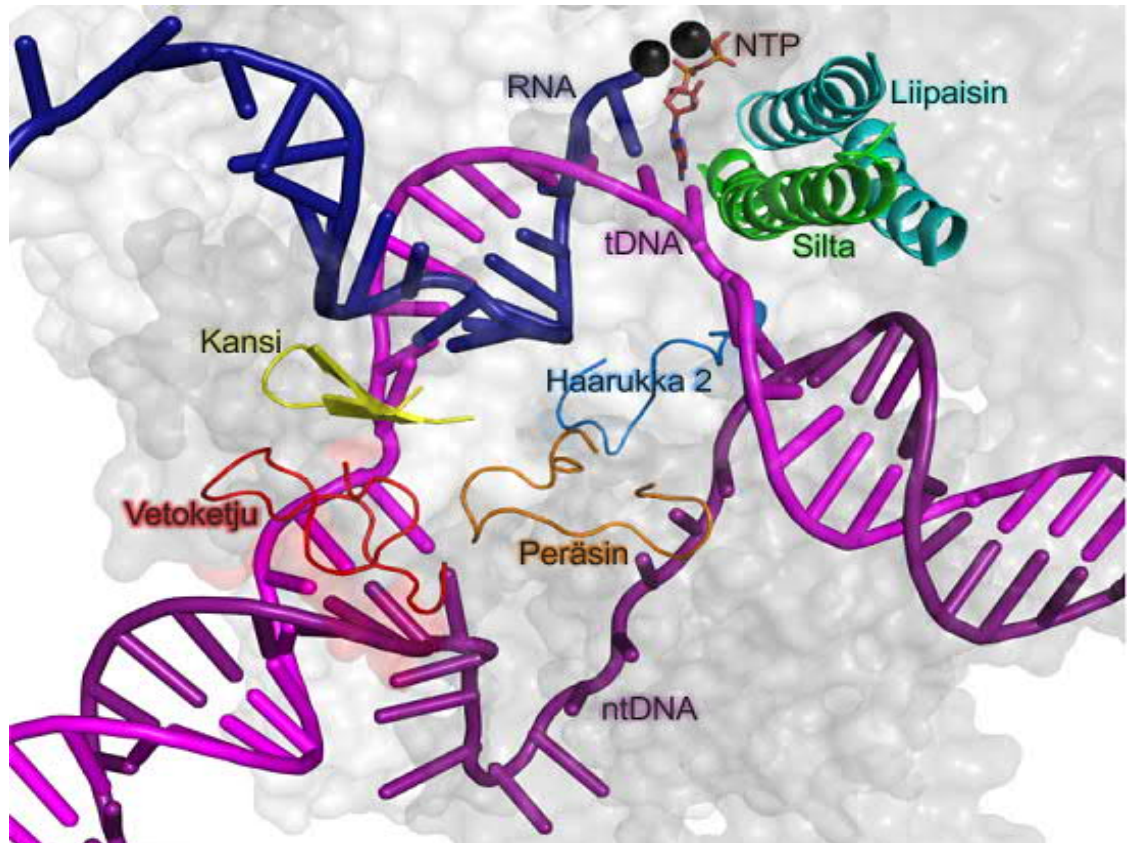
polymeraasin liikkua eteenpäin syntetisoitu RNA-juoste työntyy ulos aktiivisesta keskuksesta RNA:n poistumkanavaan ja lopulta ulos RNA-polymeraasista (Vassilyev ym. 2007a).



Kuva 2. Transkription elongaatiokompleksin rakenne. (Vasemmalla) RNA-polymeraasi liikkuu DNA:ta pitkin alavirtaan samalla työntäen syntetisoimaansa RNA:ta poistumkanavan kautta ulos aktiivisesta keskuksesta. Kuvassa on esitetty *Thermus thermophilus* TEC:n rakenne, joka sisältää kaikki viisi alayksikköä ($\alpha 1$ syaani, $\alpha 2$ vaaleansininen, β vaaleanharmaa, β' tummanharmaa ja ω vihreä), kaksijuosteisen DNA:n (tDNA purppura, ntDNA violetti) sekä RNA:n (tummansininen). β' on esitetty läpinäkyvänä selkeyden vuoksi. Kuvan rakennemalli on muokattu artikkelissa Turtola & Belogurov 2016 esitetystä rakennemallista. (Oikealla) Poikkileikkauskaavio β - ja β' -alayksiköiden muodostamasta aktiivisesta keskuksesta. DNA kulkeutuu aktiiviseen keskukseen pääkanavaa pitkin, nukleotiditriposfaatti (NTP, punainen) kulkeutuu aktiiviseen keskukseen sekundäärikanavaa pitkin. RNA (tummansininen) kulkeutuu ulos aktiivisesta keskuksesta RNA:n poistumkanavaa pitkin. Aktiivisen keskuksen liikkuva domeeni, liipaisinsilmukka (LS, syaani) ja siltakierre (SK, vihreä) on korostettu.

Aktiivisen keskuksen keskeinen osa on β' -alayksikön liikkuva domeeni, liipaisinsilmukka (engl. "trigger loop"), joka RNA-synteesin aikana käy läpi useita konformaatiomuutoksia avaten ja sulkien aktiivista keskusta. Liipaisinsilmukka laskostuu nukleotidin sitoutuessa aktiiviseen keskukseen, jolloin se muodostaa siltakierteen kanssa kolmoiskierteisen rakenteen sulkien aktiivisen keskuksen (Westover ym. 2004). Kierteen avautuessa liipaisinsilmukka vetäytyy pois aktiivisesta keskuksesta. Siltakierteeseen kohdennettujen mutaatioiden on havaittu vaikuttavan suoraan myös liipaisinsilmukan konformaatioiden väliseen tasapainoon (Tan ym. 2008; Malinen ym. 2014). Liipaisinsilmukka tehostaa nukleotidin liittymisreaktiota ja ohjaa myös oikeiden substraattien valikoimista RNA:n synteesissä (Wang ym. 2006; Vassilyev ym. 2007b; Kaplan ym. 2008).

Nukleotidin liittämiseen vaaditaan myös kaksi magnesiumionia, joista yksi (I) sitoutuu aktiivisen keskuksen asparaattitähtheisiin β' D460, β' D462 ja β' D464 (Zaychikov ym. 1996), kun taas toinen magnesiumioni (II) saapuu aktiiviseen keskuksen nukleotidiin tai pyrofosfaattiin sitoutuneena (Sosunov ym. 2003, Westover ym. 2004).



Kuva 3. RNA-polymeraasin aktiivisen keskuksen domeenit. Kuvassa rakennemalli *T. thermophilus* RNA-polymeraasin aktiivisesta keskuksesta. β - ja β' -alayksiköt on esitetty läpinäkyvinä selkeyden vuoksi. TEC on post-translokaatiotilassa, jossa NTP on sitoutunut aktiiviseen keskukseseen ja liipaisinsilmukka (syaani) on laskostunut muodostaen siltakierteen (vihreä) kanssa kolmoiskierteisen rakenteen. Kaksi magnesiumia (mustat pallot) osallistuvat katalyyysin ohjaamiseen. Kuvan rakennemalli on muokattu artikkelissa Turtola & Belogurov 2016 esitetystä rakennemallista.

1.2.3 Transkription terminaatio

Transkriptio päättyy, kun RNA:n synteesi pysähtyy antaen TEC:lle mahdollisuuden siirtyä terminaatioon johtavaan reaktiotiehen (von Hippel & Yager, 1992; Gusarov & Nudler, 1999). Terminaatioissa TEC:n rakenne destabiloituu ja RNA-polymeraasi dissosioituu DNA:sta vapauttaen valmiin

RNA:n. Bakteereilla terminaatio tapahtuu kahdella eri mekanismilla: Rho-tekijästä riippuvainen terminaatio ja Rho-tekijästä riippumaton terminaatio. Rho-riippuvaisessa terminaatioissa kuudesta monomeeristä muodostuva Rho-tekijä sitoutuu C-rikkaaseen osaan RNA:sta (*rut*-kohta, *engl.* "Rho utilization site")(Chen & Richardson, 1987; Hart & Roberts, 1991) ja ATP:n hydrolyysiin kytketyn energian avulla työntää RNA-polymeraasia eteenpäin (Thomsen & Berger, 2009; Koslover ym. 2012). On esitetty, että Rho-tekijä työntää RNA-polymeraasia eteenpäin ilman että RNA:han liittyy lisää nukleotidejä, jolloin RNA kulkeutuu ulos RNA-polymeraasista ja transkriptiokuplan rakenne hajoaa (Park & Roberts, 2006).

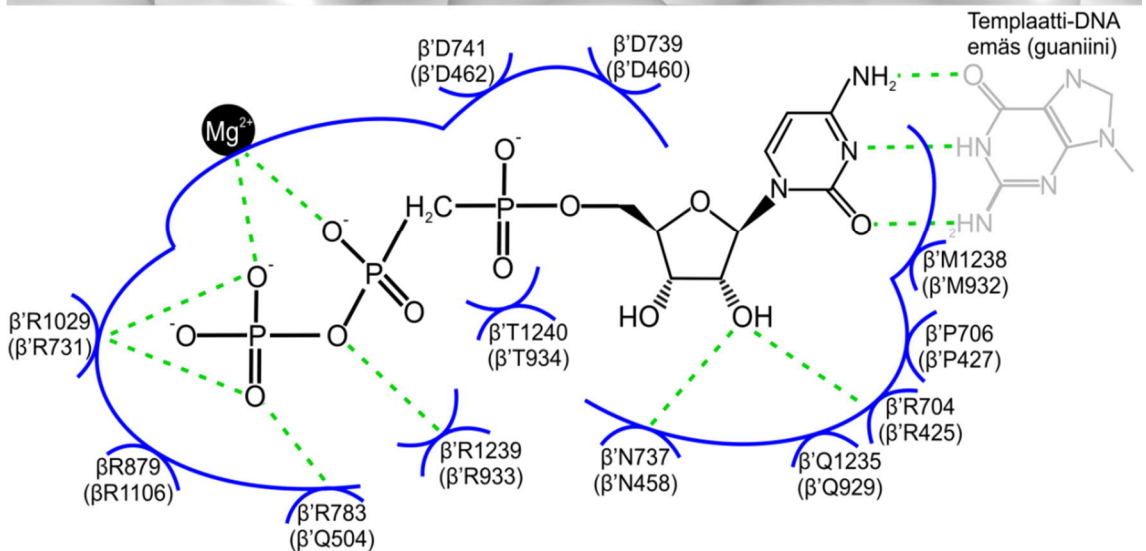
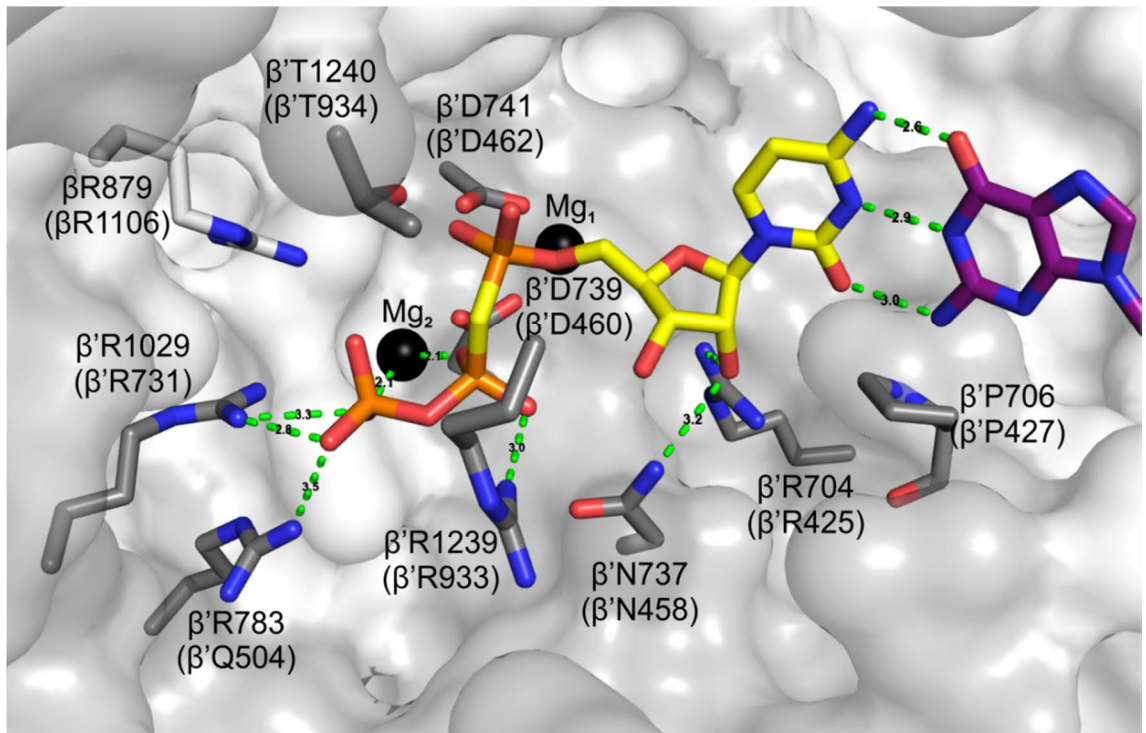
Rho-tekijästä riippumattomassa terminaatioissa (*engl.* "intrinsic termination") RNA-polymeraasi liittää useita G- ja C-emäksiä sisältäviä nukleotidejä RNA:han, joiden perään se liittää 7-8 nukleotidiä, joista suurin osa on U-emäksiä sisältäviä nukleotidejä (*engl.* "U-tract")(d'Aubenton Carafa ym. 1990). Kun viimeinen U-emäksen sisältävä nukleotidi liittyy RNA:han, RNA-polymeraasi pysähtyy (Gusarov & Nudler, 1999). Pysähtyminen antaa syntetisoidulle RNA:n 3'-päälle aikaa muodostaa terminaatiohiuspinnin, joka allosteerisesti muokkaa TEC:n rakennetta destabiloimalla RNA-tDNA-hybrididiä (Gusarov & Nudler, 1999), avaamalla puristindomeenia (Tagami ym. 2010; Chakraborty ym. 2012) ja taittamalla siltakierrettä (Sekine ym. 2015). Näiden muutosten oletetaan yhdessä destabiloivan TEC:n rakennetta johtaen RNA-polymeraasin dissosioitumiseen DNA:sta. Koska hiuspinni muodostuu RNA-sekvenssin ohjaamana, tämänkaltainen transkription lopetus ei vaadi Rho-tekijää.

1.3 RNA:n synteesi tapahtuu nukleotidin liittymissykleinä

RNA-polymeraasi liittää nukleotidejä RNA:n 3'-päähän yksi kerrallaan liikkeudessaan eteenpäin DNA:ta pitkin. Nukleotidin liittymissykli on reaktiosarja, jonka aikana yksi nukleotidi liittyy RNA:han ja RNA-polymeraasi liikkuu yhden emäsparin verran eteenpäin (Abbondanzieri ym. 2005). Nukleotidin liittymissyklin alussa TEC on translokaation jälkeisessä tilassa (*engl.* "post-translocation state", tästä eteenpäin "post-translokaatiotila"), jossa RNA:n ja

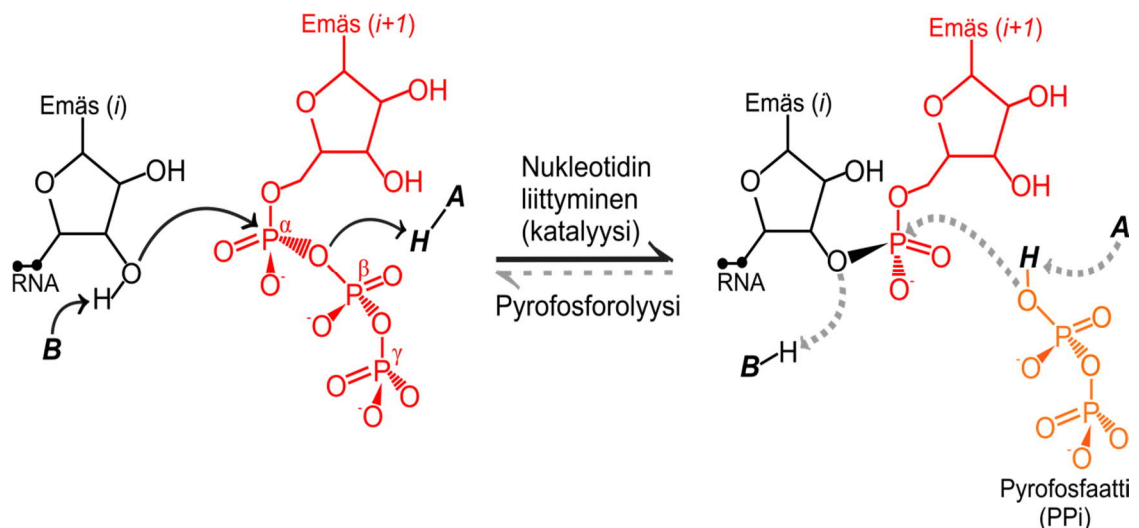
tDNA:n muodostama hybridi on 9 emäsparin mittainen. Post-translokaatiotilassa liipaisinsilmukka on siirtynyt pois aktiivisesta keskuksesta ja RNA:n 3'-päähän viereinen kohta (*i+1*-kohta) on tyhjä seuraavan nukleotidin sitoutumista varten. RNA-polymeraasi valikoi substraatiksi oikean NTP:n sekä sen emäksen että sokeriosan rakenteen perusteella (**kuva 4**). DNA:n emäsjärjestys määrää syntetisoitavan RNA:n emäsjärjestyksen: Watson-Crick-emäspariutuminen tDNA-emäksen ja liitettävän NTP:n emäksen välillä ohjaa oikean emäksen sisältävää NTP:ia sitoutumaan aktiiviseen keskukseen oikeassa asennossa (Westover ym. 2004; Kellinger ym. 2012).

RNA-polymeraasi valikoi solussa ilmenevistä nukleotideistä ainoastaan ribonukleotidejä (rNTP) liitettäväksi RNA:han samalla heikentäen DNA-polymeraasin substraattien eli deoksiribonukleotidien (dNTP) sitoutumista. Aktiivisen keskuksen aminohapot (β 'R704 ja β 'N737 *Thermus thermophilus* RNA-polymeraasissa) muodostavat vetysidoksia liitettävän rNTP:n 2'-OH-ryhmän happiatomin kanssa ohjaten rNTP:n sitoutumista aktiiviseen keskukseen (Svetlov ym. 2004, Vassylyev ym. 2007a). Koska dNTP:ssä ei ole 2'-OH ryhmää, sen vetysitoutuminen β 'R704:n ja β 'N737:n kanssa estyy samalla heikentäen sen sitoutumista aktiiviseen keskukseen. Tämän lisäksi liipaisinsilmukka muodostaa useita vuorovaikutuksia rNTP:n sekä aktiivisen keskuksen aminohappojen kanssa osallistuen oikean NTP:n valikoimiseen (Wang ym. 2006). Kun NTP on sitoutunut *i+1*-kohtaan, liipaisinsilmukka laskostuu muodostaen siltakierteen kanssa kolmoiskierteisen rakenteen, joka sulkee aktiivisen keskuksen. Laskostuessaan liipaisinsilmukan konservoitunut histidiini (β 'H936 *E. coli* RNA-polymeraasissa) ohjaa liitettävän nukleotidin oikeaan asentoon RNA:n 3'-päähän hydroksyyliiryhmään nähden katalyysissä (Westover ym. 2004; Vassylyev ym. 2007b).



Kuva 4. Substraatin sitoutuminen RNA-polymeraasin aktiiviseen keskukseen. (Yllä) Kiderakenne, jossa nukleotidianalogi CMPCPP on sitoutuneena *T. thermophilus* RNA-polymeraasin aktiiviseen keskukseen initiaatiokompleksissa (PDB: 5X22). *E. coli* RNA-polymeraasia vastaavat aminohappojen numeroinnit on ilmoitettu sulkeissa. Vetysidokset on esitetty vihreillä katkoviivoilla. CMPCPP keltainen, tDNA emäs (guaaniini) violetti, magnesium musta pallo, β' -alayksikön aminohappotähteet tummanharmaa, β' -alayksikön aminohappotähteet vaaleanharmaa. (Alla) Kaaviokuva nukleotidianalogin CMPCPP sitoutumisesta *T. thermophilus* RNA-polymeraasin aktiiviseen keskukseen. Aminohappojen numerointi vastaa yllä esitettyä mallia. Vetysidokset on esitetty vihreillä katkoviivoilla, "Van der Waals"-vuorovaikutukset on esitetty sinisillä kaarilla. Kaavio on muokattu artikkelista Maffioli ym. 2017.

Aktiiviseen keskukseen sitoutuvat magnesiumionit (I ja II) sekä vesimolekyylit koordinoivat RNA:n 3'-pään hydroksyyliiryhmää ja trifosfaatin happiatomeja katalyysissä (Sosunov ym. 2003; Westover ym. 2004; Vassylyev ym. 2007b). RNA:n 3'-pään hydroksyyliiryhmä (-OH) aktivoituu happo-emäskatalyyysin kautta ja hyökkää liitettävän NTP:n α -fosfaattiin (sokeriosaa lähinnä oleva fosfaatti) S_N2 -nukleofiilisessä hyökkäyksessä (Steitz 1998)(**kuva 5**). Reaktiossa muodostuu fosfodiesterisidos RNA:n 3'-pään OH-ryhmän ja nukleotidin α -fosfaattiin välille. β - ja γ -fosfaatit irtoavat nukleotidista muodostaen sivutuotteena pyrofosfaattia (PP_i), joka poistuu sekundääriskanavan kautta (Da ym. 2012). Nukleotidin liittymisen käänteinen reaktio on pyrofosforolyysi, jossa pyrofosfaatti hyökkää nukleotidien välisen fosfodiesterisidokseen. Tällöin liitetty nukleotidi irtoaa RNA:sta ja samalla muodostuu uudelleen NTP.



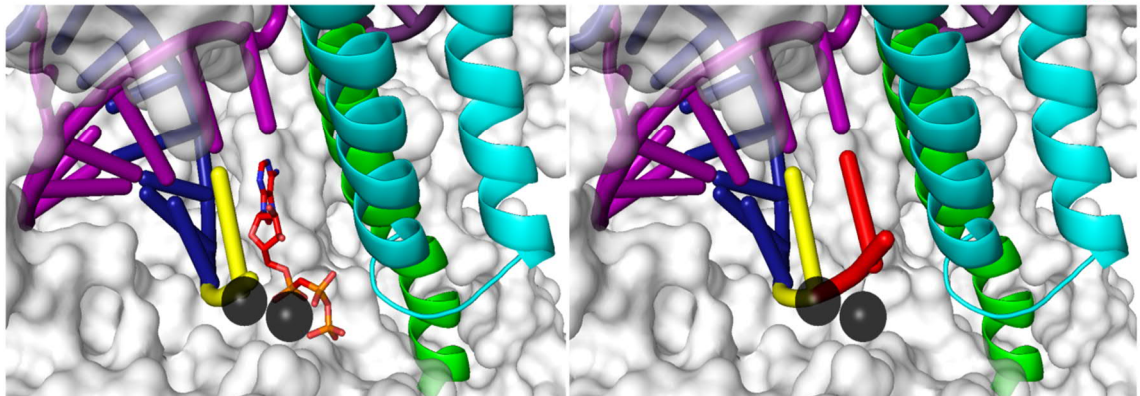
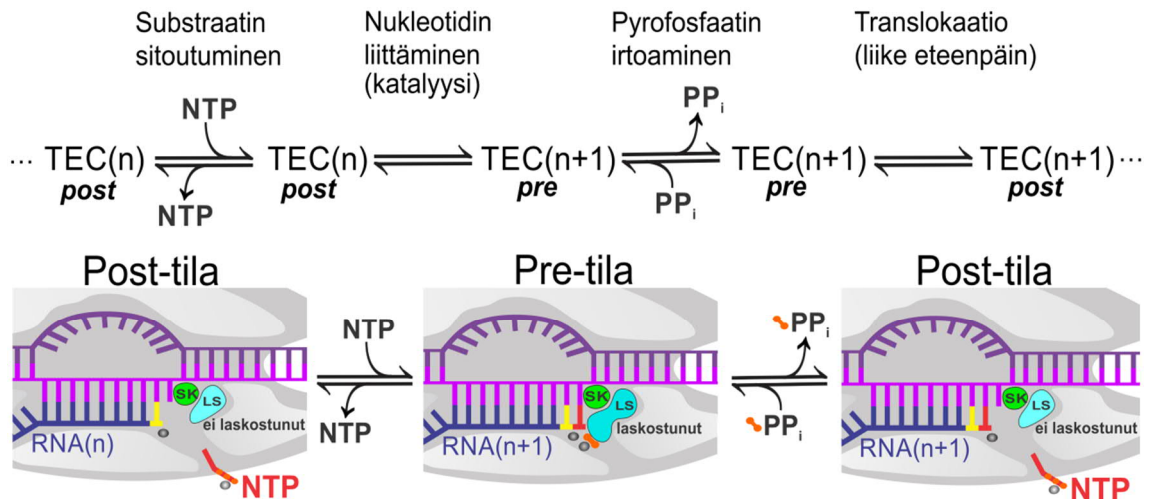
Kuva 5. Katalyyysi eli nukleotidin liittymisen RNA:n 3'-pään S_N2 -nukleofiilisessä hyökkäyksessä. Kuvassa on esitetty katalyyysin reaktiokaavio. Liitettävän nukleotidin osat on värjätty punaisella. Katalyyysiin osallistuvat happo (A) ja emäs (B) on korostettu. Mustat nuolet esittävät nukleotidin liittymisessä tapahtuvaa elektronin siirtoa, harmaat nuolet esittävät käänteisen reaktion eli pyrofosforolyysin elektronin siirtoa. Kuva muokattu artikkelista Mishanina ym. 2017.

Liittyneestä nukleotidista tulee uusi RNA:n 3'-pään nukleotidi, joka peittää $i+1$ -kohdan aktiivisessa keskuksessa. Tässä tilassa RNA ja tDNA muodostavat yhdessä 10 emäsparia pitkän hybridin, jolloin TEC on translokaatiota edeltävässä tilassa (*engl.* "pre-state", tästä eteenpäin "pre-tila"). Katalyysissä muodostunut pyrofosfaatti irtoaa aktiivisesta keskuksesta (Da ym. 2012;

Malinen ym. 2012). Samalla liipaisinsilmukka siirtyy pois aktiivisesta keskuksesta, minkä jälkeen RNA-polymeraasi on valmis translokaatioon eli liikkumaan eteenpäin.

Ennen kuin seuraava nukleotidi voi liittyä RNA:han, RNA-polymeraasin on liikuttava yhden nukleotidin verran eteenpäin, jotta $i+1$ -kohta vapautuisi. Translokaatiossa RNA-polymeraasi liikkuu yhden emäsparin verran eteenpäin kaksijuosteista DNA:ta pitkin. Translokaatio tapahtuu niin kutsutun ”Brownin räikkä” -mekanismin (*engl.* ”Brownian ratchet”) avulla, jossa lämpö tuottaa liike-energian ja aktiivisen keskuksen domeenit ohjaavat RNA-polymeraasin liikettä (Bar-Nahum ym. 2005). RNA-polymeraasin liikkeessä eteenpäin kaksijuosteinen DNA avautuu yhden emäsparin verran alavirrassa siltakierteen kohdalla ja sulkeutuu yhden emäsparin verran ylävirrassa samalla kun RNA ja tDNA erkanevat toisistaan ja RNA:n työntyy poistumiskanavaan (Vassylyev ym. 2007a). Kun RNA-polymeraasi on liikkunut eteenpäin, RNA:n 3’-pään nukleotidi on i -kohdassa, jolloin $i+1$ -kohta on jälleen vapaa seuraavaa NTP:a varten (**kuva 6**). RNA-polymeraasi voi liikkua post- ja pre-translokaatiotilan välillä ennen seuraavan nukleotidin liittämistä, mutta post-translokaatiotila on pre-translokaatiotilaa huomattavasti stabiilimpi (Nedialkov ym. 2012, Malinen ym. 2012). Eräiden RNA-polymeraasi-inhibiittorien toiminta perustuu TEC:n eri translokaatiotilojen stabiloimiseen, mikä estää nukleotidin liittymissyklin etenemistä. Esimerkiksi *Pseudomonas syringae pv. tagetis* -bakteerin tuottama tagetitoksiini (Mitchell and Durbin 1981) on RNA-polymeraasi-inhibiittori, joka stabiloi voimakkaasti pre-translokaatiotilaa *E. coli* RNA-polymeraasissa näin estäen TEC:n siirtymistä muihin konformaatioihin (Malinen ym. 2012).

RNA-tDNA-hybridin emäsjärjestys vaikuttaa transkription pidennysvaiheen nopeuteen useilla eri tavoilla. RNA:n ja tDNA:n väliset GC-emäsparit kasvattavat hybridin stabiilisuutta (Palangat & Landick, 2001), sillä guaniinin ja sytosiinin välille muodostuu kolme vetysidosta siinä missä adeniinin ja tyymiinin välille muodostuu vain kaksi. Liitettävän nukleotidin emäsosa vaikuttaa myös merkittävästi siihen, miten nopeasti se liitetään kasvavaan RNA-juosteeseen (Kireeva & Kashlev, 2009; Malinen ym. 2012) ja miten nopeasti RNA-polymeraasi translokoi pidennettyään RNA:ta (Hein ym. 2011).



Post-tila, NTP sitoutunut $i+1$ -kohtaan Pre-tila, NTP liittynyt RNA:n 3'-päähän

Kuva 6. Yhteenveto nukleotidin liittymissyklistä. (Yllä) Kaikki nukleotidin liittymissyklin vaiheet ja niiden selitykset. Kuvassa esitetty yhden nukleotidin liittymistä vastaavat reaktiot. RNA:n pituus on ilmoitettu suluissa. (Keskellä) Kaavio RNA-polymeraasin aktiivisesta keskuksesta syklin alussa, katalyysin jälkeen, ja syklin lopussa. Siltakierre (SK, vihreä) ja liipaisinsilmukka (LS, syaani) on korostettu, liipaisinsilmukan konformaatio on ilmoitettu. Keltaisella merkitty ribonukleotidi osoittaa RNA:n 3'-pään aseman ennen seuraavan nukleotidin (NTP, punainen) liittymistä. (Alla) Rakennemalli RNA-polymeraasin aktiivisesta keskuksesta post-tilassa ja pre-tilassa. Vasemmalla NTP (ampcpp, punainen) on sitoutunut aktiiviseen keskukseen TEC:n ollessa post-tilassa. Oikealla TEC on katalyysin jälkeen pre-tilassa. Kuvan rakennemallit on muokattu artikkelissa Turtola & Belogurov 2016 esitetystä rakennemallista.

1.4 Peruutustilassa RNA:n synteesi estyy

Kuten edellä on esitetty, RNA-polymeraasin liikkuminen DNA:ta pitkin perustuu lämpöenergiaan eikä siten vaadi kytkeytymistä korkeaan energiin reaktioihin. RNA-polymeraasi voi siis liikkua edestakaisin DNA-juostetta pitkin yhden tai useamman nukleotidin verran ja liikkuessaan takaperin useamman kuin yhden

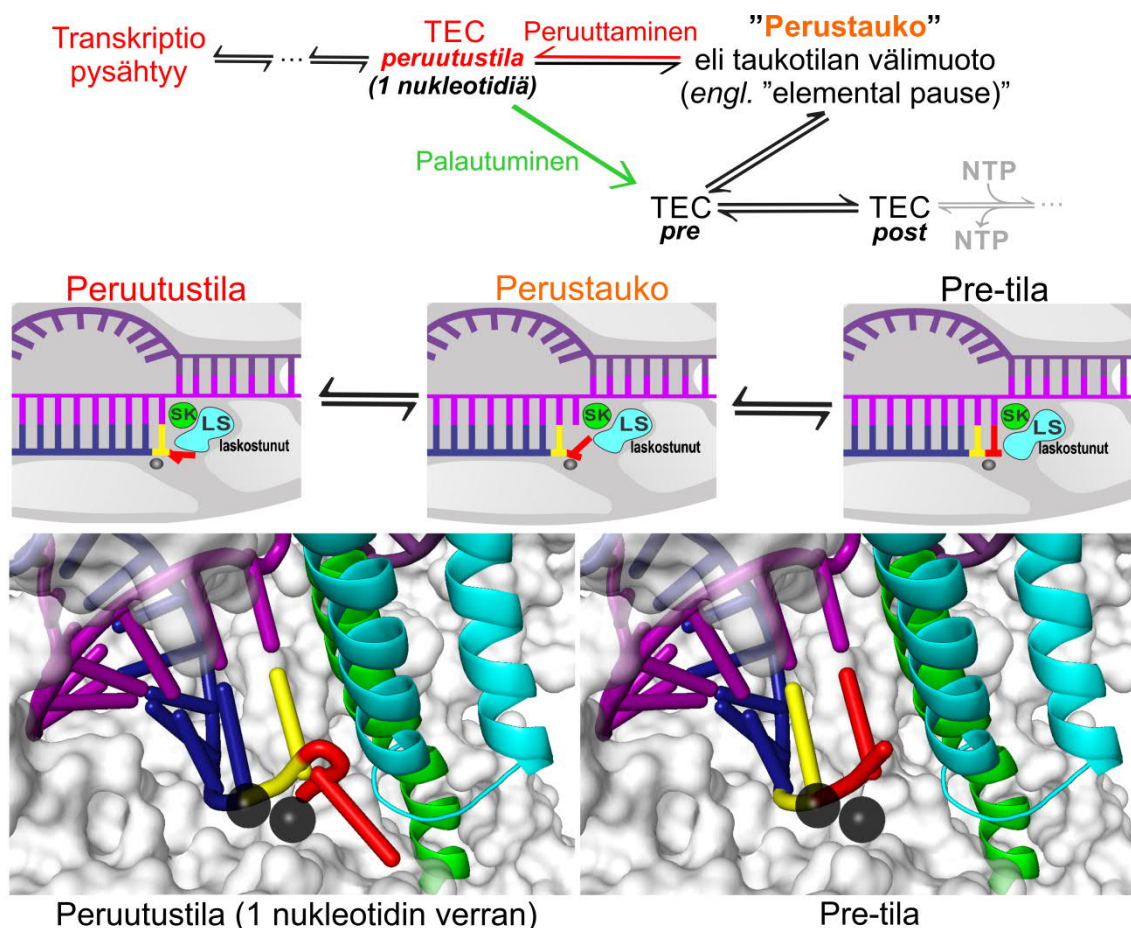
nukleotidin verran se päättyy nukleotidin liittymissyklistä poikkeavaan konformaatioon: peruutustilaan (Komissarova & Kashlev, 1997; Nudler ym., 1997).

1.4.1 Peruutustilan muodostuminen

Peruuttaessaan RNA-polymeraasi liikkuu kaksijuosteista DNA:ta pitkin taaksepäin, jolloin myös syntetisoitavan RNA:n 3'-pää liikkuu kohti sekundäärikanavaa, jonka kautta nukleotidit normaalisti kulkeutuvat aktiiviseen keskukseen (Komissarova & Kashlev, 1997; Nudler ym. 1997). Kuten pre-tilassa, peruutustilassa RNA ja tDNA ovat hybridisoituneet 10 emäsparin verran, mutta RNA:n 3'-päässä yksi tai useampi nukleotidi on työntynyt ohi *i+1*-kohdasta (**kuva 7**). Peruutustilassa RNA peittää *i+1*-kohdan, minkä takia seuraava NTP ei pääse sitoutumaan aktiiviseen keskukseen. Peruutustilassa RNA:n synteesi siis pysähtyy.

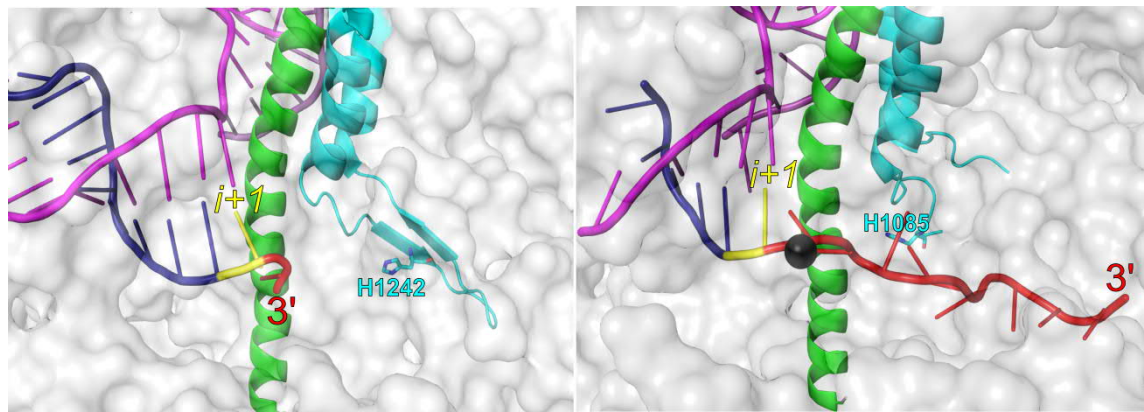
Peruutustilan ja kaikkien muiden RNA-polymeraasin pysähdysten oletetaan tapahtuvan niin kutsutun ”perustauon” (*engl.* ”elemental pause” tai ”ubiquitous pause”) kautta, jossa pre-translokaatiotilassa olevan TEC:n RNA:n 3'-pää on taipunut pois päin tDNA:sta (*engl.* ”frayed state”)(Herbert ym. 2006; Toulkhov ym. 2007; Kireeva & Kashlev, 2009; Weixlbaumer ym. 2013). Perustauon kesto on lyhyt (Neuman ym. 2003), mutta 3'-pään nukleotidin taipuminen estää seuraavan nukleotidin liittämistä kasvattaen siten peruutustilaan ja muihin pitkäkestoisiin pysähdyksiin päätyminen todennäköisyyttä.

Peruutustilan muodostumiseen vaikuttaa RNA-DNA-hybridin stabiilisuus: mitä heikompia RNA:n ja DNA:n väliset vuorovaikutukset ovat, sitä todennäköisemmin RNA-polymeraasi ohjautuu peruutustilaan (Nudler ym. 1997). Esimerkiksi pariutumaton nukleotidi RNA:n 3'-päässä (Sydow ym. 2009; Imashimizu ym. 2013; Imashimizu ym. 2015) ja RNA-polymeraasin pysähtymistä indusoivat RNA-juosteet (Larson ym. 2014) voivat heikentää hybridin rakennetta, mikä kasvattaa peruuttamisen todennäköisyyttä. Peruutustilaan päätyminen jokaisen liitettävän nukleotidin kohdalla on epätodennäköistä, mutta sitä tapahtuu satunnaisesti transkription aikana.



Kuva 7. Peruutustilassa RNA-polymeraasi poistuu nukleotidin liittymissyklistä. Kuvassa on esitetty reaktiokaavio ja poikkileikkauskaavio peruuttamisesta sekä rakennemalli pre-tilasta ja peruutustilasta, jossa RNA-polymeraasi on peruuttanut yhden nukleotidin verran. RNA:n 3'-pään nukleotidi on värjätty punaisella ja toiseksi viimeinen nukleotidi keltaisella. Siltakierre (SK, vihreä) ja liipaisinsilmukka (LS, syaani) on korostettu, liipaisinsilmukan konformaatio on ilmoitettu. Pre-tilassa viimeinen nukleotidi on i+1-kohdassa, kun taas peruutustilassa nukleotidi on työntynyt ohi i+1-kohdasta. Kuvan rakennemallit on muokattu artikkelissa Turtola & Belogurov 2016 esitetystä rakennemallista.

RNA-polymeraasi voi peruuttaa yhden tai useamman nukleotidin verran (**kuva 8**). Lyhyissä peruutustiloissa RNA-polymeraasi viipyy 1-7 sekuntia (Shaevitz ym. 2003). Pidempiä peruutustiloja muodostuu harvemmin (noin 5 % kaikista havaituista pysähtymisistä) ja niiden kesto voi olla jopa 20 sekuntia tai enemmän (Shaevitz ym. 2003, Abbodanzieri ym. 2005). Hiivan Pol II:n on havaittu peruuttavan jopa 9 nukleotidin verran, jolloin pitkälle sekundäärikanavaan päätyneyt RNA voi vuorovaikuttaa sellaisten aminohappojen kanssa, joiden kanssa se ei normaalisti olisi kontaktissa (Cheung & Cramer, 2011).



T. thermophilus RNAP
1 nukleotidin peruutustila

S. cerevisiae Pol II
9 nukleotidin peruutustila

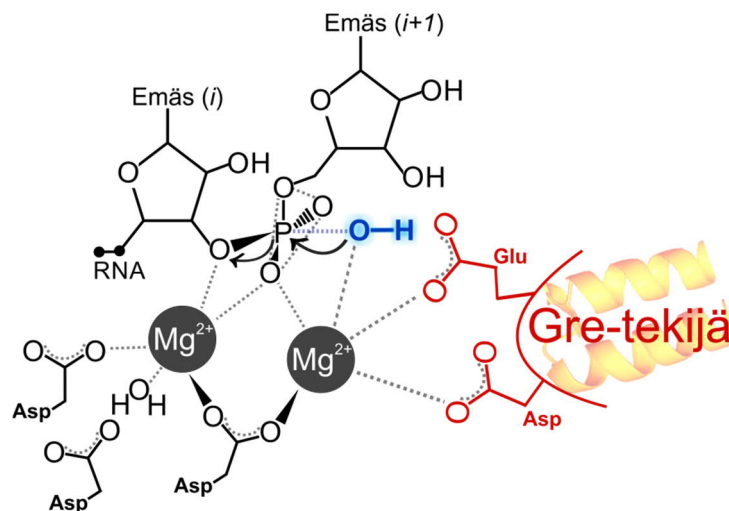
Kuva 8. Kiderakenteita eripituisista peruutustiloista. Molemmissa rakenteissa nukleiinihapot sekä domeenit on värjätty samalla värillä (RNA tummansininen, tDNA violetti, siltakierre vihreä, liipaisinsilmukka syaani). Peruutustilassa olevat RNA:n nukleotidit on värjätty punaisella, i+1-kohdassa oleva nukleotidi on värjätty keltaisella. Liipaisinsilmukan konservoitunut histidiini (*T. thermophilus* β' H1242 ja *S. cerevisiae* Rbp1 H1085) ja RNA:n 3'-pää on korostettu. (Vasen) *T. thermophilus* RNA-polymeraasi yhden nukleotidin pituisessa peruutustilassa (PDB: 4WQS). (Oikea) Hiivan Pol II 9 nukleotidin pituisessa peruutustilassa (PDB: 3PO2).

Transkriptiossa nukleotidin liittäminen ja TEC:n pysähtely kilpailevat keskenään, jolloin kaikki nukleotidin liittämistä hidastavat tekijät lisäävät myös pysähtelyä ja peruutustilaa. Esimerkiksi nukleotidien puute solussa (Dangkulwanich ym. 2013), kromatiiniin sitoutuvat proteiinit (Kotlajich ym. 2015), ja vauriot DNA:ssa (Charlet-Berguerand ym. 2006) kasvattavat RNA-polymeraasin peruuttamisen todennäköisyyttä hidastamalla transkriptiota.

1.4.2 Peruutustilasta palautuminen takaisin nukleotidin liittymissykliin

Jotta RNA:n synteesi voisi jatkua, RNA-polymeraasin on ohjattava RNA:n 3'-pää takaisin katalyyttiseen kohtaan. Lyhyistä peruutustiloista (yksi tai muutama nukleotidiä) RNA-polymeraasi voi paeta liikkumalla eteenpäin useita kertoja, kunnes RNA:n 3'-pää siirtyy oikeaan asemaan. RNA-polymeraasi voi paeta niin lyhyistä kuin pitkistäkin peruutustiloista leikkaamalla nukleotidejä sekundäärikanavassa olevan RNA:sta, kunnes katalyyttinen kohta vapautuu. RNA-polymeraasin aktiivinen keskus omaa RNAasiaktiivisuuden, jonka avulla se voi leikata RNA:ta (Orlova ym. 1995; Zenkin ym. 2006; Sydow ym. 2009). RNA:n leikkautumismekanismissä on esitetty pyrofosforolyysin kaltaista

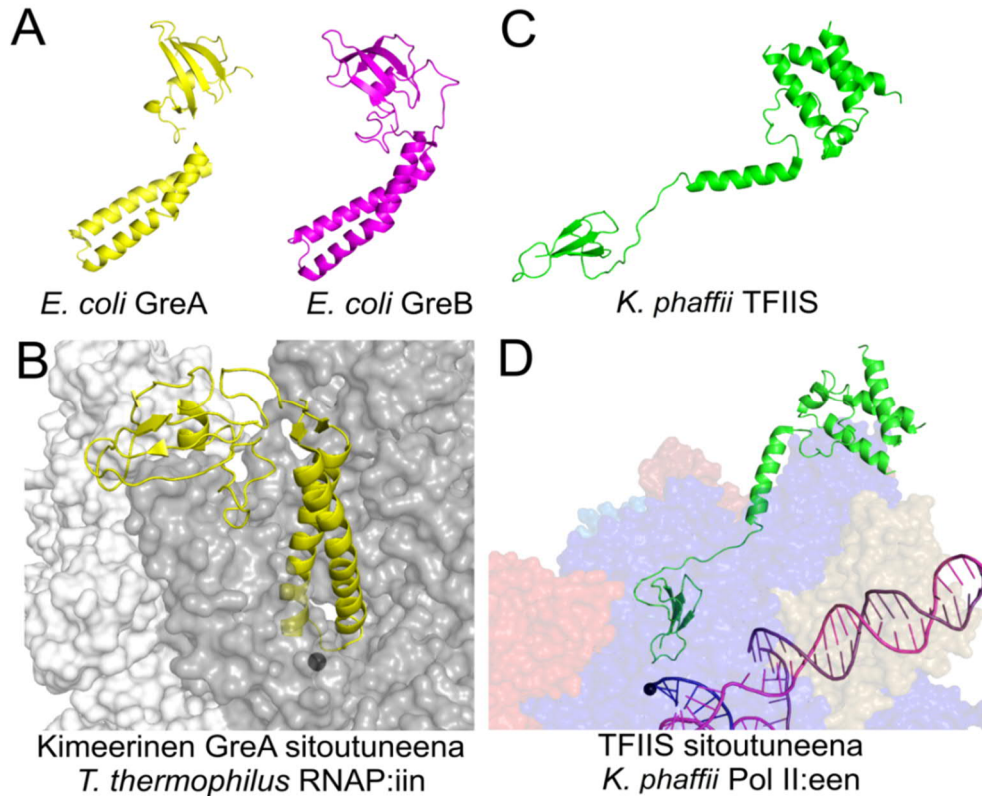
reaktiota, jossa happo-emäskatalyyysin kautta aktivoitu vesimolekyyli hyökkää nukleofiilisesti $i+1$ - ja i -kohtien välissä olevaan fosfodiesterisidokseen, joka katkeaa irrottaen yhden tai useamman nukleotidin RNA:n 3'-pästä (**kuva 9**)(Sosunov ym. 2003). RNA leikkautuu $i+1$ - ja i -kohdassa olevien nukleotidien välistä eli samasta kohdasta, jossa fosfodiesterisidos muodostuu katalyyysissä. Happo-emäskatalyyysiin osallistuvia aminohappoja ei ole toistaiseksi paikannettu aktiivisesta keskuksesta, mutta liipaisinsilmukan on osoitettu osallistuvan leikkautumisreaktion ohjaamiseen (Yuzenkova & Zenkin, 2010; Mishanina ym. 2017). Magnesiumionit katalysoivat RNA:n leikkautumista ohjaten nukleofiilin ja katkeavan fosfodiesterisidoksen oikeaan asemaan (Sosunov ym. 2003).



Kuva 9. Peruutustilassa olevan RNA:n leikkautumisen mekanismi. Kaavio esittää tilaa, jossa nukleofiili (kuvassa hydroksidi-ioni, sininen) hyökkää kahden ribonukleotidin väliseen fosfodiesterisidokseen katkaisten yhden tai useamman ribonukleotidin irti RNA:sta riippuen RNA-polymeraasin translokaatiotilasta. Magnesiumionit katalysoivat leikkautumisreaktiota koordinoimalla fosfodiesterisidoksen ja nukleofiilin asemaa. Aktiivisen keskuksen aspartaattitriadi sitoo magnesium-ioneja ja Gre-tekijän aminohappotähteet koordinoivat toisen magnesiumionin asemaa tehostaen leikkautumista. Kuva on muokattu artikkelista Sosunova ym. 2003.

RNA-polymeraasin omaa RNAasiaktiivisuuden lisäksi leikkaamistekijöiksi kutsutut proteiinit tehostavat RNA:n leikkautumista näin auttaen RNA-polymeraasia pakenemaan peruutustilasta. Bakteerit ilmentävät leikkaamistekijöitä GreA ja GreB (Borukhov ym. 1993), arkit ilmentävät tekijää TFS (Hausner ym. 2000), ja eukaryootit ilmentävät tekijää TFIIS (Izban & Luse 1992)(**kuva 10**). Leikkaamistekijät sitoutuvat RNA-polymeraasiin ja työntävät

kärkiosansa aktiiviseen keskukseen sekundäärikanavan kautta (**kuva 10B ja 10D**)(Kettenberger ym. 2004; Sekine ym. 2015; Ehara ym. 2017). Tällä tavoin leikkaamistekijät tuovat aktiiviseen keskukseen aminohappoja, jotka stabiloivat leikkautumista katalysoivaa magnesiumionia tehostaen leikkautumista (katso **kuva 9**)(Sosunova ym. 2003).



Kuva 10. Bakteerien ja eukaryoottien transkription leikkaamistekijöiden rakenne. (A) Bakteerin (*E. coli*) leikkaamistekijöiden GreA (keltainen, PDB: 1GRJ) ja GreB (purppura, PDB: 2P4V) rakenne. (B) Malli, jossa kimeerinen GreA on sitoutuneena *T. thermophilus* RNA-polymeraasiin (PDB: 4WQT). Aktiiviseen keskukseen sitoutunut magnesiumioni (musta pallo) on korostettu. (C) Eukaryootin (Komagataella phaffii) leikkaamistekijän TFIIIS rakenne (vihreä, PDB: 5XON). (D) Rakennemalli, jossa TFIIIS on sitoutuneena Pol II:n elongaatiokompleksiin (PDB: 5XON).

Bakteerien leikkaamistekijät GreA ja GreB ovat rakenteellisesti hyvin samankaltaisia, mutta ne ohjaavat RNA:n leikkautumista eri tavoin. GreA indusoi RNA:n leikkautumista muutaman nukleotidin verran, kun taas GreB kykenee indusoimaan jopa yhdeksän nukleotidin leikkautumista kerrallaan vapauttaen RNA-polymeraasin hyvinkin stabiileista peruutustiloista (Borukhov ym. 1993; Marr & Roberts, 2000). Tehostamalla leikkautumisen katalyysiä leikkaamistekijät nopeuttavat siis koko transkriptiota (Yuzenkova ym. 2014).

1.5 Peruutustilan merkitys transkriptiossa

Peruutustila estää RNA:ta pidentymästä pysäyttäen transkription väliaikaisesti. Peruutustila on kuitenkin olennainen osa transkription säätelyä ja oikolukumekanismia. Lisäksi peruutustilalla voi olla haittavaikutuksia esimerkiksi DNA:n replikaation aikana. Seuraavaksi perehdyn tutkielmassani erilaisiin transkription aikaisiin tapahtumiin, joissa peruutustilalla on keskeinen rooli.

1.5.1 Transkription oikoluku parantaa RNA:n synteessin tarkkuutta

RNA-polymeraasi on kehittynyt rakenteellisesti siten, että se voi tarkkaan valikoida RNA:han liittyvät substraatit (katso luku 1.3). Tästä huolimatta RNA-polymeraasi voi satunnaisesti liittää väärän nukleotidin RNA:n 3'-päähän. Väärin syntetisoidut lähetti-RNA:t voivat johtaa virheellisten proteiinien tuottamiseen ja siten aiheuttaa vahinkoa solulle. Parantaakseen transkription tarkkuutta entisestään RNA-polymeraasi voi oikolukea syntetisoimaansa RNA-juostetta (Zenkin ym. 2006; Sydow 2009; Imashimizu ym. 2013). Transkription oikoluvussa (*engl.* "transcriptional proofreading") RNA-polymeraasi peruuttaa ja leikkaa väärän nukleotidin irti RNA:sta (katso luku 1.4.2). RNA-polymeraasi peruuttaa herkästi liitettyään väärän nukleotidin RNA:han, koska väärä emäspari RNA:n 3'-päässä destabiloi RNA-tDNA-hybridin. Peruutustilassa RNA-polymeraasi leikkaa väärän nukleotidin irti RNA:sta, minkä jälkeen se voi yrittää uudelleen liittää oikean nukleotidin RNA:n 3'-päähän. Substraatin selektiosta ja transkription oikoluvusta johtuen RNA-polymeraasi liittää väärän nukleotidin RNA-juosteeseen arviolta vain joka 10^5 – 10^6 nukleotidin välein (Gou ym. 2013; Imashimizu ym. 2013). Oikolukua on tutkittu *E. coli* -kannoissa, joissa Gre-tekijät on poistettu. Näissä kannoissa lopulliset RNA-transkriptit sisältävät enemmän virheitä (Imashimizu ym. 2015; Bubunenکو ym. 2017), mikä osoittaa RNA:n leikkautumisen olevan keskeisessä asemassa RNA:n synteessin tarkkuudessa ja siten koko solun toiminnan ylläpidossa. Bakteereilla transkription oikoluku voi myös toimia mahdollisena resistenssimekanismina RNA:n synteesiä inhiboiville nukleosidianalogeille, joita kehitetään antibiooteiksi patogeenisiä bakteereja vastaan.

1.5.2 RNA-polymeraasin pysähtely säätelee transkription nopeutta

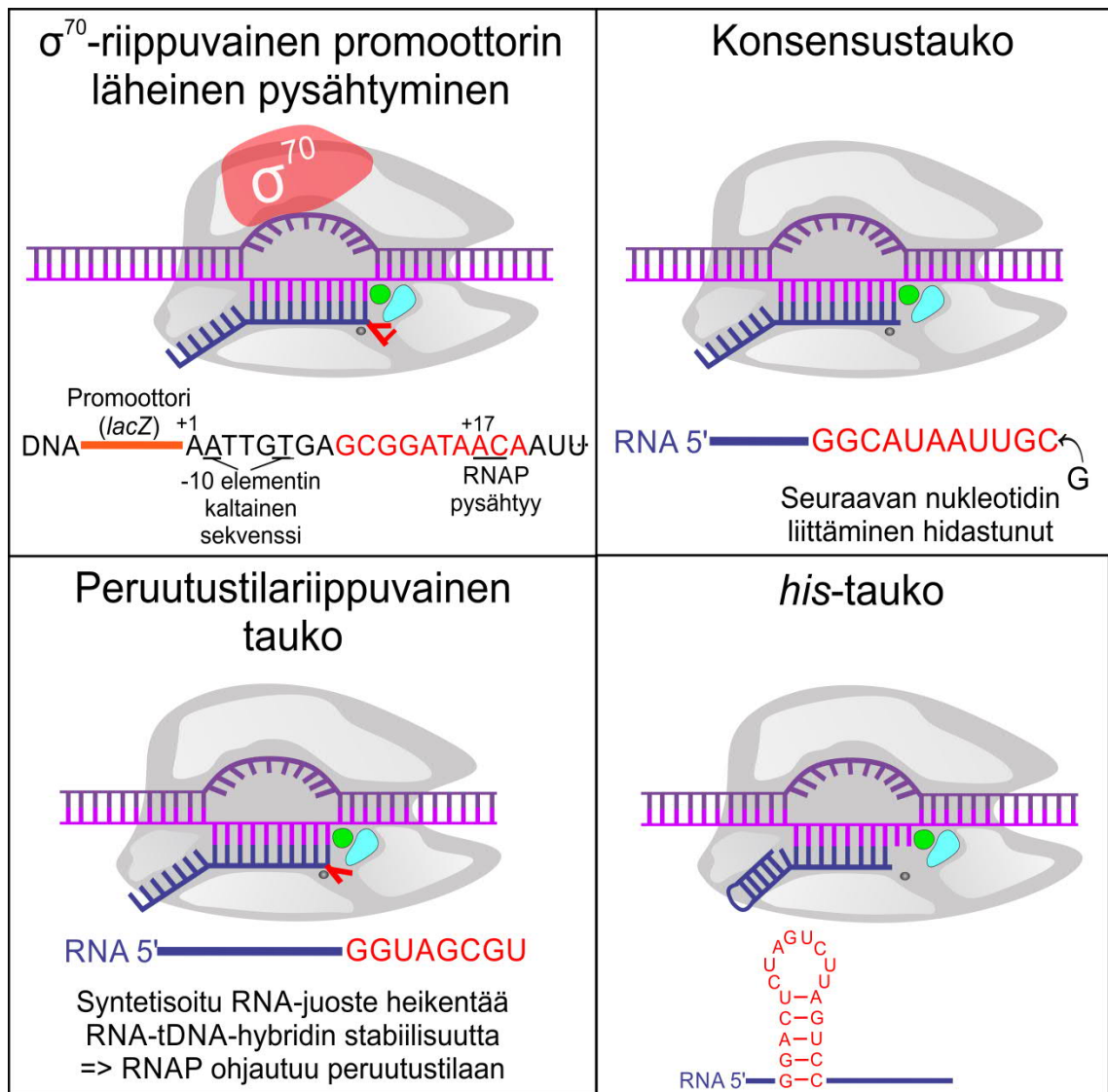
Transkriptiota tutkittaessa on havaittu lukuisia erilaisia RNA-sekvenssejä, jotka hidastavat RNA:n synteesiä huomattavasti. RNA-polymeraasin pysähtelystä johtuen RNA:n synteesin nopeus ei ole vakio vaan vaihtelee geenistä riippuen. RNA-polymeraasin pysähtelyä tapahtuu arviolta 100 emäsparin välein transkription aikana (Neuman ym. 2003), joten sen on katsottu olevan yksi tapa säädellä geenien ilmenemisen nopeutta. Tähän mennessä on havaittu rakenteeltaan ja vaikutuksiltaan erilaisia RNA-polymeraasin pysähtymistä indusoivia taukosekvenssejä, joista osassa RNA-polymeraasi ohjautuu peruutustilaan ja osassa se pysähtyy muulla tavalla (**kuva 11**).

Promoottorin läheisessä pysähtymisessä (*engl.* "promoter proximal pausing") RNA-polymeraasi siirtyy peruutustilaan lähes välittömästi transkription aloitusvaiheen jälkeen. Tätä on havaittu eräillä bakteereilla (σ^{70} -riippuvainen pysähtyminen *E. coli* bakteerissa)(Ring ym. 1996; Perdue & Roberts, 2011) ja eukaryooteilla, kuten banaanikärpäsellä ja monilla nisäkkäillä (Rasmussen & Lis, 1993; Min ym. 2011). Peruutustilan stabiilisuutta promoottorin läheisessä pysähtymisessä lisää se, että aikaisin pysähtyvät RNA-polymeraasit estävät muita polymeraaseja sitoutumasta promoottoriin, jolloin eteenpäin työntäviä tekijöitä, kuten muita RNA-polymeraaseja ja ribosomeja, ei ole pakottamassa RNA-polymeraasia pois tauosta. Lisäksi RNA-polymeraasin vuorovaikutukset aloitustekijöiden ja promoottorin kanssa ikään kuin vetävät RNA-polymeraasia taaksepäin. Tietyissä promoottoreissa *E. coli* RNA-polymeraasi syntetisoi 15–25 emäsparia pitkän RNA-juosteen ja pysähtyy, kun transkription aloitustekijä σ^{70} sitoutuu promoottorin "-10" ja "-35" konsensus-elementtejä muistuttaviin DNA:n emäsjaksoihin (Ring ym. 1996; Perdue & Roberts, 2011). Näissä tauoissa RNA-polymeraasin on osoitettu stabiloituvan peruutustilaan RNA-sekvenssin ohjaamana. Leikkaamistekijät GreA ja GreB helpottavat *E. coli* RNA-polymeraasin vapautumista promoottorin läheisestä tauosta stimuloimalla RNA:n leikkautumista (Stepanova ym. 2009).

Banaanikärpäsen ja nisäkkäiden Pol II voi syntetisoida 20-60 emäsparia pitkän RNA-juosteen ja sitten pysähtyä siirtyessään peruutustilaan transkriptiotekijöiden ohjaamana. Tämän pysähdyksen mekanismi ja säätely kuitenkin poikkeavat bakteereilla havaitusta promoottorin läheisestä pysähtymisestä. Transkriptiotekijät DSIF ja NELF yhdessä lisäävät promoottorin läheistä pysähtymistä (Wu ym. 2003; Lee ym. 2008; Core ym. 2012) ja transkriptiotekijän PAF1:n on havaittu ylläpitävän pysähtymistä ollessaan sitoutuneena Pol II:een (Chen ym. 2015). Kinaasi P-TEFb puolestaan auttaa Pol II:ta vapautumaan promoottorin läheisestä pysähdyksestä (Ni ym. 2008). Promoottorin läheistä pysähtymistä on havaittu jopa tuhansien geenien yhteydessä selkäjänteisillä (Core ym. 2008; Min ym. 2011), mikä tekee siitä merkittävän geeninsäätelymekanismin.

Kuten edellä on kuvattu, kaikkien RNA-polymeraasin pysähtymisten oletetaan tapahtuvan lyhytaikaisen perustauoksi kutsutun tilan kautta, joka voi isomerisoitua pitkäkestoiseksi tauoksi, kuten peruutustilaksi tai *his*-tauoksi, riippuen syntetisoidun RNA:n sekvenssistä (katso luku 1.4.1, sivu 19). RNA-polymeraasi ajautuu peruutustilaan syntetisoidessaan RNA-tDNA-hybridin stabiilisuutta heikentävän RNA-transkriptin (Nudler ym. 2017). Konsensustauossa eri eliöiden RNA-polymeraasit pysähtyvät eri tavoin. Naudan Pol II ohjautuu konsensustauossa peruutustilaan, kun taas erisukuisten bakteerien RNA-polymeraasit pysähtyvät tavallista stabiilimpaan pre-tilaan (Larson ym. 2014).

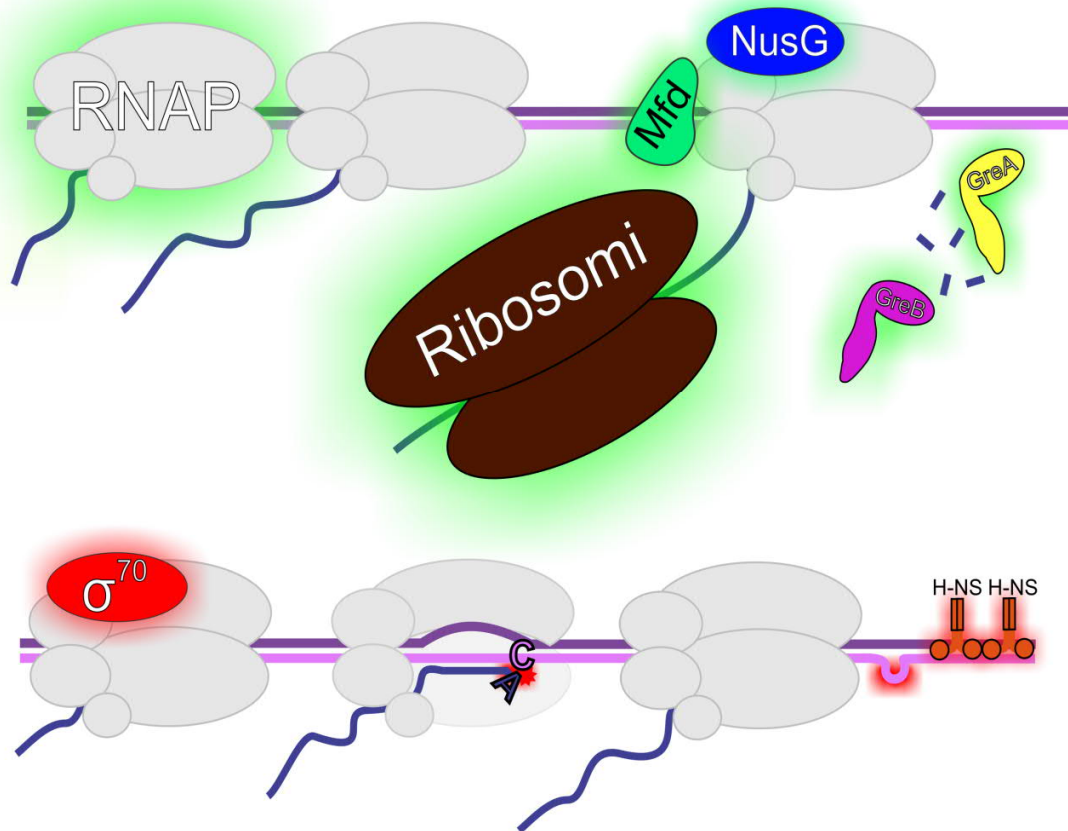
Peruutustilasta riippumattomassa *his*-tauossa RNA-polymeraasi syntetisoi käänteisen sekvenssin sisältävän RNA-transkriptin, joka voi hybridisoitua itsensä kanssa RNA:n poistumiskanavassa (ei tule sekoittaa luvussa 1.2.3 esitettyyn terminaatiohiuspinniin). Viimeaikaisissa kiderakenteissa on havaittu, että *his*-tauossa olevan TEC:n RNA on siirtynyt post-translokaatiotilaan, mutta tDNA pysyy pre-translokaatiotilassa tai translokoi vain osittain (Kang ym. 2018, Guo ym. 2018). Pysähtyminen *his*-tauossa johtuu siis tDNA:n ja RNA:n kallistumisesta toisiinsa nähden, mikä estää seuraavan nukleotidin liittymisen.



Kuva 11. Taukosekvenssit säätelevät transkription nopeutta. Kuvissa on esitetty kaavioita *E. coli* RNA-polymeraasista eri tauoissa sekä esimerkkejä RNA-polymeraasin pysähtymistä indusoivista DNA- ja RNA-sekvensseistä. Tauon muodostumista edistävät nukleotidit sekvensseissä on korostettu punaisella.

Kuten edellä on kuvattu, peruutustilaan ajautuminen hidastaa koko transkriptiota. Aktiivisen transkription aikana lukuisat tekijät voivat kuitenkin estää RNA-polymeraasin satunnaista peruuttamista (**kuva 12**). Soluissa tehokkaasti ilmenevää geeniä voi kerrallaan lukea monta RNA-polymeraasimolekyyliä. Yksi RNA-polymeraasi voi liikkuessaan eteenpäin tuottaa 20–30 pN eteenpäin työntävää voimaa (Wang ym. 1998), mikä riittää auttamaan esteen kohdanneen RNA-polymeraasin pois peruutustilasta (Epshtein & Nudler, 2003; Jin ym. 2010). Koska geeniä lukevien RNA-

polymeraasien lukumäärä riippuu transkription aloitusvaiheen tehokkuudesta, tehokas promoottori nopeuttaa koko transkriptiota vähentämällä peruutustilaan siirtymistä koko geenin matkalta (Epshtein & Nudler, 2003).



Kuva 12. RNA-polymeraasin peruutustilaan vaikuttavat tekijät. Transkription aikana monet tekijät vaikuttavat peruutustilan määrään näin säädellen koko transkription nopeutta. (Yllä) E. coli RNA-polymeraasin peruutustilaa vähentävät tekijät (korostettu vihreällä). Toiset RNA-polymeraasit (RNAP) ja ribosomit voivat työntää RNA-polymeraasia eteenpäin estäen peruuttamista (Epshtein ym. 2003; Proshkin ym. 2010). E. coli NusG estää peruutustilaan siirtymistä pidennysvaiheessa (Turtola & Belogurov, 2016). Indusoimalla RNA:n leikkaamista Gre-tekijät vapauttavat RNA-polymeraasin peruutustilasta nopeuttaen transkriptiota (Yuzenkova ym. 2014). Translokaasi Mfd voi pakottaa pysähtyneen RNA-polymeraasin eteenpäin (Adebali ym. 2017). (Alla) E. coli RNA-polymeraasin peruutustilaa lisäävät tekijät (korostettu punaisella). Aloitustekijä σ^{70} voi ohjata RNA-polymeraasin peruuttamaan promoottorin läheisyydessä (Perdue & Roberts, 2011). Väärät emäsparit (kuten rA-dC-pari kuvassa) destabiloivat RNA-tDNA-hybridä ohjaten RNA-polymeraasin peruutustilaan (Zenkin ym. 2006). Vauriot DNA:ssa (Tornaletti & Hanawalt, 1999) tai DNA:han sitoutuvat proteiinit (H-NS kuvassa) (Kotlajich ym. 2015) voivat toimia esteenä RNA-polymeraasille kasvattaen peruuttamisen todennäköisyyttä.

Bakteereilla on myös toinen RNA-polymeraasia eteenpäin työntävä tekijä: ribosomit. Bakteereilla sekä transkriptio että translaatio tapahtuvat samaan aikaan sytoplasmassa, jolloin lähetti-RNA:ta pitkin kulkevat ribosomi voi työntää RNA-polymeraasia eteenpäin pakottaen sen pois peruutustilasta, mikä tehostaa transkriptiota entisestään (Proshkin ym. 2010). Transkriptiotekijät, kuten *E. coli* NusG (Turtola & Belogurov, 2016), voivat myös estää peruutustilaan ajautumista. NusG on transkription pidennysvaiheessa toimiva transkriptiotekijä, joka muun muassa toimii linkkinä RNA-polymeraasin ja lähetti-RNA:ta lukevan ribosomin välillä (Burmam ym. 2010). *E. coli* NusG estää myös satunnaista peruuttamista stabiloimalla RNA-polymeraasin ylävirran DNA:ta, mikä tehostaa transkription pidennysvaihetta (Turtola & Belogurov, 2016; Herbert ym. 2010).

1.5.3 Peruutustila osana transkriptioon kytkettyä DNA-vaurioiden korjausta

Solut käyttävät runsaasti energiaa DNA-vaurioita korjaavien entsyymien tuottamiseen ylläpitääkseen genomien integriteettiä ja varmistaakseen, että genomi kahdentuu oikein ennen solunjakautumista. RNA-polymeraasit käyvät läpi tuhansien geenien edestä kaksijuosteista DNA:ta syntetisoidessaan RNA:ta, minkä takia transkriptio on eliökunnan kehityksen aikana kytkeytynyt myös DNA-vaurioiden havaitsemiseen ja korjaamiseen. Kohdatessaan vaurion prokaryoottien ja eukaryoottien RNA-polymeraasit kykenevät rekrytoimaan transkriptiotekijöiden välityksellä DNA-vaurioita korjaavia NER-tekijöitä (*engl.* "nucleotide excision repair factors").

Kohdatessaan DNA-vaurion RNA-polymeraasi pysähtyy ja peruuttaa peittäen vaurioalueen. RNA-polymeraasi on siirrettävä pois NER-tekijöiden tieltä, jotta ne pääsevät korjaamaan vaurion. Parhaiten tunnetussa reaktiotiessä transkriptiotekijä Mfd sitoutuu ylävirran DNA:han ja työntää ATP:n hydrolyysistä saamansa energian avulla RNA-polymeraasia eteenpäin lopulta työntäen sen kokonaan pois DNA-templaattista (Adebali ym. 2017). RNA-polymeraasin poistuttua Mfd rekrytoi korjaustekijän UvrA käynnistämään DNA-vaurion korjaukseen vaadittavan reaktiotien. Vaihtoehtoiseksi reaktiotieksi on esitetty, että NusA auttaisi NER-tekijää UvrD sitoutumaan pysähtyneeseen RNA-polymeraasiin,

minkä jälkeen tämä pakottaisi RNA-polymeraasia peruuttamaan useiden nukleotidien verran pois vaurioalueelta (Ephstein ym. 2014). Molemmissa reaktioteissa RNA-polymeraasi siirretään pois vauriota korjaavien tekijöiden tieltä. Merkittävä ero reaktioteiden välillä on se, että toisessa transkriptio keskeytyy RNA-polymeraasin irrotessa DNA:sta, kun taas toisessa RNA-polymeraasi pakotetaan peruuttamaan pois vaurion luota. Peruutustilaan päätyminen pysäyttää transkription väliaikaisesti, mutta RNA-polymeraasi voi edelleen jatkaa RNA:n synteesiä vaurion korjaamisen jälkeen.

1.5.4 Peruutustila aiheuttaa DNA-vaurioita RNA-polymeraasin ja replisomin välisissä yhteentörmäyksissä

Replisomi kahdentaa DNA:ta solun valmistautuessa jakautumiseen. Replisomi käy läpi kaiken DNA:n, jolloin se väistämättä kahdentaa myös geenejä, joita RNA-polymeraasit samaan aikaan transkriptoivat. Tästä syystä replisomi ja RNA-polymeraasi aika ajoin törmäävät toisiinsa. Replisomi ja RNA-polymeraasi voivat kulkea toistensa suhteen joko vastakkaisiin suuntiin tai samaan suuntaan. Solu priorisoi DNA:n kahdentamista, joten kohdatessaan pysähtyneen TEC:n replisomi pyrkii dissosioimaan RNA-polymeraasin pois DNA:sta voidakseen jatkaa DNA:n kahdentamista. Yhdensuuntaisissa yhteentörmäyksissä replisomi työntää RNA-polymeraasin vaivattomasti pois tieltään, kun taas vastakkaissuuntaisissa yhteentörmäyksissä replisomi usein joutuu pysähtymään (Pomerantz & O'Donnell, 2008; Pomerantz & O'Donnell 2010).

RNA-polymeraasin ja replisomin välisiä yhteentörmäyksiä tutkittaessa on havaittu, että samansuuntaiset yhteentörmäykset, joissa replisomi törmää edessään liikkuvaan RNA-polymeraasiin, voivat aiheuttaa DNA-vaurioita. Syynä tälle on oletettu olevan se, että DNA:ta kahdentava DNA-polymeraasi voi käyttää pysähtyneen RNA-polymeraasin syntetisoimaa RNA:ta alukkeena, jonka perusteella se jatkaa DNA-juosteen synteesiä. Jos pysähtynyt TEC peruuttaa monen nukleotidin verran ennen dissosiaatiota, alukkeena toimiva RNA-juoste voi sitoutua DNA:han pidemmältä matkalta muodostaen R-silmukan (*engl.* "R-loop"), RNA-DNA-hybridin, jota DNA-polymeraasi voi käyttää alukkeena. Tästä johtuen alue, jossa RNA oli sitoutuneena DNA:han, jää ilman

uutta DNA-juostetta aiheuttaen katkoksen DNA-juosteessa (*engl.* "single strand brake", SSB). Mitä pidemmältä matkalta DNA:ta jää kahdentamatta, sitä vaikeampi vauriota on korjata. Näin ollen peruutustilassa oleviin TEC:hin törmätessään replisomi voi aiheuttaa pysyvämpiä vaurioita DNA:han. Korjaamatta jäänyt vaurio yhdessä DNA-juosteessa aiheuttaa seuraavalla DNA:n kahdentamiskierroksella vaurion molempiin juosteisiin (*engl.* "double strand brake", DSB). (Nudler 2012).

Peruutustilaa vähentävien tekijöiden, kuten Gre-tekijöiden ja Mfd-tekijän, poistaminen solusta lisää DNA-vaurioiden määrää. Vastaavasti peruutustilaa aiheuttavien tekijöiden poistaminen tai peruutustilaa estävät mutaatiot RNA-polymeraasissa vähentävät DNA-vaurioiden määrää. Lisäksi avoimet lukukehykset, jotka mahdollistavat ribosomien sitoutumisen syntetisoitavaan RNA:han, vähentävät DNA-vaurioiden määrää merkittävästi. Nämä tulokset osoittavat, että juuri peruutustila aiheuttaa RNA-polymeraasin ja replisomin yhteentörmäyksistä johtuvia DNA-vaurioita. (Dutta ym. 2011).

2. Työn tavoitteet

Geenien ilmenemisen ensimmäisessä vaiheessa, transkriptiossa, RNA-polymeraasi syntetisoi RNA:n DNA:n emäsjärjestyksen mukaisesti. RNA:n synteessin mekanismi on säilynyt samankaltaisena eliökunnan kehityksen ajan ja on siten kaikkia eliöitä yhdistävä tekijä. RNA-polymeraasin satunnainen peruuttaminen pysäyttää transkription väliaikaisesti vaikuttaen merkittävästi koko transkription nopeuteen (Shaevitz ym. 2003; Dangkulwanich ym. 2013). Peruutustilan tiedetään olevan tärkeä osa geenien ilmenemisen säätelyä ja transkription oikolukua, mikä tekee siitä fysiologisesti merkittävän ilmiön. Vaikka peruutustila havaittiin jo 20 vuotta sitten (Komissarova & Kashlev 1997; Nudler ym. 1997), sen mekanismia ei vielä täysin tunneta.

Työni tavoitteena oli tutkia RNA-polymeraasin peruuttamisen mekanismia selvittämällä, miten aktiiviseen keskukseen kohdenneet mutaatiot vaikuttavat yhden nukleotidin pituisen peruutustilan stabiilisuuteen. Toinen tutkimukseni keskeinen tavoite oli yksityiskohtaisesti selvittää, miten RNA-polymeraasin aktiivisen keskuksen aminohapot ohjaavat RNA:n leikkautumisreaktiota, jonka avulla RNA-polymeraasi korjaa tekemänsä virheet parantaen RNA-synteessin tarkkuutta. Mutaatioiden avulla yritin myös selvittää, missä konformaatiossa RNA:n 3'-pää on yhden nukleotidin pituisessa peruutustilassa.

Lisäksi tavoitteenani oli selvittää, miten eri transkriptiotekijät säätelevät transkriptiota peruutustilan kautta. Leikkaamistekijät nopeuttavat transkriptiota vapauttamalla RNA-polymeraasin peruutustilasta ja ne myös tehostavat transkription oikolukua (Yuzenkova ym. 2014; Imashimizu ym. 2015; Bubunenko ym. 2017). Tästä syystä tutkin Gre-tekijöiden indusoiman RNA:n leikkautumisen mekanismia kohdenneen mutageneesin avulla. Tutkin myös, miten transkription aloitustekijä σ^{70} , jonka tiedetään osallistuvan promoottorin läheiseen pysähtymiseen bakteereilla (Ring ym. 1996; Perdue & Roberts 2011), vaikuttaa peruutustilaan siirtymisessä promoottorialueen ulkopuolella.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Reagenssit

Leimaamattomat DNA- ja RNA-oligot valmisti ”MWG” (Eurofins Scientific, Luxemburg). 6-metyyli-isoxanthopteriinillä (6MI) leimatut DNA-oligot valmisti ”Fidelity Systems” (Gaithersburg, MD, Yhdysvallat). 2-aminopuriinilla (2AP) leimatut ja Atto680-leimatut RNA-oligot valmisti ”IBA GmbH” (Göttingen, Saksa). Nukleotidit ja nukleotidianalogit valmisti ”Jena Bioscience GmbH” (Thüringen, Saksa).

3.2 Proteiinien kohdennettu mutageneesi

Mutaatiot RNA-polymeraasin β' -alaysikköön tehtiin kloonamalla mutaatiot sisältävä DNA-fragmentti tuottoplasmeihin pIA981 tai pMT002, jotka sisälsivät kaikki *E. coli* RNA-polymeraasin alaysiköt T7 RNA-polymeraasipromoottorin säätelemän polykistronisen operonin sisällä sekä C-terminaalisen His₁₀-hännän β' -alaysikössä (**taulukko 1**). Leikkaamistekijän GreA variantti R37A/E38S/H39Q/L42R/K43S kloonattiin tuottoplasmiin pGB043, joka sisälsi T7 RNA-polymeraasipromoottorin säätelemän GreA geenin. Tuotettu GreA variantti sisälsi N-terminaalisen His₆-hännän. Kohdennettua mutageneesiä varten syntetisoidut DNA-fragmentit valmisti ”Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH” (Regensburg, Saksa). Mutaatiot sisältävät DNA-fragmentit kloonattiin tuottoplasmeihin restriktioentsyymeillä ja DNA ligaasilla, tai ”Gibson Assembly” -menetelmällä käyttäen kaupallista ”NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix” -kittiä (New England Biolabs, Massachusetts, Yhdysvallat).

Taulukko 1. Proteiinien tuotto-plasmidien tiedot. Kaikki taulukon proteiinit, paitsi *D. radiodurans* villityyppi, ovat *E. coli* proteiineja tai niiden variantteja.

<i>Proteiini</i>	<i>Tuotto-plasmidi</i>	<i>Plasmidin tiedot</i>	<i>Alkuperä</i>
<i>E. coli</i> villityyppi	pVS10	T7p- α - β - β' _His6-T7p- ω	Belogurov ym. 2007
<i>D. radiodurans</i> villityyppi	pET28	T7p- α - β' _His6- β - ω	Esyunina ym. 2016
β M681Y	pMT24	T7p- α - β [M681Y]_His6- β' -T7p- ω	Tämä työ
β' Q504R	pJM14	T7p- α - β - β' [Q504R]_TEV_His10-T7p- ω	Tämä työ
β' K598W	pJM16	T7p- α - β - β' [K598W]_TEV_His10-T7p- ω	Tämä työ
β' P750L	pTG12	T7p- α - β - β' [P750L]_TEV_His10-T7p- ω	Malinen ym. 2014
β' F773V	pVS48	T7p- α - β - β' [F773V]_His6-T7p- ω	Svetlov ym. 2007
β' Q929A	pMV18	T7p- α - β - β' [Q929A]_TEV_His10-T7p- ω	Tämä työ
β' H936A	pGB130	T7p- α - β - β' [H936A]_TEV_His10-T7p- ω	Malinen ym. 2012
β' H936Q	pJM3	T7p- α - β - β' [H936Q]_TEV_His10-T7p- ω	Tämä työ
β' G1136S	pJM1	T7p- α - β - β' [G1136S]_TEV_His10-T7p- ω	Tämä työ
β' Δ SI3	pVS10- Δ SI3(b)	T7p- α - β - β' [Δ 945-1132]_His6-T7p- ω	Esyunina ym. 2016
GreA	pIA578	T7p-GreA_His6	Perederina ym. 2006
GreB	pIA577	T7p-GreB_His6	Perederina ym. 2006
GreAB	pJM6	T7p-GreA [R37A,E38S,H39Q,L42R,K43S]_His6	Tämä työ
σ^{70}	pET28	T7p- His6_ σ^{70}	Tämä työ
NusG	pGB43	T7p-His6_TEV_NusG	Turtola & Belogurov 2016

3.3 Proteiinien tuotto ja puhdistus

RNA-polymeraasit ja transkriptiotekijät tuotettiin rekombinantisti *E. coli* T7 express ja Xjb(DE3)-solukannoissa, jotka transformoitiin tuottoplasmideilla. Bakteerisoluja kasvatettiin LB-mediumissa, johon oli lisätty selektiivinen antibiootti (100 µg/ml karbenisilliini tai 30 µg/ml kanamysiini), kunnes OD₆₀₀ ≥ 0.7. Proteiinin tuotto indusoitiin lisäämällä 1 mM IPTG:tä. Solut kerättiin 5-9 tuntia indusoinnin jälkeen sentrifugoimalla (7000 x g, 10 min, 4 °C) ja pakastettiin (-80 °C).

Solut hajotettiin sonikoimalla niitä hajotuspuskurissa (50 mM Tris-HCl, pH 6.9, 0.5 M NaCl, 1 mM β-merkaptotetanoli, 5 % v:v glyseroli, 0.2 % v:v Tween, 0.1 mM Na-EDTA), johon lisättiin 1 proteaasi-inhibiittoritabletti (Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablet, ThermoFisher Scientific) ja 0.1 mg/ml lysotsyymiä (Sigma-Aldrich). Gre-tekijöitä puhdistettaessa hajotuspuskurin NaCl-pitoisuus oli 1 M. Solulysaatti sentrifugoitiin (42 000 x g, 45 min, 4 °C), minkä jälkeen supernatantissa olevat His₆- tai His₁₀-hännän sisältävät tuotetut proteiinit sidottiin "Ni-Sepharose" -matriisiin (Ge Healthcare). Supernatanttiin lisättiin 20 mM imidatsolia epäspesifisen sitoutumisen vähentämiseksi. Nikkelimatriisiin sitoutuneet proteiinit pestiin kahdesti hajotuspuskurilla, johon oli lisätty 20 mM imidatsolia, ja eluoiitiin pylvästä hajotuspuskurilla, jossa oli 300 mM imidatsolilla.

RNA-polymeraasit ja σ⁷⁰ puhdistettiin edelleen sekä hepariini- (HiTrap Heparin HP 5 ml, Ge Healthcare) että anioninvaihtokromatografialla (ResourceQ 6 ml, Ge Healthcare) käyttäen ÄktaPrime- ja ÄktaPurifier-laitteistoja (Ge Healthcare). "Ni-Sepharose" -matriisista eluoitujen proteiinifraktioiden ionivahvuutta laskettiin liuottamalla ne ajopuskuriin (50 mM Tris-HCl, pH 6.9, 1 mM β-merkaptotetanoli, 5 % v:v glyseroli, 0.1 mM Na-EDTA), minkä jälkeen ne sidottiin hepariinimatriisiin. Proteiinit eluoiitiin kasvattamalla ajopuskurin NaCl-pitoisuutta. Proteiineja eroteltiin edelleen anionin-vaihtomatriisissa, kuten edellä. Muista proteiineista poiketen *Deinococcus radiodurans* RNA-polymeraasia puhdistettiin edelleen korkean erotuskyvyn anioninvaihtomatriisilla (MonoQ 1 ml, GE Healthcare), kuten edellä. Gre-tekijät puhdistettiin geelisuodatuksella.

"Ni-Sepharose" -matriisista eluoidut fraktiot laimennettiin geelisuodatuspuskuriin (50 mM Tris-HCl, pH 6.9, 1.0 M NaCl, 1 mM β -merkaptoetanol, 5 % v:v glyseroli, 0.1 mM Na-EDTA) ja erotettiin geelisuodatuspylväessä (HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-200 HR, Ge Healthcare). Gre-tekijöitä sisältävät fraktiot käsiteltiin yön yli TEV-proteaasilla (30 μ g/ml) His₆-häntien poistamiseksi. Irronneet His-hännät ja His-häntäiset TEV-proteaasit erotettiin Gre-tekijöistä sitomalla ne "Ni-Sepharose" -matriisiin.

Puhdistetut proteiinit konsentroitiin sentrifugoimalla niitä konsentraattoreissa (Amicon® Ultra Centrifugal Filters, 4 ml 3K cutoff/15 ml 10K cutoff, Millipore) ja dialysoitiin varastopuskurissa (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl, 50 % v:v glyseroli, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT) 1-2 vuorokautta. Gre-tekijöiden varastopuskurin NaCl-pitoisuus oli 1 M proteiinin saostumisen välttämiseksi. Dialysoidut proteiinit varastoitiin pakastimeen (-20 °C).

3.4 Transkription elongaatiokompleksin kokoaminen

Elongaatiokompleksit koottiin artikkelissa Komissarova ym., 2003 esitetyn menetelmän mukaisesti. RNA-tDNA-hybridit hybridisoitiin kuumentamalla DNA- ja RNA-oligoja kokoamispuskurissa (10 mM HEPES-KOH, 0.1 mM Na-EDTA) 5 minuuttia 70 °C lämpötilassa, minkä jälkeen lämpötila laskettiin vaiheittain huoneenlämpöön. Atto680-leimatun RNA:n pitoisuus TEC:n kokoamisessa oli 1.0 μ M ja tDNA:n pitoisuus oli 1.4 μ M, ellei toisin mainita. RNA:tDNA hybridiä (1 μ M) inkuboitiin RNA-polymeraasin (1.5 μ M) kanssa 10 minuuttia huoneenlämmössä transkriptiopuskurissa (TB-puskuri; 0-10 mM MgCl₂, 40 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 80 mM KCl, 5 % glyseroli, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT). Reaktioseokseen lisättiin ntDNA (2 μ M), minkä jälkeen TEC:ia inkuboitiin edelleen 20 minuuttia. TEC:n pitoisuus oli kokoamisen aikana 1 μ M, mistä TEC laimennettiin kokeissa käytettyyn 100-200 nM pitoisuuteen TB-puskurilla.

3.5 Kineettiset menetelmät

3.5.1 Nukleotidin liittyminen

Peruutustilasta palautumista seurattiin nukleotidin liittämismenetelmien avulla. TEC:t koottiin TB-puskurissa, joka sisälsi 1 mM MgCl₂ (kontrollireaktiossa 0 mM). Tutkittaessa peruutustilasta palautumista RNA:ta pidennettiin joko 2AP:lla tai ATP:lla (5 μM) ennen reaktioiden käynnistystä. Reaktiot käynnistettiin sekoittamalla keskenään 14 μl 200 nM TEC:iä ja 14 μl 400 μM CTP:tä RQF 3 quench-flow-laitteella (KinTek Corporation, Austin, TX, USA). Reaktio pysäytettiin 0.004-1000 sekunnin jälkeen lisäämällä näytteeseen 86 μl 0.5 M HCl-liuosta. Näyte neutraloitiin lisäämällä 171 μl neutralointipuskuria (290 mM Tris-emästä, 13 mM EDTA, 0.2 % v:v Orange G, 94% v:v formamidi). Transkriptiotekijän σ⁷⁰:n läsnä ollessa (reaktiossa 2 μM) TEC koottiin TB-puskurissa, jonka MgCl₂-pitoisuus oli 10 mM. Nukleotidin liittymisreaktioissa σ⁷⁰:n läsnä ollessa sekoitettiin keskenään 14 μl 200 nM TEC:iä ja 14 μl 400 μM GTP:tä RQF 3 quench-flow-laitteella.

3.5.2 RNA:n leikkautumisen seuraaminen aikaerotteisesti

RNA:n leikkautumista peruutustilassa tutkittiin sekä Gre-tekijöiden läsnä ollessa että ilman Gre-tekijöitä, jolloin tutkittiin RNA-polymeraasin omaa RNAasiaktiivisuutta. Kaikissa leikkautumiskokeissa TEC koottiin TB-puskurissa ilman magnesiumia ennen aikaisen RNA:n leikkautumisen estämiseksi. Leikkautumisreaktiot pysäytettiin määrätyn ajan kuluttua lisäämällä 20 μl näytteeseen 30 μl pysäytyspuskuria (94 % v:v formamidi, 13 mM Li₃-EDTA, 0.2 % v:v Orange G). Gre-tekijöiden indusoimissa leikkautumisreaktioissa 100 nM TEC:n kanssa sekoitettiin 2 μM Gre-tekijää (GreA, GreB tai GreA-varianttia R37A/E38S/H39Q/L42R/K43S) ja 1 mM MgCl₂:a, joka käynnisti reaktion. RNA-polymeraasin RNAasiaktiivisuutta seurattaessa 100 nM TEC:n kanssa sekoitettiin 2 mM MgCl₂:a, joka käynnisti reaktion. Seurattaessa RNA:n leikkautumista transkriptiotekijöiden (4 μM σ⁷⁰ tai 4 μM NusG) läsnä ollessa TEC:iä inkuboitettiin 10 minuuttia ennen reaktioiden käynnistämistä. Näissä leikkautumisreaktioissa 100 nM TEC:n kanssa sekoitettiin 8 μM GreA:ta ja 1 mM MgCl₂:a, joka käynnisti reaktion.

3.3.3 RNA:n leikkautumisen seuraaminen 2AP:n fluoresenssin avulla

TEC koottiin TB-puskurissa ilman magnesiumia ennen aikaisen RNA:n leikkautumisen estämiseksi. Transkriptiotekijän (4 μM σ^{70} tai 4 μM NusG) läsnä ollessa TEC:iä inkuboitii 10 minuuttia ennen reaktioiden käynnistämistä. 2AP:n tuottamaa fluoresenssia seurattiin sekoittamalla keskenään 60 μl 200 nM TEC:iä ja 60 μl 16 μM GreA:ta SX.18MV stopped-flow-laitteella (Applied Photophysics, Leatherhead, Iso-Britannia). MgCl_2 -pitoisuus oli reaktiossa 1 mM. 2AP:n leikkautuminen havaittiin fluoresenssin muutoksena, jota mitattiin reaaliajassa (eksikaatio 320 nm, emissiofilteri 375 nm "long pass").

3.5.4 RNA-polymeraasin translokaation seuraaminen 6MI-leiman avulla

Translokaatiota seurattiin tDNA:han liitetyn 6MI-leiman tuottaman fluoresenssin avulla (eksikaatio 340 nm, emissiofilteri 400 nm "long pass"). Transkriptiotekijän (4 μM σ^{70}) läsnä ollessa TEC:ia inkuboitii 10 minuuttia ennen reaktioiden käynnistämistä. TEC koottiin TB-puskurissa, jonka MgCl_2 -pitoisuus oli 10 mM. 6MI-leiman sisältävän tDNA:n pitoisuus TEC:n kokoamisessa oli 1.0 μM ja leimaamattoman RNA:n pitoisuus oli 1.4 μM . Reaktioissa sekoitettiin keskenään 60 μl 200 nM TEC:iä ja 60 μl 400 μM GTP:tä SX.18MV stopped-flow-laitteella TB-puskurissa, jonka MgCl_2 pitoisuus oli 10 mM.

3.5.5 RNA-geelien kuvantaminen ja analyysi

Atto680-leimatut RNA-tuotteet eroteltiin 16 % (v:v) denaturoivalla polyakryyliamidigeelillä ja kuvattiin Odyssey-laitteistolla (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA). Kuvat analysoitiin ImageJ-ohjelmistolla (Abramoff ym. 2004).

3.5.6 Kineettisten tulosten analysointi

Reaktiotuotteiden määrä ja fluoresenssin muutokset ajan funktiona sovitettiin alla kuvattuihin differentiaaliyhtälöihin käyttäen Origin-ohjelmistoa (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA). Sovitetuista käyristä määritettiin reaktioiden puoliintumisajat ja reaktionopeudet.

Translokaation ja nukleotidin liittymisen reaktionopeudet sovitetiin eksponenttiyhtälöön:

$$F(t) = A + B \times (1 - e^{-k \times t})$$

, jossa A on havaittu tausta, B on signaalin amplitudi, k on reaktion nopeusvakio ja t on aika.

Nukleotidin liittämisen ja peruutustilasta palautumisen reaktiot (**taulukot 3 ja 4**, luvut 4.1 ja 4.2) sovitetiin kahden eksponentin yhtälöön:

$$F(t) = (A_1 + B_1 \times (1 - e^{-k_1 \times t_1})) + (A_2 + B_2 \times (1 - e^{-k_2 \times t_2}))$$

jossa A_1 ja A_2 ovat havaittuja taustoja, B_1 ja B_2 ovat signaalien amplitudeja, k_1 ja k_2 reaktioiden nopeusvakioita, ja t_1 ja t_2 ovat aikoja.

RNA:n leikkautumisreaktiot (**taulukko 6**, luku 4.3) mallinnettiin Weibullin venytetyn eksponenttiyhtälön avulla (laskeva signaali):

$$F(t) = A + B \times (e^{(-k_1 \times t)^{k_2}})$$

, jossa A on havaittu tausta, B on signaalin amplitudi, k_1 on reaktion nopeusvakio, t on aika ja k_2 on "venytysparametri", jonka arvo vaihtelee välillä 0 ja 1. Reaktioiden mediaaniaika laskettiin seuraavasti:

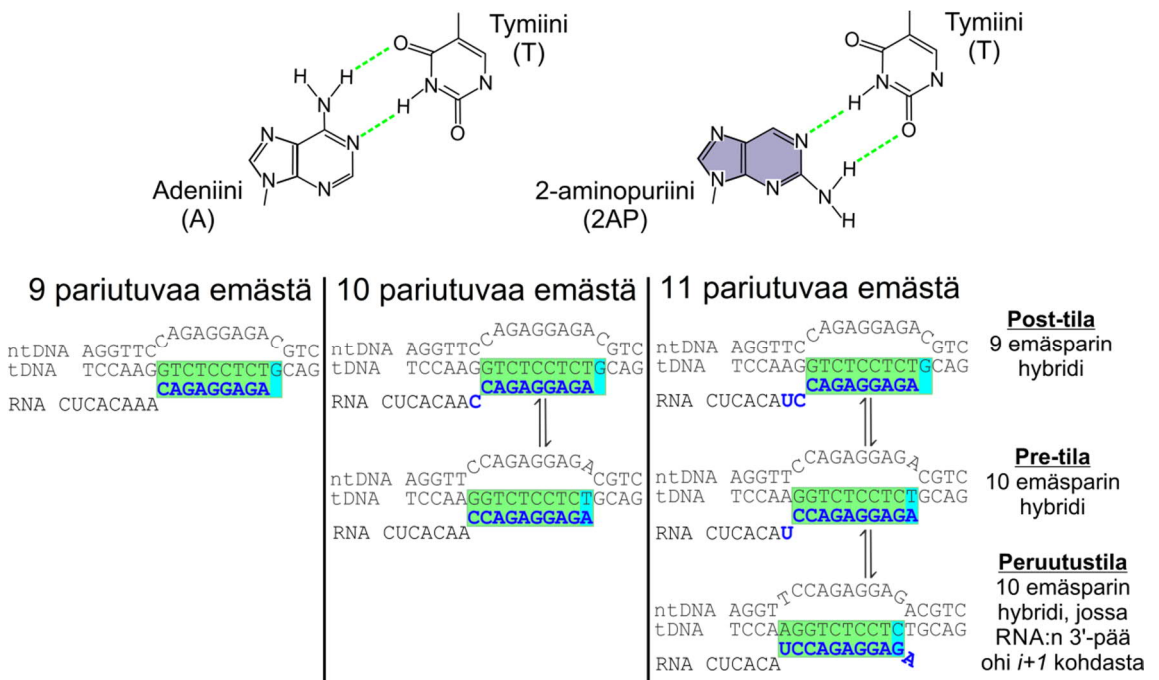
$$\text{Mediaaniaika (s)} = \frac{(\ln(2))^{1/k_2}}{k_1}$$

Weibullin venytetyn eksponenttiyhtälön käyttö RNA-polymeraasin leikkautumisreaktioiden mallintamisessa on kuvattu artikkelissa Turtola & Belogurov 2016.

4. Tulokset

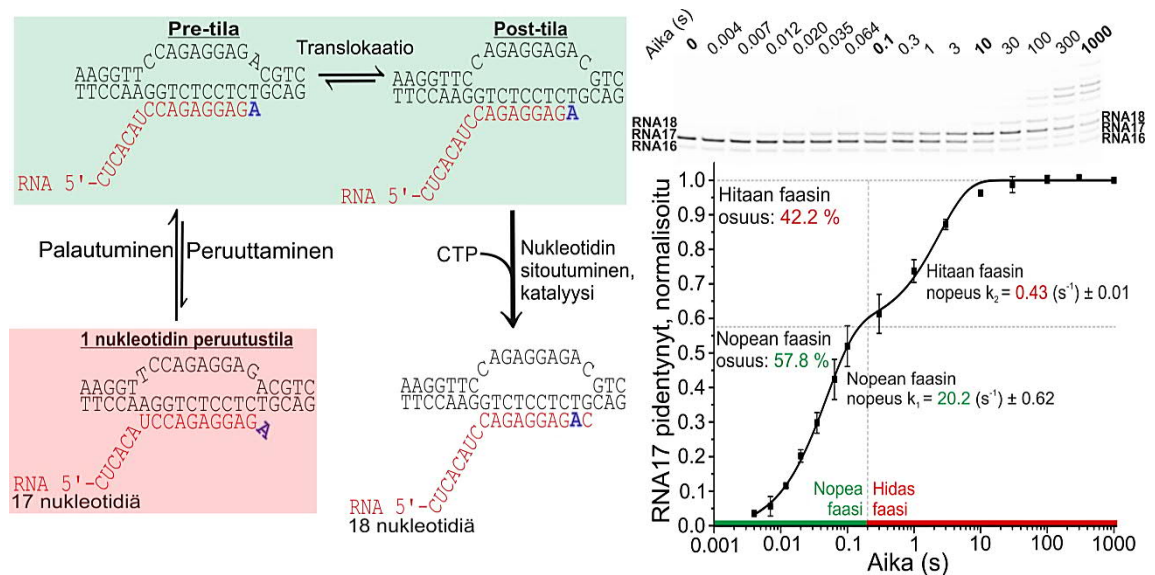
4.1 Peruutustilan tuottaminen

Tutkimme peruutustilaa ja siellä tapahtuvia reaktioita *E. coli* RNA-polymeraasissa *in vitro*. Muuttamalla tDNA:n ja RNA:n välistä komplementaarisuutta kykenimme ohjaamaan TEC:n eri translokaatiotiloihin (**kuva 13, taulukko 2**). Helpottaaksemme RNA-polymeraasin siirtymistä peruutustilaan liitimme RNA:n 3'-pään puriiniemäsanalognin 2AP, joka muodostaa tymiiniemäksen kanssa "huojuvan" emäsparin (*engl.* "wobble base pair"), mikä destabiloi pre-translokaatiotilaa kasvattaen peruuttamisen todennäköisyyttä. Tutkimuksia varten kehitimme koeasetelman, joka mahdollistaa yhden nukleotidin pituisen peruutustilan määrän ja stabiilisuuden tarkastelun (**kuva 14**).



Kuva 13. Peruutustilan tuottaminen 2AP:n sekä RNA:n ja tDNA:n välisen komplementaarisuuden avulla. (Yllä) 2AP muodostaa tymiiniemäksen kanssa huojuvan emäsparin, mikä helpottaa peruutustilaan siirtymistä. Vetysidokset emästen välillä on esitetty vihreillä katkoviivoilla. (Alla) Tutkimuksessa TEC:n eri tiloja stabiloitiin muuttamalla RNA:n ja tDNA:n välistä komplementaarisuutta. Mitä useampia emäspareja RNA:n ja tDNA:n välille voi muodostua, sitä useampaan tilaan TEC voi siirtyä RNA-polymeraasin translokoidessa eteen tai taaksepäin. RNA:n nukleotidit, jotka voivat paria tDNA:n kanssa, on korostettu sinisellä. RNA-tDNA-hybridin kattava alue on korostettu vihreällä, i+1-kohta hybridistä vaaleansinisellä.

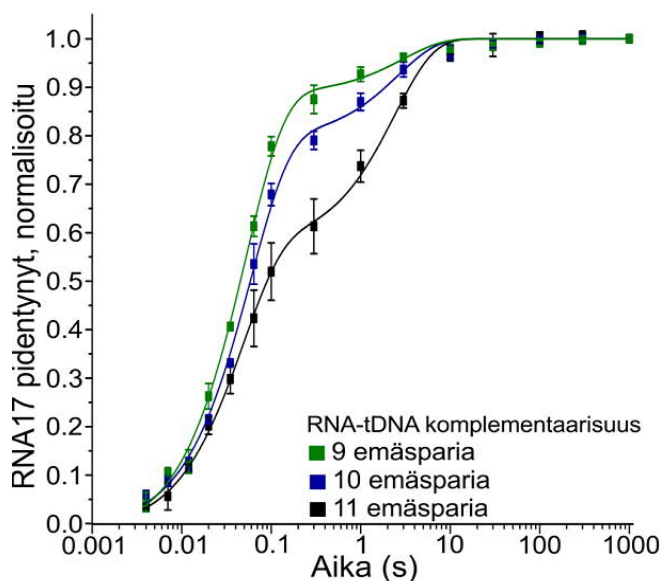
Kuten luvussa 1.3 on kuvattu, post-translokaatiotilassa RNA-tDNA-hybridi on 9 emäsparia pitkä ja pre-translokaatiotilassa hybridi on 10 emäsparia pitkä. Peruutustilassa hybridin pituus on edelleen 10 emäsparia, mutta RNA:n 3'-päässä yksi tai useampi nukleotidi on siirtynyt ohi *i+1*-kohdasta kohti sekundäärikanavaa. TEC voi liikkua post-, pre- ja peruutustilojen välillä milloin tahansa, mutta pariutuvien RNA- ja tDNA-emästen määrää vaikuttaa siihen, miten stabiileja eri translokaatiotilat ovat. Vertasimme nukleotidin liittymistä RNA:han eri translokaatiotiloja stabiloivissa DNA-RNA-kehikoissa selvittääksemme miten RNA-tDNA-hybridin rakenne vaikuttaa peruutustilasta palautumiseen (**kuva 15**).



Kuva 14. Peruutustilasta palautumisen tutkiminen. (Vasemmalla) Ne TEC:t, jotka ovat post-translokaatiotilassa tai siirtyvät sinne pre-translokaatiotilasta (vihreä alue), pidentävät RNA:n ennen 0.2 sekuntia (nopea faasi). Peruutustilassa olevissa TEC:issa (punainen alue) RNA:n pidentymistä rajoittaa palautuminen takaisin nukleotidin liittymiskliiniin, jolloin RNA:n pidentyminen kestää kauemmin kuin 0.2 sekuntia (hidas faasi). (Oikealla) RNA:n pidentymistä tarkasteltiin aikaerotteisesti denaturoivalla polyakryyliamidigeelillä. Kuvan geeli on reaktiosta, jossa TEC on koottu kehikon A3 ja villityypin RNA-polymeraasin kanssa 1 mM Mg^{2+} -pitoisuudessa. Tulokset sovittiin kahden eksponentin yhtälöön. Sovitetuista käyristä määritettiin nopean faasin (katalyyysi, <0.2 s) ja hitaan faasin (peruutustilasta palautuminen, >0.2 s) reaktionopeudet sekä faasien osuudet kokonaisreaktiossa (**taulukot 3 ja 4**).

Koeasetelman lähtötilanteessa RNA on 17 nukleotidiä pitkä ja sen 3'-päässä on puriinianalogi 2AP (sininen A). TEC voi siirtyä post-, pre- ja peruutustilojen välillä, mutta ainoastaan post-translokaatiotilassa CTP voi sitoutua RNA-

polymeraasin aktiiviseen keskukseen, mistä seuraa RNA:n pidentyminen 18 nukleotidin pituiseksi. Tämän koeasetelman avulla havaitsimme, että RNA:n ja tDNA:n komplementaarisuuden ollessa 11 emäsparia peruutustila on stabiilimpi kuin lyhyemmissä hybrideissä (**kuva 15**). Kun 2AP:n liittymisen jälkeen RNA-tDNA-hybridin pituus on 9 emäsparia (**taulukko 2**, kehikko A1), pre- ja peruutustilat eivät ole stabiileja, joten TEC on pääasiassa post-translokaatiotilassa, jolloin RNA pidentyi nopeasti. Hybridisoituvan alueen ollessa 10 emäsparia pitkä (**taulukko 2**, kehikko A2) TEC:n pre- että post-translokaatiotilat ovat muita tiloja stabiilimpia, jolloin toisen faasin osuus kaksinkertaistui. Hybridisoituvan alueen ollessa 11 emäsparia pitkä (**taulukko 2**, kehikko A3) TEC voi stabiloitua post-, pre- ja peruutustilaan, jolloin toisen faasin osuuden havaittiin olevan kaksi kertaa suurempi kuin kehikoissa A2 ja neljä kertaa suurempi kuin kehikossa A1. Hybridin pituus ei vaikuttanut ensimmäisen tai toisen faasin reaktionopeuteen, ainoastaan niiden määräsuhteisiin (**taulukko 3**).

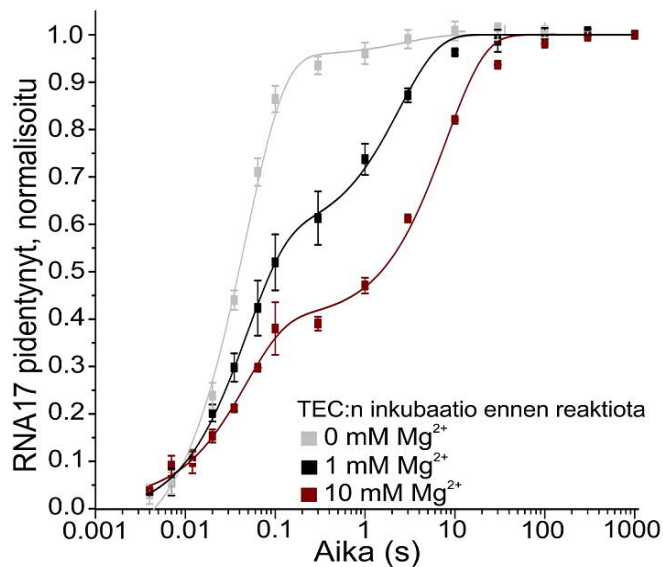


Kuva 15. Hybridin pituuden vaikutus peruutustilan määrään. Tarkastelimme RNA:n pidentymistä aikaerotteisesti denaturoivalla polyakryyliamidigeelillä ja sovitimme tulokset kahden eksponentin yhtälöön. Sovitetuista käyristä määritettiin nopean faasin (katalyyysi, <0.2 s) ja hitaan faasin (peruutustilasta palautuminen, >0.2 s) reaktionopeudet sekä faasien osuudet kokonaisreaktiossa (**taulukko 3**).

Kaikissa kolmessa kokeessa ensimmäinen, nopea faasi päättyi ennen 0.2 sekuntia. Tämän faasin nopeus vastasi aiemmin havaittuja nukleotidin liittämisenopeuksia (Malinen ym. 2012). Toinen, hidas faasi alkoi vasta 0.2

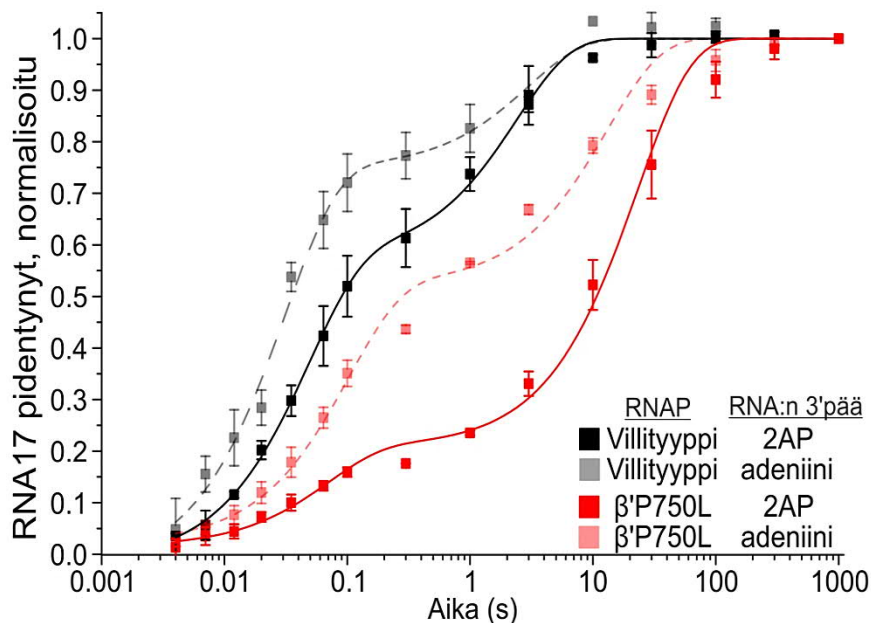
sekunnin jälkeen ja sen nopeus oli huomattavasti edeltävää faasia hitaampi. Päättelimme tämän faasin edustavan sitä fraktiota TEC:stä, jotka ovat reaktion alussa peruutustilassa. Tämän fraktion on ensin siirryttävä pois peruutustilasta voidakseen liittää CTP:n RNA-juosteeseen, minkä takia havaittu RNA:n pidentyminen viivästyy.

Käytimme edellä kuvattua koeasetelmaa selvittämään, miten kehikon A3 kanssa koottu TEC pidentää RNA:ta, kun TEC:iä on inkuboitu eri $MgCl_2$ -pitoisuuksissa. Fluoresenssiin perustuvissa mittauksissa peruutustilan havaittiin stabiloituvan korkeammassa Mg^{2+} -pitoisuuksissa (Turtola ym. 2018), joten testasimme miten magnesiumpitoisuuden vaihtelu vaikuttaa nopean ja hitaan faasin osuuksiin tässä koeasetelmassa. TEC:n inkubaatio ilman magnesiumia ennen CTP:n lisäystä käytännössä hävitti hitaan faasin kokonaan, kun taas inkubaatio 10 mM Mg^{2+} -pitoisuudessa kasvatti merkittävästi hitaan faasin osuutta (**kuva 16**). Lisäksi hitaan faasin nopeus laski lähes neljännekseen 10 mM Mg^{2+} -pitoisuudessa eli peruutustilasta palautuminen hidastui korkeassa magnesiumpitoisuudessa.



Kuva 16. $MgCl_2$ -pitoisuuden vaikutus peruutustilaan. TEC:t koottiin käyttäen kehikkoa A3. Peruutustilasta palautumista verrattiin eri $MgCl_2$ -pitoisuuksissa. RNA:n pidentymistä tarkasteltiin aikaerotteisesti denaturoivalla polyakryyliamidigeelillä ja tulokset sovitettiin kahden eksponentin yhtälöön. Sovitetuista käyristä määritettiin nopean faasin (katalyyysi, <0.2 s) ja hitaan faasin (peruutustilasta palautuminen, >0.2 s) reaktionopeudet sekä faasien osuudet kokonaisreaktiossa (**taulukko 3**).

Kokeissa käytetty 2AP ei ole luonnollinen emäs, joten tutkimme peruutustilan stabiilisuutta käyttämällä 2AP:n sijaan adeniinia (**taulukko 2**, kehikko A4). Adeniini muodostaa tyymiinin kanssa Watson-Crick-emäsparin tosiin kuin 2AP (katso **kuva 13**, sivu 40). Käytimme näissä kokeissa sekä villityypin RNA-polymeraasia että peruutustilaa eniten stabiloivaa varianttia β 'P750L (katso luku 4.2). Vertasimme kehikkoa A4 kehikkoon A3 ja havaitsimme, että adeniinin ollessa RNA:n 3'-päässä peruutustilaa on edelleen sekä villityypin RNA-polymeraasissa että variantissa β 'P750L, mutta vähemmän kuin 2AP:n läsnä ollessa (**kuva 17**). Adeniinin läsnä ollessa variantilla β 'P750L hitaan faasin osuus oli suurempi kuin villityypillä ja peruutustilasta palautumisen nopeus oli myös pienempi kuin villityypillä, aivan kuten 2AP:n läsnä ollessa (**taulukko 3**). Näin ollen kokeissa havaittu peruutustila ei ole 2AP riippuvainen ilmiö, vaan havaitaan myös luonnollisen nukleotidiemäksen läsnä ollessa.



Kuva 17. Peruutustilasta palautuminen, kun RNA:n 3'-päässä on luonnollinen emäs. RNA:n pidentymistä seurattiin villityypin RNA-polymeraasissa ja eniten peruutustilassa olevassa RNA-polymeraasivariantissa β 'P750L (katso luku 4.2). Kokeissa verrattiin kahta DNA-RNA-kehikkoa, A3 ja A4, joissa molemmissa oli 11 emäsparia pitkä hybridisoituva alue, mutta eri emäs RNA:n 3'-päässä: puriiniemäsanalogi 2AP (kehikko A3) ja luonnollinen emäs adeniini (kehikko A4). Tulokset sovitettiin kahden eksponentin yhtälöön ja tuloksista määritettiin nopean faasin (katalyyysi, <0.2 s) ja hitaan faasin (peruutustilasta palautuminen, >0.2 s) reaktionopeudet sekä faasien osuudet kokonaisreaktiossa (**taulukko 3**).

Taulukko 3. Peruutustilan määrä sekä katalyysin ja peruutustilasta palautumisen reaktionopeudet eri kokeissa. Taulukon reaktionopeudet on mallinnettu kahden eksponentin yhtälöstä (luku 3.5.6). Virherajat ovat keskihajontoja parhaista sovituksista. Peruutustilan suhteellinen määrä eri kokeissa saatiin vertaamalla sovitetujen käyrien hitaan faasin (> 0.2 s) amplitudia koko käyrän amplitudiin. $n=2$.

	<i>Katalyysi (s^{-1})</i>	<i>Peruutustilasta palautuminen (s^{-1})</i>	<i>Peruutustilan määrä (%)</i>
Villityyppi (2AP) 11 ep* komplement.**, 1 mM Mg ²⁺	20.2 ± 0.62	0.43 ± 0.01	42.2 ± 6.8
Villityyppi (2AP) 10 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	17.1 ± 0.70	0.43 ± 0.02	20.2 ± 1.9
Villityyppi (2AP) 9 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	19.1 ± 0.23	0.42 ± 0.10	10.7 ± 3.2
Villityyppi (2AP) 11 ep komplement., 0 mM Mg ²⁺	21.2 ± 0.26	0.30 ± 0.07	4.66 ± 0.9
Villityyppi (2AP) 11 ep komplement., 10 mM Mg ²⁺	22.2 ± 0.94	0.14 ± 0.01	61.1 ± 4.6
Villityyppi (adeniini) 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	26.6 ± 2.71	0.25 ± 0.02	31.9 ± 11.4
β'P750L (adeniini) 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	10.8 ± 2.42	0.10 ± 0.02	48.8 ± 2.2
β'P750L (2AP) 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	17.8 ± 0.55	0.05 ± 0.01	80.1 ± 0.3

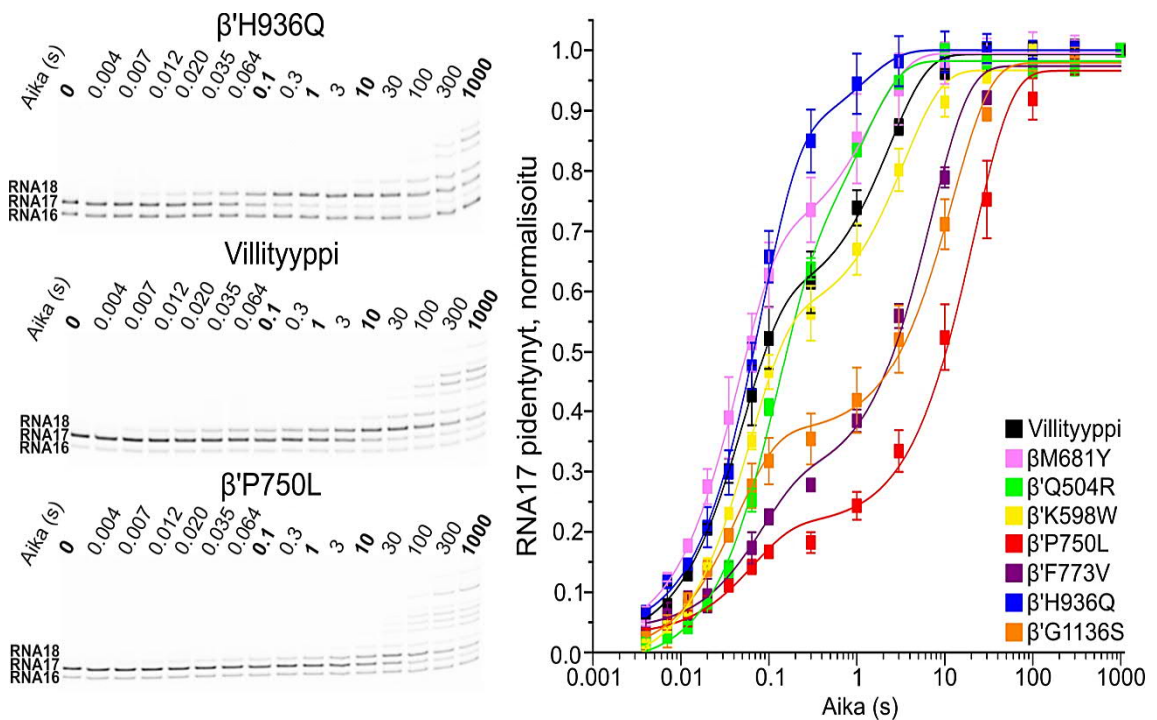
*ep = emäspari

**Komplement. = komplementaarisuus eli RNA-tDNA hybridin pariutuvien emäsparien määrä.

4.2 Aktiivisen keskuksen konformaation vaikutus peruutustilaan

Tutkiaksemme RNA-polymeraasin peruuttamisen mekanismia muokkasimme sen aktiivisen keskuksen rakennetta kohdennetulla mutageneesillä ja selvitimme, miten rakennemuutokset vaikuttavat peruutustilan määrään ja stabiilisuuteen. Käyttämällä kehikkoa A3 (taulukko 2) ja 1 mM Mg²⁺-pitoisuutta tutkimme, miten eri RNA-polymeraasivariantit palautuvat peruutustilasta. Tutkimme miten laskostunutta liipaisinsilmukkaa stabiloivat variantit β'P750L, β'F773V (Malinen ym. 2014), ja β'G1136S (Mejia ym. 2015) vaikuttavat peruutustilaan. Tutkimme liipaisinsilmukan konservoituneeseen histidiiniin kohdistettua mutaatiota β'H936Q, jonka on havaittu vähentävän peruutustilan ja RNA:n leikkautumisen määrää (Mishanina ym. 2017). Tutkimme sekundäärikanavan juuressa olevan taskun, E-kohdan (engl. "E-site" eli "entry site"),

aminohappoihin kohdistettuja mutaatioita β' Q504R ja β' K598W, sillä peruutustilassa olevan RNA:n 3'-pään on havaittu sitoutuvan tähän kohtaan (Sosunov ym. 2003, Wang ym. 2006). Mutaatioilla pyrittiin heikentämään RNA:n 3'-pään sitoutumista E-kohtaan ja selvittämään, vaikuttaako tämä peruutustilan määrään tai stabiilisuuteen. Lisäksi testasimme P-kohdassa (*engl.* "P-site" eli "proofreading site") sijaitsevaan aminohappoon β M681 kohdistettua mutaatiota β M681Y. RNA:n 3'-pään on havaittu sitoutuvan P-kohtaan 1 nukleotidin peruutustilassa (Sekine ym. 2015), joten tutkimme kyseiseen kohtaan kohdistetun mutaation vaikutusta peruutustilan stabiilisuuteen. Havaitsimme eri varianttien välillä merkittäviä eroja sekä peruutustilan määrässä että peruutustilasta palautumisessa (**kuva 18, taulukko 4**).



Kuva 18. RNA-polymeraasi varianttien palautuminen peruutustilasta. Seurasimme 1 mM Mg^{2+} -pitoisuudessa RNA:n pidentymistä eri RNA-polymeraasi varianteissa käyttämällä DNA-RNA-kehikkoa, jossa on 11 emäsparia pitkä hybridisoituva alue (kehikko A3). (Vasemmalla) Geelikuvat RNA:n pidentymisestä, kun kokeissa käytettiin villityypin RNA-polymeraasia, vähiten peruutustilassa olevaa RNA-polymeraasivarianttia β' H936Q ja eniten peruutustilassa olevaa RNA-polymeraasivarianttia β' P750L. (Oikealla) Tulokset sovitettiin kahden eksponentin yhtälöön ja tuloksista määritettiin nopean faasin (katalyyysi, <0.2 s) ja hitaan faasin (peruutustilasta palautuminen, >0.2 s) reaktionopeudet sekä faasien osuudet kokonaisreaktiossa (**taulukko 4**).

Varianttien β M681Y, β Q504R ja β H936Q havaittiin olevan vähemmän peruutustilassa kuin villityypin havaittiin olevan. Edellä kuvatut variantit palautuivat peruutustilasta myös kaksi kertaa villityyppiä nopeammin. Erityisesti β H936Q:n havaittiin olevan voimakkaasti peruutustilaresistentti, sillä kyseisestä variantista ainoastaan 17 % oli peruutustilassa siinä missä villityypin RNA-polymeraasista 42 % oli peruutustilassa. Variantti β K598W ei poikennut villityypistä peruutustilan määrän suhteen eikä merkittävästi peruutustilasta palautumisen suhteen. Liipaisinsilmukan laskostunutta muotoa stabiloivien varianttien β P750L, β F773V ja β G1136S havaittiin olevan muista poiketen 21.2–38.5 prosenttiyksikköä enemmän peruutustilassa kuin villityyppi ja ne palautuvat peruutustilasta 2.9–8.6 kertaa hitaammin kuin villityyppi samoissa olosuhteissa. Varianteista β P750L oli eniten peruutustilassa ja palautui sieltä selvästi muita varianteja hitaammin.

Taulukko 4. Peruutustilan määrä, katalyyysin nopeus ja peruutustilasta palautumisen nopeus eri RNA-polymeraasivarianteissa. Taulukon reaktionopeudet on mallinnettu kahden eksponentin yhtälöstä (luku 3.5.6). Virherajat ovat keskihajontoja parhaista sovituksista. Peruutustilan suhteellinen määrä eri kokeissa saatiin vertaamalla sovitettujen käyrien hitaan faasin (> 0.2 s) amplitudia koko käyrän amplitudiin. $n=2$.

	Katalyyysi (s^{-1})	Peruutustilasta palautuminen (s^{-1})	Peruutustilan määrä (%)
Villityyppi 11 ep* komplement.**, 1 mM Mg ²⁺	20.2 ± 0.62	0.43 ± 0.01	42.2 ± 6.8
βM681Y 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	23.2 ± 5.80	0.81 ± 0.50	33.5 ± 0.2
βQ504R 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	8.63 ± 0.07	0.87 ± 0.07	37.0 ± 3.8
βK598W 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	16.7 ± 1.01	0.29 ± 0.04	41.9 ± 4.1
βP750L 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	17.8 ± 0.55	0.05 ± 0.01	80.1 ± 0.3
βF773V 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	14.9 ± 4.44	0.15 ± 0.01	73.0 ± 1.8
βH936Q 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	13.0 ± 1.27	1.07 ± 0.69	17.0 ± 0.1
βG1136S 11 ep komplement., 1 mM Mg ²⁺	22.3 ± 1.95	0.08 ± 0.01	62.8 ± 4.7

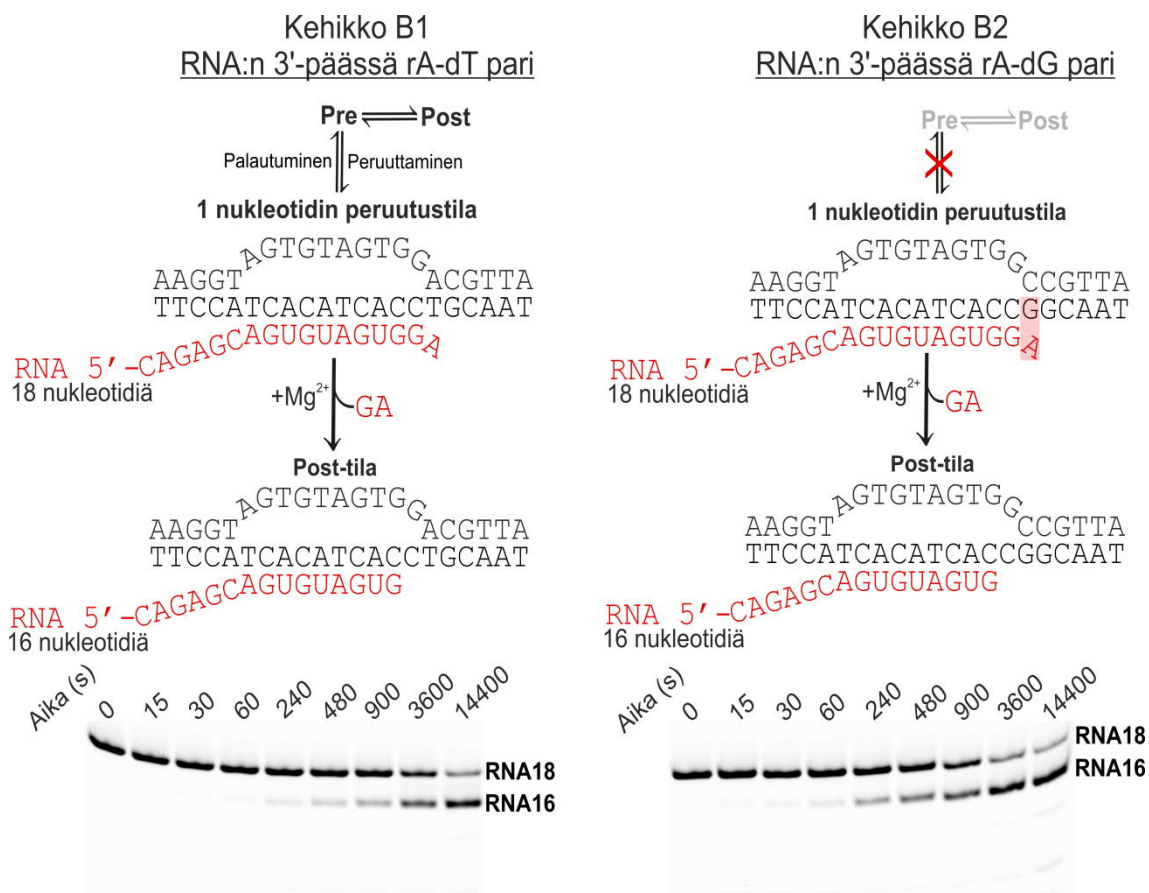
*ep = emäspari

**Komplement. = komplementaarisuus eli RNA-tDNA hybridin pariutuvien emäsparien määrä.

4.3 Aktiivisen keskuksen aminohapot RNA:n leikkautumisessa

Vapautuakseen peruutustilasta RNA-polymeraasi voi itsenäisesti leikata nukleotidejä RNA:n 3'-pästä (Orlova ym. 1995)(katso luku 1.4.2, sivu 21). RNA:n leikkautumisessa nukleofiilinä toimiva vesimolekyyli tai hydroksidi-ioni hyökkää *i*- ja *i+1*-kohdissa olevien nukleotidien väliseen fosfodiesterisidokseen magnesiumionien katalysoimassa reaktiossa. Reaktiossa RNA-juoste katkeaa ja yksi tai useampi nukleotidi irtoaa RNA:n 3'-pästä riippuen translokaatio-tilasta (Sosunov ym. 2003).

RNA-polymeraasin RNAasiaktiivisuus on monilla bakteerilajeilla, kuten *E. coli* RNA-polymeraasissa, hyvin heikko fysiologisissa olosuhteissa. Tästä poiketen esimerkiksi *Deinococcus radiodurans* ja *Thermus aquaticus* RNA-polymeraasit kykenevät leikkaamaan RNA:ta tehokkaasti (Esyunina ym. 2016; Miropolskaya ym. 2017). Koska *E. coli* RNA-polymeraasin leikkautumisaktiivisuus on alhainen, on koeasetelmissä päädytty usein käyttämään korkeaa magnesiumipitoisuutta (10 mM tai enemmän) ja korkeaa pH:ta (8.0 tai enemmän) leikkautumisreaktioiden nopeuttamiseksi (Esyunina ym. 2016; Mishanina ym. 2017). Nämä olosuhteet poikkeavat kuitenkin huomattavasti fysiologisista olosuhteista. Tutkiaksemme RNA-polymeraasin RNAasiaktiivisuutta lähempänä fysiologisia olosuhteita (2 mM Mg²⁺, pH 7.5) käytimme DNA-RNA-kehikoita, joissa 11 emäsparia pitkä hybridisoituva alue mahdollistaa peruutustilaan siirtymisen (**taulukko 5**). TEC:it koottiin ilman magnesiumia ennenaikaisen leikkautumisen estämiseksi ja leikkautumisreaktio indusoitiin lisäämällä TEC:n joukkoon magnesiumia. Vertasimme kokeissa kahta erilaista kehikkoa (**kuva 19**). Kehikossa B1 RNA:n 3'-pään adeniini pariutui tDNA:n tymidiinin kanssa, mikä mahdollisti siirtymisen post-, pre- ja peruutustilan välillä. Kehikossa B2 RNA:n 3'-pään adeniiniemästä vasten oli guaniini, jonka kanssa adeniini ei Watson-Crick-emäspariudu, mikä destabiloi RNA-tDNA-hybridiä edesauttaen RNA-polymeraasin siirtymistä yhden nukleotidin pituiseen peruutustilaan. Kehikko B2 vastaa tilaa, jossa RNA-polymeraasi on liittänyt väärän nukleotidin RNA:han.

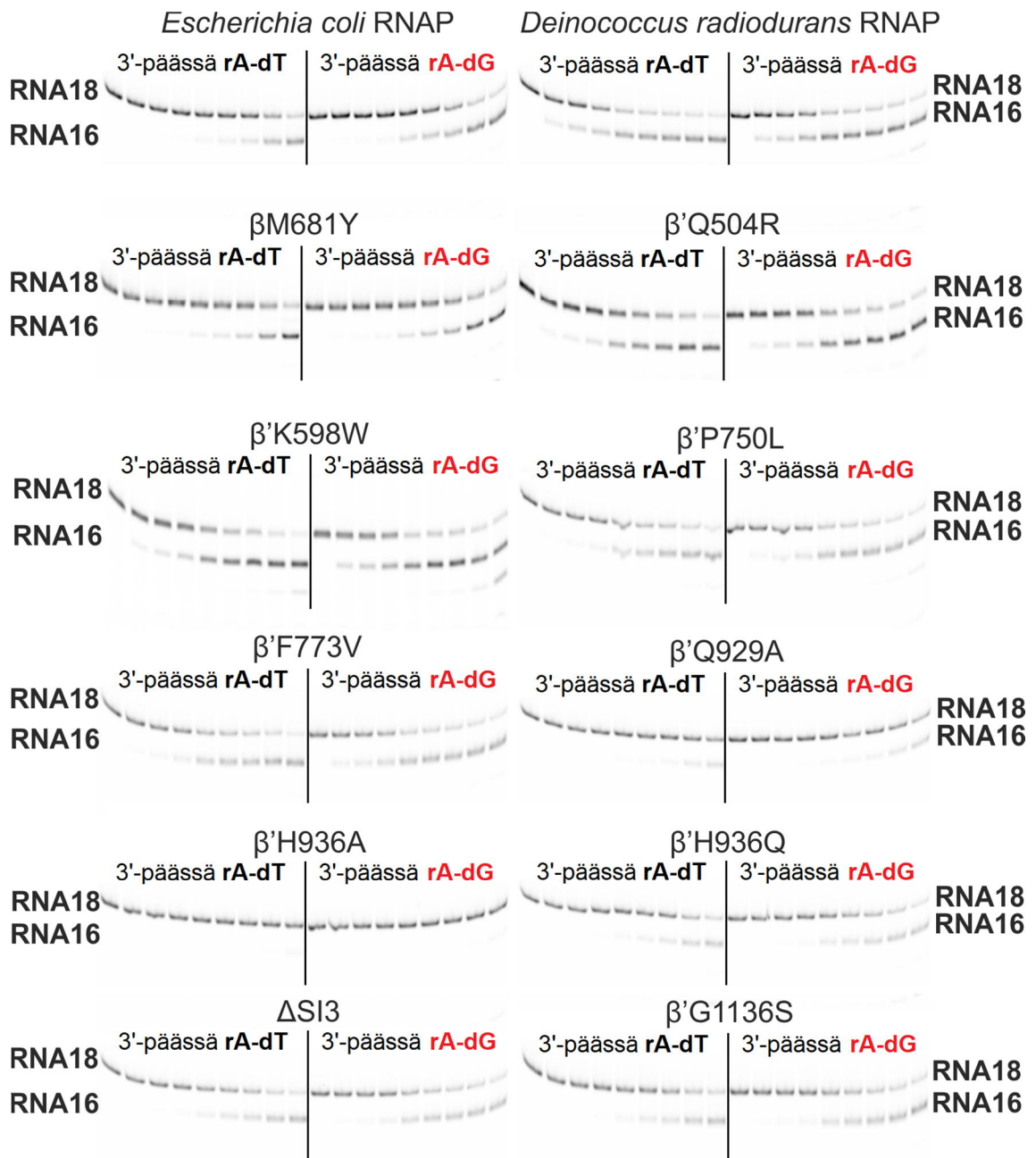


Kuva 19. RNA-polymeraasin RNAasiaktiivisuuden tutkimiseen käytetty koeasetelma. Kaaviossa on esitetty molemmat leikkautumiskokeisiin käytetyt DNA-RNA-kehikot. Kehikossa B1 RNA:n 3'-pää voi pariutua tDNA:n kanssa, jolloin RNA-polymeraasi voi siirtyä post-, pre- ja peruutustilojen välillä. Kehikossa B2 RNA:n 3'-pää ei voi pariutua tDNA:n kanssa (rA-dG-pari), mistä johtuen RNA-polymeraasi on kokonaan peruutustilassa. RNA:n leikkautuminen käynnistettiin lisäämällä reaktioseokseen magnesiumia, jolloin kaksi nukleotidiä leikkautuu RNA:n 3'-päästä. Alla on esitetty geelikuvat RNA:n leikkautumisesta *E. coli* villityypin RNA-polymeraasissa yllä kuvatuissa DNA-RNA-kehikoissa.

E. coli RNA-polymeraasin villityypin havaittiin leikkaavan RNA:ta kaksi kertaa nopeammin RNA:N 3'-pään ollessa pariutunut (kehikko B1) kuin sen ollessa pariutumaton (kehikko B2), vaikka molemmissa kehikoissa käytetty RNA oli sama (kuvat 20 ja 21, taulukko 6). *D. radiodurans* RNA-polymeraasilla RNA:n leikkautuminen oli molemmissa kehikoissa 20 kertaa nopeampaa kuin *E. coli* villityypin RNA-polymeraasissa (kuva 21, taulukko 6). Tutkimme edelleen, miten peruutustilan stabiilisuus vaikuttaa RNA:n leikkautumiseen. Etsimme samalla mahdollisia leikkautumisreaktion katalyysiin osallistuvia aminohappoja RNA-polymeraasin aktiivisesta keskuksesta.

Taulukko 5. RNA-polymeraasin RNAasiaktiivisuuden tutkimisessa käytetyt DNA-RNA-kehikot. Taulukossa on esitetty DNA-RNA-kehikkojen rakenteet ennen RNA:n leikkautumista. Emäkset, joiden välissä on tähti (*), eivät muodosta keskenään Watson-Crick-emäspareja.

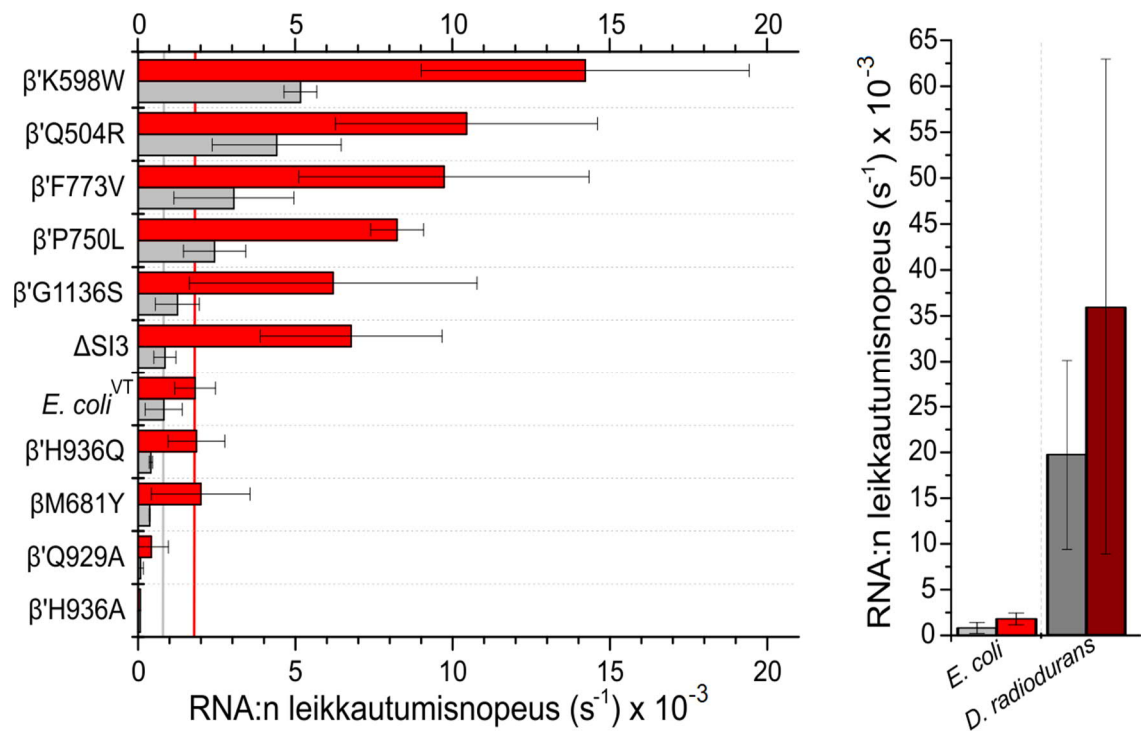
DNA-RNA-kehikko	Kehikon rakenne	RNA-tDNA-hybridin rakenne	Emäs-analogit
Kehikko B1 tDNA: S252 RNA: R130 ntDNA: S253	<pre> AGTGTAGTGG S253 5' -GACTGTAGCGATCTAAGGT ACGTTATGACTGACTGAGAGC-3' S252 3' -CTGACATCGCTAGATTCCATCACATCACCTGCAATACTGACTGACTCTCG-5' AGUGUAGUGG R130 5' Atto680-CAGAGC A </pre>	11 pariutuvaa emästä, voi siirtyä 1 nukleotidin peruutustilaan	Ei
Kehikko B2 tDNA: S270 RNA: R130 ntDNA: S271	<pre> AGTGTAGTGG S271 5' -GACTGTAGCGATCTAAGGT CCGTTATGACTGACTGAGAGC-3' S270 3' -CTGACATCGCTAGATTCCATCACATCACCGGCAATACTGACTGACTCTCG-5' AGUGUAGUGG* R130 5' Atto680-CAGAGC A </pre>	10 pariutuvaa emästä + 1 väärä emäspari RNA:n 3'-päissä	Ei



Kuva 20. RNA-geelit RNA:n leikkautumisesta eri RNA-polymeraasi-varianteissa. RNA:n leikkautumista seurattiin aikaerotteisesti (0, 15, 30, 60, 240, 480, 900, 3600 ja 14 400 sekuntia). Kuvassa esitetyt variantit ovat *E. coli* RNA-polymeraasi-variantteja. Geelikuvissa on esitetty rinnakkain kokeet, joissa RNA:n 3'-pää on pariutunut (rA-dT-pari, kehikko B1) ja pariutumaton (rA-dG-pari, kehikko B2).

Vertasimme RNA:n leikkautumista varianteissa β' P750L, β' F773V ja β' G1136S, joiden havaitsimme olevan villityyppiä enemmän peruutustilassa. Ne leikkasivat RNA:ta 1.5 – 3 kertaa nopeammin kuin villityyppi RNA:n 3'-pään ollessa pariutunut. RNA:n 3'-pään ollessa pariutumaton RNA:n leikkautuminen oli

keskimäärin 3.4 – 5.3 kertaa nopeampaa kuin villityypillä (**kuva 21, taulukko 6**). Vähän peruutustilassa olevat variantit β M681Y ja β H936Q leikkasivat RNA:ta huomattavasti heikommin kuin villityyppi täysin pariutuneessa hybridissä (keskimäärin 3.6 kertaa hitaammin), kun taas pariutumattomassa hybridissä leikkautuminen ei poikennut merkittävästi villityypistä. Edellä kuvatuista varianteista poiketen β Q504R ja β K598W, joiden havaittiin olevan yhtä paljon tai vähemmän peruutustilassa kuin villityyppi, leikkasivat RNA:ta molemmissa kehikoissa huomattavasti tehokkaammin kuin villityyppi (5.4 – 6.3 kertaa nopeammin RNA:n 3'-pään ollessa pariutunut ja 5.7 – 7.8 kertaa nopeammin RNA:n 3'-pään ollessa pariutumaton).



Kuva 21. RNA:n leikkautumisnopeudet eri RNA-polymeraasi varianteissa. Kokeissa käytettiin TEC:ia, jossa oli 11 emäsparia pitkä RNA-tDNA-hybridit, ja RNA:n 3' päässä oli joko rA-dT-pari (pariutunut, kehikko B2, harmaa) tai rA-dC-pari (pariutumaton, kehikko B3, punainen). Molemmissa kehikoissa käytettiin samaa RNA:ta. (Vasemmalla) *E. coli* RNA-polymeraasivarianttien leikkautumisnopeus. (Oikealla) RNA:n leikkautumisnopeus *E. coli* ja *D. radiodurans* RNA-polymeraaseissa. $n = 2$.

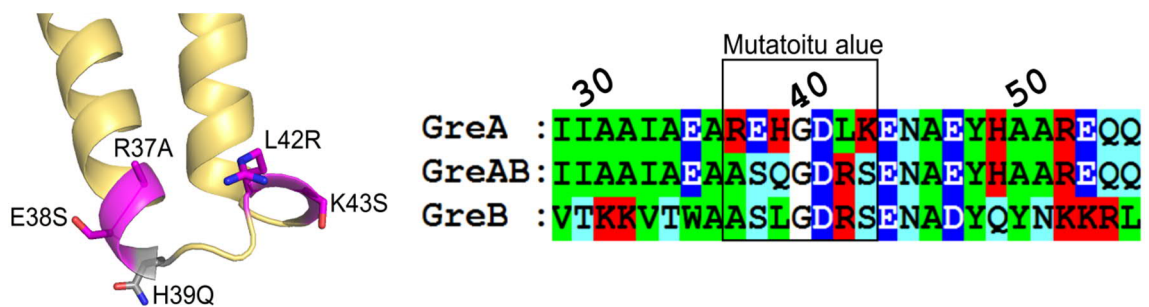
Tutkimme leikkautumiskokeissa myös muita RNA-polymeraasivariantteja, joissa mutaatiot kohdistuivat aktiivisen keskuksen eri osiin. Liipaisinsilmukan aminohapot β 'Q929 ja β 'H936 voivat suoraan vuorovaikuttaa RNA:n kanssa (luku 1.3) ja siten mahdollisesti osallistua myös RNA:n leikkautumisreaktioon. Tutkituista aminohapoista ainoastaan β 'H936 voisi ominaisuuksiensa puolesta toimia happo-emäskatalyysinä RNA:n leikkautumisessa. Kuten edellä on kuvattu, mutaatio histidiinistä glutamiiniksi, joka ei voi toimia happo-emäskatalyysinä, ei kuitenkaan vähentänyt RNA:n leikkautumista RNA:n 3'-pään ollessa pariutumaton. Toisin kuin variantti β 'H936Q, β 'H936A on käytännössä inaktiivinen (**kuvat 20 ja 21, taulukko 6**). Myös β 'Q929A leikkaa RNA:ta hyvin heikosti, mutta tehokkaammin kuin β 'H936A. *E. coli* RNA-polymeraasin β '-alaysikön 190 aminohappoa pitkä SI3-domeeni on lajispesifinen jatkos liipaisinsilmukassa bakteerien RNA-polymeraasissa, jolla oletetaan olevan vaikutusta liipaisinsilmukan konformaatiotasapainoon (Windgassen ym. 2014). Kyseisen domeenin osittainen deleetio heikentää sekä RNA-polymeraasin itsensä että GreB:n indusoimaa RNA:n leikkautumista *E. coli* RNA-polymeraasissa (Zakharova ym. 1998). Testasimme RNA:n leikkautumista RNA-polymeraasivariantilla, jossa SI3-domeeni on poistettu (Δ SI3). RNA:n 3'-pään ollessa pariutunut Δ SI3-variantti leikkasi RNA:ta samalla nopeudella kuin villityyppi, mutta 3'-pään ollessa pariutumaton se leikkasi RNA:ta 3.7 kertaa nopeammin kuin villityyppi. Tämä tulos tukee aikaisempia havaintoja, joiden mukaan SI3-deleetio *E. coli* RNA-polymeraasissa tehostaa spesifisesti väärän emäsparin leikkautumista (Esyunina ym. 2016).

Taulukko 6. Peruutustilassa tapahtuvan RNA:n leikkautuminen reaktionopeudet eri RNA-polymeraasi varianteilla. Taulukkoon on eritelty RNA:n leikkautumisen reaktionopeudet E. coli (*Eco*) ja D. radiodurans (*Dra*) RNA-polymeraasin villityypeille (VT) sekä eri E. coli RNA-polymeraasi-varianteille. Nopeudet on mallinnettu Weibullin venytetyn eksponenttiyhtälön avulla sovitetuista käyristä (luku 3.5.5). $n = 2$.

	<i>Reaktion puoliintumisaika (s), 3'-päässä rA-dT-pari</i>	<i>Reaktion mediaani-aika (s⁻¹)x 10⁻³</i>	<i>Reaktion puoliintumisaika (s), 3'-päässä rA-dG-pari</i>	<i>Reaktion mediaani-aika (s⁻¹) x 10⁻³</i>
<i>EcoVT</i>	1660 ± 1200	0.82 ± 0.59	590 ± 211	1.81 ± 0.65
<i>DraVT</i>	59 ± 31	19.7 ± 10.4	39 ± 29	35.8 ± 27.0
β M681Y	2 710 ± 129	0.37 ± 0.02	728 ± 573	1.99 ± 1.57
β 'Q504R	254 ± 118	4.41 ± 2.05	104 ± 42	10.4 ± 4.16
β 'K598W	195 ± 20	5.16 ± 0.52	75 ± 28	14.2 ± 5.21
β 'P750L	449 ± 183	2.43 ± 0.99	122 ± 12	8.23 ± 0.84
β 'F773V	409 ± 256	3.04 ± 1.91	116 ± 55	9.72 ± 4.61
β 'Q929A	40 720 ± 47 500	0.08 ± 0.09	16 300 ± 21 200	0.42 ± 0.54
β 'H936A	2 120 000 ± 1 140 000	0.001 ± 0.0003	297 000 ± 347 000	0.01 ± 0.01
β 'H936Q	2 487 ± 333	0.41 ± 0.05	611 ± 297	1.86 ± 0.90
β 'G1136S	948 ± 529	1.25 ± 0.70	221 ± 163	6.20 ± 4.57
Δ SI3	1280 ± 529	0.85 ± 0.35	162 ± 69	6.77 ± 2.89

4.4 Gre-tekijöiden kärkiosan aminohapot RNA:n leikkautumisessa

Gre-tekijät auttavat *E. coli* RNA-polymeraasia vapautumaan peruutustilasta tehostamalla RNA:n leikkautumista (katso luvut 1.4.2 ja 1.5.1). Rakenteellisesta samankaltaisuudesta huolimatta ne ohjaavat RNA:n leikkautumista eri tavalla. GreA ohjaa RNA:n leikkautumista joko kahden tai kolmen nukleotidin verran, kun taas GreB ohjaa RNA:n leikkautumista spesifisesti kolmen nukleotidin verran ja voi leikata jopa 9 nukleotidiä kerrallaan irti RNA:sta riippuen RNA-polymeraasin translokaatiotilasta (Borukhov ym. 1993). Gre-tekijä sitoutuu RNA-polymeraasiin ja sen α -kierteinen kärkiosa työntyy sekundäärikanavan kautta aktiiviseen keskukseen (katso **kuva 10**, sivu 23). Tutkiaksemme Gre-tekijöiden välisiä eroja RNA:n leikkautumisessa tuotimme kimeerisen GreA-variantin R37A/E38S/H39Q/L42R/K43S (tästä eteenpäin ”GreAB”), jossa GreA:n kärjen aminohapot vaihdettiin vastaamaan GreB:n kärjen aminohappoja (**kuva 22**). Tutkimme leikkautumista GreA:n, GreB:n ja GreAB:n läsnä ollessa erilaisilla peruutustilaan stabiloiduilla DNA-RNA-kehikoilla, joiden rakennetta muutimme vaihe vaiheelta nähdäksemme, mitkä tekijät hybridin rakenteessa vaikuttavat Gre-tekijöiden indusoimaan leikkautumiseen (**taulukko 7**).

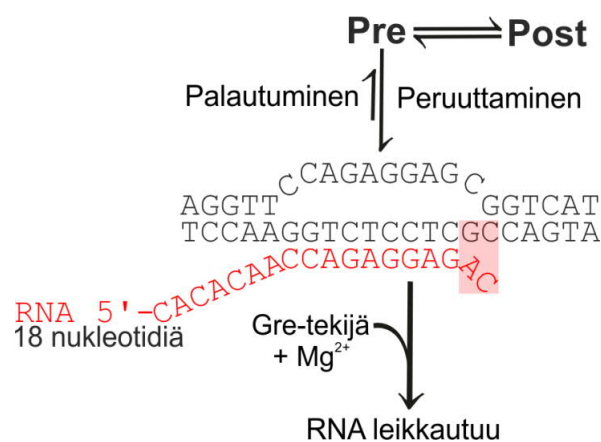


Kuva 22. Kimeerisen transkription leikkaamistekijän GreAB rakenne. GreAB on *E. coli* transkription leikkaamistekijän GreA variantti R37A/E38S/H39Q/L42R/K43S, jossa kärkiosan aminohapot on vaihdettu vastaamaan leikkaamistekijää GreB. (Vasemmalla) Rakennemalli, jossa GreA:n mallia (PDB: 1GRJ) on muokattu vastaamaan GreAB:tä. GreA:n osat on värjätty keltaisella, GreB:tä vastaavat aminohapot on värjätty purppuralla. Mutaatio H39Q ei vastaa *E. coli* GreA:ta tai GreB:tä, joten se on värjätty harmaaksi. (Oikealla) GreA:n, GreB:n ja GreAB:n aminohapposekvenssien rinnastus kärkiosan alueesta. Aminohapot on värjätty ominaisuuksiensa mukaan: hydrofobiset (vihreä), polaariset ja varauksettomat (syaani), positiivisesti varautuneet (punainen), sekä negatiivisesti varautuneet (sininen).

Taulukko 7. Gre-tekijöiden indusoiman leikkautumisen tutkimisessa käytetyt DNA-RNA-kehikot. Taulukossa on esitetty DNA-RNA-kehikkojen rakenteet ennen RNA:n leikkautumista. Emäkset, joiden välissä on tähti (*), eivät muodosta keskenään Watson-Crick-emäspareja. Muista poiketen kehikossa C4 käytettiin kahta ntDNA-juostetta (ntDNA₁ ja ntDNA₂), joiden avulla saatiin aikaan katkennut ntDNA-juoste.

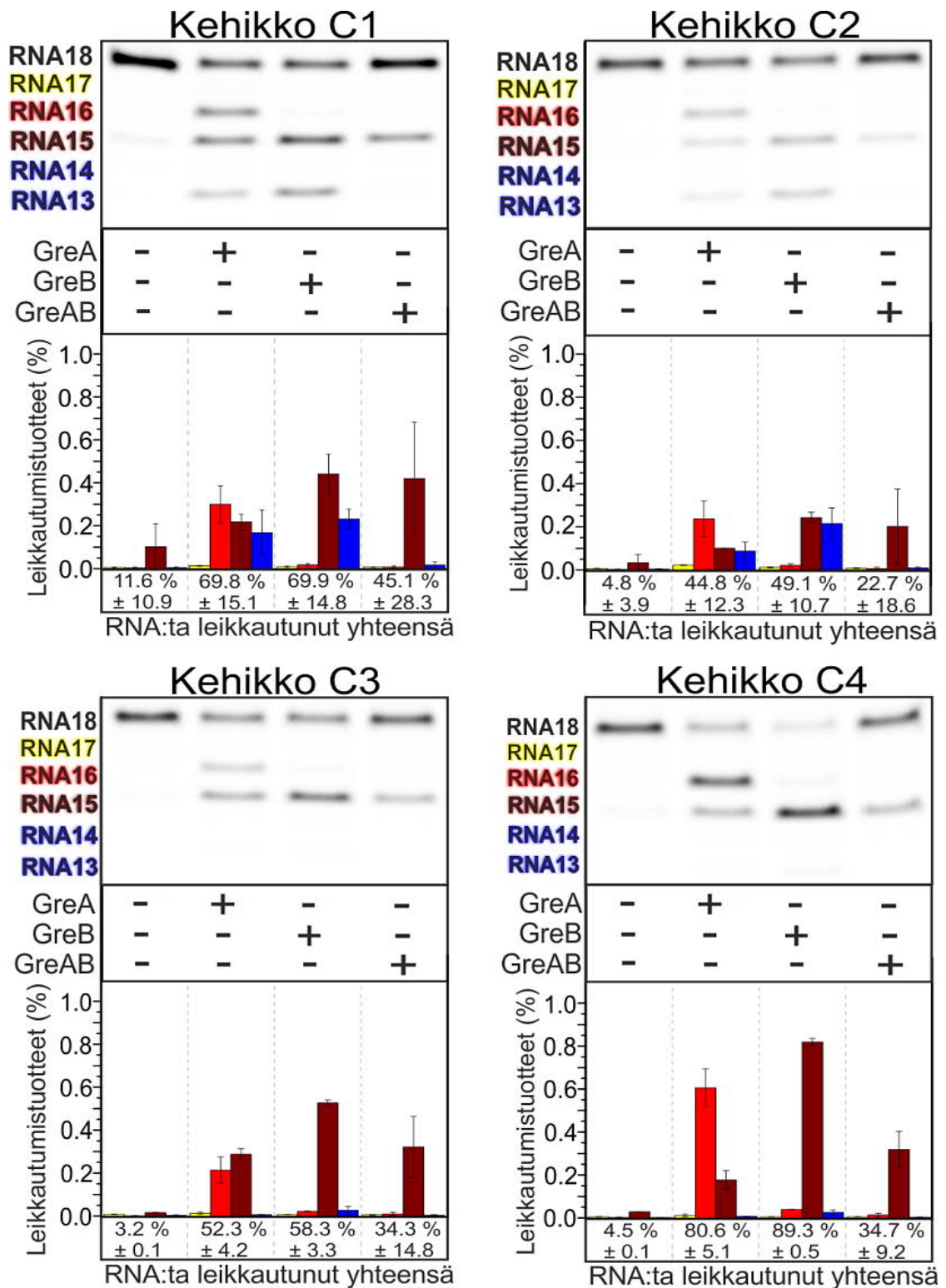
DNA-RNA-kehikko	Kehikon rakenne	RNA-tDNA-hybridin rakenne	Emäs-analogit
Kehikko C1 tDNA: S117 RNA: R124 ntDNA: S049	<p style="text-align: right;">CCAGAGGAGC</p> <p>S049 5' -ACTTGTAGCGATCTAAGGTT GGTCATGTCAGTAGAGTAGC-3'</p> <p>S117 3' -TGAACATCGCTAGATTCCAAGGTCTCCTCGCCAGTACAGTCATCTCATCG-5'</p> <p style="text-align: center;">CCAGAGGAG**</p> <p style="text-align: center;">R124 5' Atto680-CACACAA AC</p>	9 pariutuvaa emästä, 2 väärää emäsparia RNA:n 3'-päässä	Ei
Kehikko C2 tDNA: S117 RNA: R052 ntDNA: S049	<p style="text-align: right;">CCAGAGGAGC</p> <p>S049 5' -ACTTGTAGCGATCTAAGGTT GGTCATGTCAGTAGAGTAGC-3'</p> <p>S117 3' -TGAACATCGCTAGATTCCAAGGTCTCCTCGCCAGTACAGTCATCTCATCG-5'</p> <p style="text-align: center;">CCAGAGGAG**</p> <p style="text-align: center;">R052 5' Atto680-CUCACAA X</p>	9 pariutuvaa emästä, 2 väärää emäsparia RNA:n 3'-päässä	2AP (X) RNA:ssa i+2 asema
Kehikko C3 tDNA: S117 RNA: R052 ntDNA: S232	<p style="text-align: right;">CCAGAGGACC</p> <p>S232 5' -ACTTGTAGCGATCTAAGGTT * GGTCATGTCAGTAGAGTAGC-3'</p> <p>S117 3' -TGAACATCGCTAGATTCCAAGGTCTCCTCGCCAGTACAGTCATCTCATCG-5'</p> <p style="text-align: center;">CCAGAGGAG**</p> <p style="text-align: center;">R052 5' Atto680-CUCACAA X</p>	9 pariutuvaa emästä, 2 väärää emäsparia RNA:n 3'-päässä	2AP (X) RNA:ssa i+2 asema
Kehikko C4 tDNA: S117 RNA: R052 ntDNA ₁ : S120 ntDNA ₂ : S235	<p style="text-align: right;">S235 GGTCATGTCAGTAGAGTAGC-3'</p> <p>S120 5' -ACTTGTAGCGATCTAAGGTT</p> <p>S117 3' -TGAACATCGCTAGATTCCAAGGTCTCCTCGCCAGTACAGTCATCTCATCG-5'</p> <p style="text-align: center;">CCAGAGGAG**</p> <p style="text-align: center;">R052 5' Atto680-CUCACAA X</p>	9 pariutuvaa emästä, 2 väärää emäsparia RNA:n 3'-päässä	2AP (X) RNA:ssa i+2 asema

Leikkautumiskokeissa TEC koottiin ilman magnesiumia ennenaikaisen leikkautumisen estämiseksi. Reaktiot käynnistettiin sekoittamalla TEC:n (200 nM) kanssa samanaikaisesti MgCl₂:a (1 mM) sekä GreA:ta, GreB:tä tai GreAB:tä (2 μM). Kontrollireaktiossa TEC:iä inkuboitii ilman Gre-tekijöitä 1 mM MgCl₂-pitoisuudessa, jotta saataisiin selville, kuinka suuri osuus havaitusta leikkautumisesta johtui RNA-polymeraasin omasta RNAasiaktiivisuudesta. TEC:ia inkuboitii magnesiumin ja Gre-tekijöiden kanssa 10 minuuttia. Leikkautumistuotteet kvantitoitiin RNA-geeliltä ja eripituisten leikkautumistuotteiden osuuksia verrattiin Gre-tekijöiden välillä (kuvat 23 ja 24).



Kuva 23. Gre-tekijöiden indusoiman leikkautumisen tutkimisessa käytetty koeasetelma. Koeasetelmassa koottiin erilaisia TEC:ja, joissa kaikissa RNA:n 3'-pään kaksi emästä (adeniini/2AP ja sytosiini) eivät pariudu tDNA:n emästen kanssa. Tämä stabiloi TEC:t kahden nukleotidin pituista peruutustilaa. Kuvan kehikossa (C1) RNA:N 3'-pään toiseksi viimeinen nukleotidimäs on adeniiini, muissa kehikoissa (C2-C4) käytettiin adeniiinimäksen sijaan puriiniemäs-analogia 2AP. RNA:n leikkautuminen käynnistettiin lisäämällä TEC:n joukkoon leikkaamistekijää (GreA, GreB tai GreAB) ja magnesiumia. Eripituiset RNA:n leikkautumistuotteet eroteltiin geelillä ja niiden määrasuhteita verrattiin toisiinsa eri Gre-tekijöiden välillä.

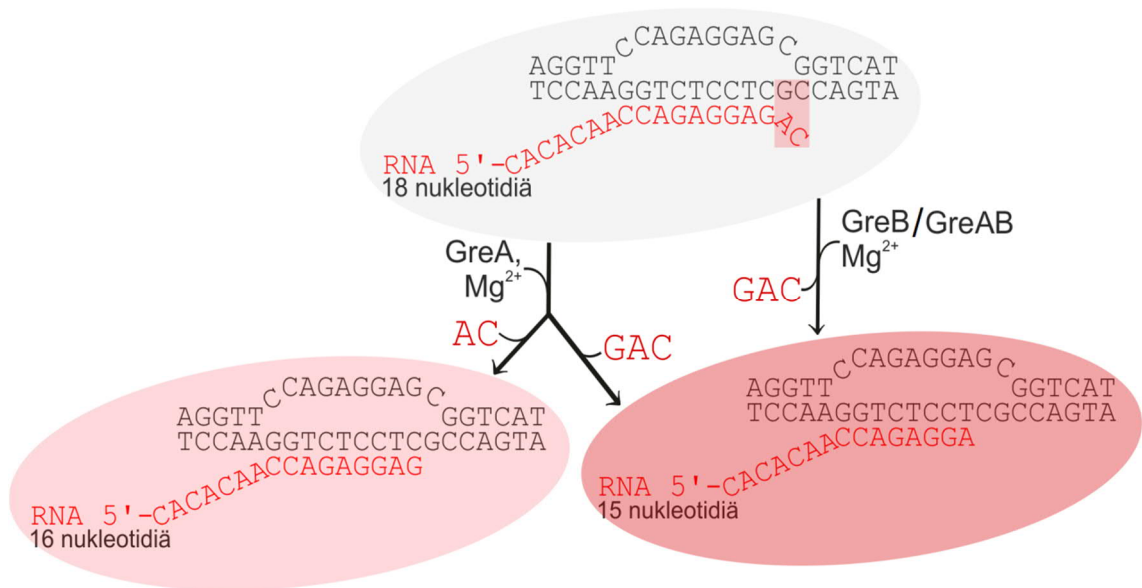
Kaikissa kehikoissa RNA ja tDNA pariutuivat 9 emäsparin verran siten, että RNA:n 3'-päässä oli kaksi pariutumaton nukleotidiä. Kehikossa C1 käytettiin RNA:ta, jonka toiseksi viimeinen emäs RNA:n 3'-päässä oli adeniiini. Muissa kehikoissa toiseksi viimeinen emäs oli adeniiinin sijaan 2AP. Kehikossa C3 tDNA:n ja ntDNA:n välillä oli väärä emäspari (dC-dC-pari) kohdassa *i*-2 (ennen leikkautumista). Kehikossa C4 käytettiin kahta lyhyttä ntDNA:ta, jotka hybridisoituivat eri päihin tDNA:ta tuottaen 10 nukleotidiä pitkän katkoksen ntDNA:han.



Kuva 24. Gre-tekijöiden indusoiman leikkautumisen spesifisyys. Leikkaamistekijöiden GreA, GreB ja GreAB indusoimaa leikkautumista tarkasteltiin neljällä erilaisella DNA-RNA-kehikolla (taulukko 7). RNA:n annettiin leikkautua Gre-tekijän läsnä ollessa 10 minuuttia 1 mM Mg²⁺-pitoisuudessa. Eripituiset RNA-tuotteet kvantitoitiin RNA-geeliltä. Pylvään värit kuvaavat eripituisien RNA-tuotteiden osuutta kaikesta havaitusta RNA:sta: RNA17 (-1 NMP) keltainen, RNA16 (-2 NMP) kirrkaanpunainen, RNA15 (-3 NMP) tummanpunainen, RNA14 ja RNA13 (-4 NMP ja -5 NMP) sininen.

Havaitsimme GreA:n, GreB:n ja GreAB:n välillä selkeitä eroja sekä RNA:n leikkautumisen tehokkuudessa että spesifisyydessä eri hybrideissä (**kuva 24**). GreA:n havaittiin leikkaavan RNA:ta sekä kahden että kolmen nukleotidin verran, kun taas GreB:n havaittiin leikkaavan pääasiassa kolmen nukleotidin verran. Kehikoissa C1 ja C2 sekä GreA:n että GreB:n havaittiin tuottavan myös viidellä nukleotidilla leikkautunutta RNA:ta (RNA13). Kyseistä tuotetta ei havaittu kehikoissa C3 ja C4. Merkittävin havainto on, että GreAB indusoi leikkautumista spesifisesti kolmen nukleotidin verran kuten GreB samalla kun GreA leikkaa RNA:ta sekä kahden että kolmen nukleotidin verran (**kuva 25**). Näin ollen Gre-tekijän kärkeen kohdistetut mutaatiot todella muuttivat GreA:n leikkaamisen spesifisyyttä GreB:n kaltaiseksi.

Kehikossa C1 oli havaittavissa vähäistä RNA-polymeraasin RNAasiaktiivisuutta (keskimäärin 11.6 % kolmen nukleotidin verran leikkautunutta RNA:ta). Muissa kehikoissa ei havaittu merkittäviä määriä leikkautumista ilman Gre-tekijöitä eli leikkautuminen on pääasiassa Gre-tekijöiden indusoimaa kehikoissa C2-C4. Kehikoissa C1 ja C2 leikkautumistuotteiden määräsuhteet ovat hyvin samanlaisia, mutta kehikossa C2 on havaittavissa 20 % vähemmän leikkautumista kuin kehikossa C1. Kehikossa C1 RNA:n 3'-pään toiseksi viimeinen nukleotidimäs oli adeniini, kun taas kehikoissa C2-C4 sen tilalla oli 2AP. 2AP vähensi siis Gre-tekijöiden indusoimaa RNA:n leikkautumista ollessaan toiseksi viimeinen nukleotidi RNA:n 3'-päässä. Kehikossa C3 ainoa ero kehikkoon C2 on väärä emäspari tDNA:n ja ntDNA:n välillä. Tässä kehikossa RNA ei enää leikkautunut viiden nukleotidin pituudelta, vaikka leikkautumista havaittiin yhteensä noin 10 % enemmän kuin kehikossa C2. Samalla havaittiin kasvua kolmella nukleotidilla leikkautuneen RNA:n määrässä kaikilla Gre-tekijöillä. Kehikossa C4 ntDNA:ssa oli 10 nukleotidin pituinen katkos, jolloin RNA:n leikkautumista havaittiin GreA:n ja GreB:n läsnä ollessa yli 80 %. GreA:n läsnä ollessa kahdella nukleotidilla leikkautuneen RNA:n osuus kasvoi huomattavasti suhteessa kolmella leikkautuneeseen RNA:han. GreB:llä havaittiin edelleen pääasiassa kolmella nukleotidilla leikkautunutta RNA:ta. GreA:sta ja GreB:stä poiketen GreAB:llä ei havaittu merkittävää muutosta RNA:n leikkautumisessa verrattuna muihin kehikkoihin, mikä voi johtua mutaatioiden aiheuttamasta heikentyneestä affiniteetista RNA-polymeraasiin.

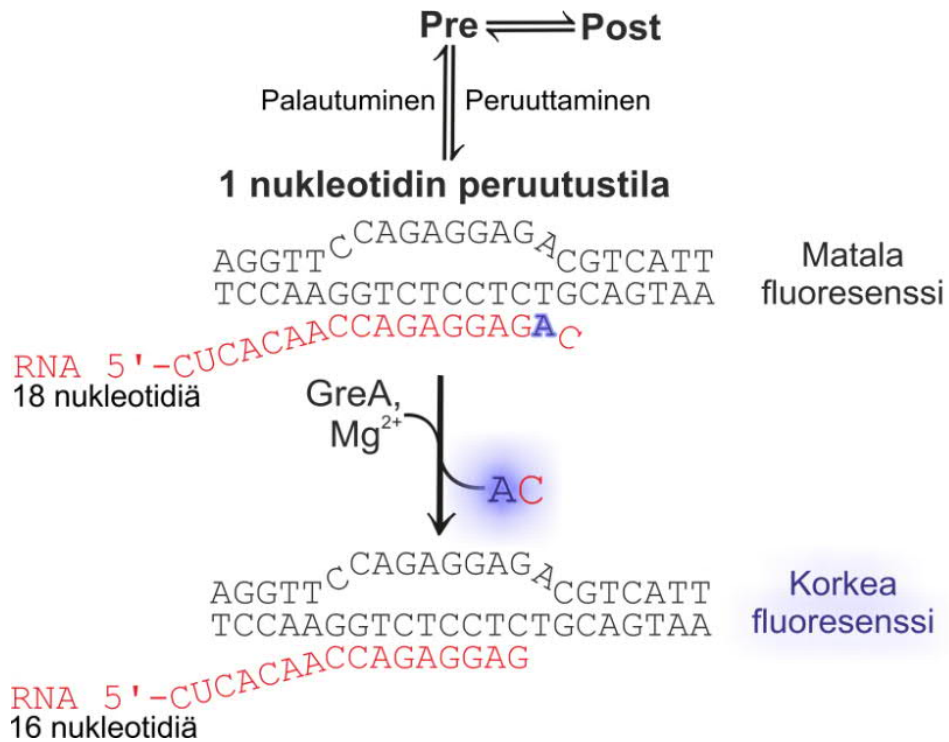


Kuva 25. Gre-tekijät indusoivat RNA:n leikkautumista eri kohdista. Kuvan kehikossa (C1) RNA:N 3'-pään toiseksi viimeinen nukleotidimäs on adeniini, muissa kehikoissa (C2-C4) käytettiin adeniinimäksen sijaan 2AP:ia. RNA:n leikkautuminen käynnistettiin lisäämällä TEC:n joukkoon leikkaamistekijää (GreA, GreB tai GreAB) ja magnesiumia. GreA:n läsnä ollessa RNA leikkautui joko kahden tai kolmen nukleotidin verran, GreB:n ja GreAB:n läsnäollessa vain kolmen nukleotidin verran.

4.5 Transkription aloitustekijän σ^{70} vaikutus peruutustilan muodostumiseen

Transkription aloitusvaiheessa erilaiset σ -tekijät sitoutuvat RNA-polymeraasiin ja ohjaavat sen sitoutumista promoottorialueelle. σ^{70} vastaa bakteerisolujen ylläpitogeneenien transkriptiosta säädellen yli tuhannen eri geenin lukua (Paget & Helmann, 2003). Transkriptiotekijä NusG korvaa σ -tekijän RNA-polymeraasin siirtyessä transkription aloitusvaiheesta pidennysvaiheeseen. Sekä σ^{70} että NusG sitoutuvat *E. coli* RNA-polymeraasissa β' -alayksiköiden muodostaman ”puristinkierteisiin” (*engl.* ”clamp helices”), missä ne vuorovaikuttavat ylävirran DNA:n kanssa (Zuo & Steitz, 2015; Liu & Steitz, 2017). NusG:n on havaittu tehostavan RNA:n synteisiä estämällä RNA-polymeraasia siirtymästä peruutustilaan stabiloimalla ylävirran DNA:ta (Turtola & Belogurov, 2016). Tutkimme myös samaan kohtaan sitoutuvan σ^{70} :n vaikutusta peruutustilaan siirtymisessä, koska myös σ^{70} vuorovaikuttaa ylävirran DNA:n kanssa ja sen on osoitettu tuottavan RNA polymeraasin pysähtelyä promoottorin lähellä (Perdue & Roberts, 2011).

Tutkimme peruutustilaan siirtymistä seuraamalla RNA:n leikkautumisen nopeutta transkriptiotekijöiden läsnä ollessa. Kokeissa koottiin TEC käyttäen kehikkoa D1, jossa hybridisoituvan alueen pituus oli 11 emäsparia (**taulukko 8**). Tämä mahdollisti RNA-polymeraasin siirtymisen post-, pre- ja peruutustilojen välillä. Leikkautuminen indusoitiin sekoittamalla TEC:iä GreA:n (8 μ M) ja MgCl₂:n (1 mM) kanssa. Gre-indusoitu RNA:n leikkautuminen on nopea reaktio, jolloin leikkautumisreaktiota rajoittava vaihe on peruutustilaan siirtyminen, joten seurassimme peruutustilan muodostumista GreA:n indusoiman leikkautumisen avulla (**kuva 26**). RNA-polymeraasin siirtymistä peruutustilaan havaittiin kahdella eri menetelmällä: mittaamalla leikkautumisesta johtuvaa fluoresenssinmuutosta stopped-flow-laitteella ja seuraamalla RNA:n leikkautumistuotteita denaturoivalla polyakryyliamidigeelillä erillisessä kokeessa (**kuva 27**). TEC koottiin ilman magnesiumia ennen aikaisen leikkautumisen estämiseksi. Kehikossa D1 RNA:n 3'-pään toiseksi viimeinen nukleotidimäs oli 2AP, joka fluoresoi irrotessaan RNA:n 3'-päästä (eksitaatiomaksimi 320 nm, emissiomaksimi 375 nm). Mittasimme RNA:n 3'-päästä irtoavan 2AP:n tuottaman fluoresenssisignaalin muutosta aikayksikössä. RNA:n 5'-pään Atto680-leima mahdollisti leikkautumistuotteiden havaitsemisen denaturoivalla polyakryyliamidigeelillä. Molempien kokeiden havainnot sovitettiin Weibullin venytettyyn eksponenttiyhtälöön ja sovitetuista käyristä määritettiin reaktioiden puoliintumisajat.

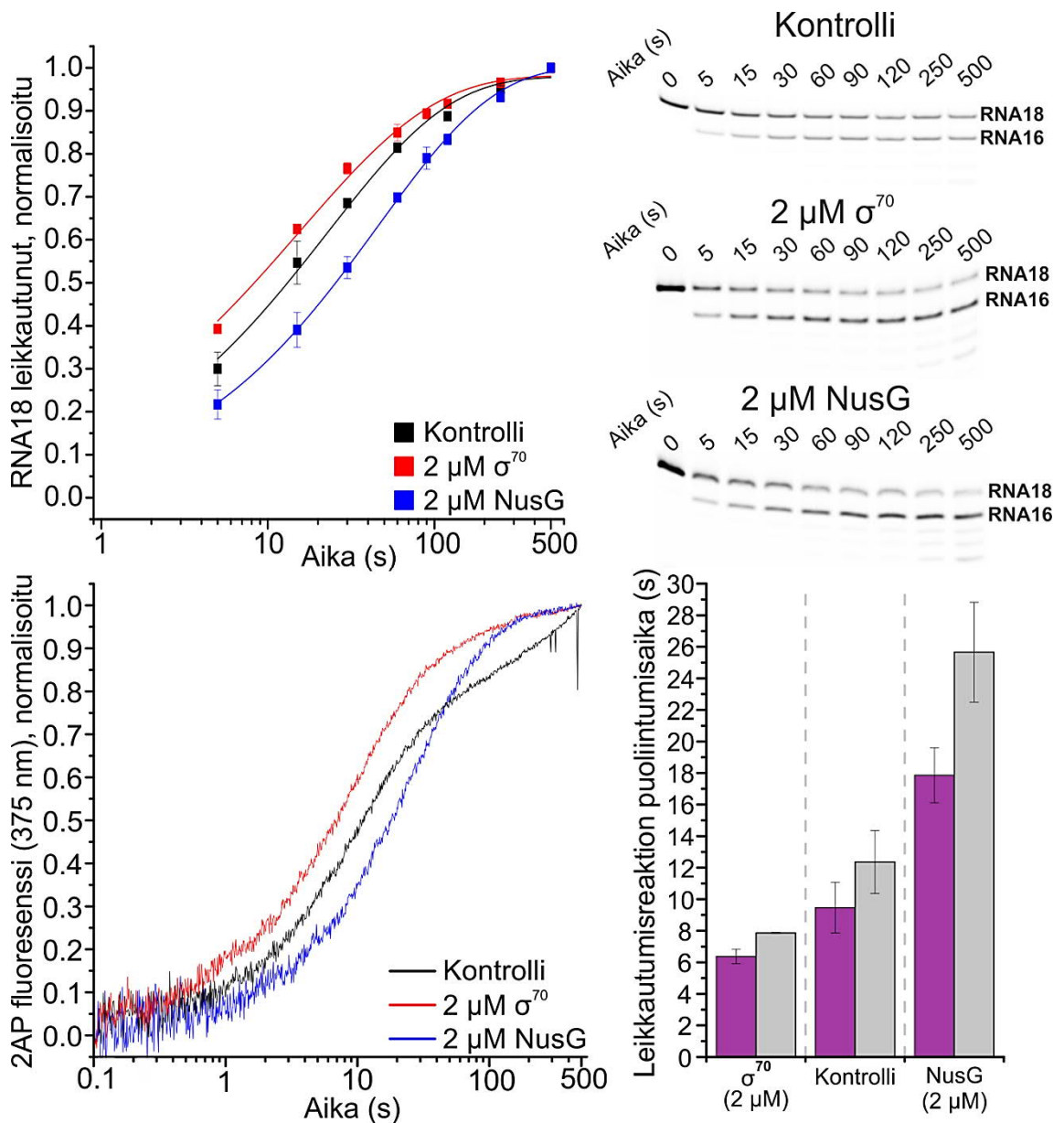


Kuva 26. Peruutustilan muodostumisen mittaaminen Gre-tekijän indusoiman leikkautumisen avulla. TEC koottiin käyttäen kehikkoa D1 (taulukko 8), joka voi siirtyä post-, pre- ja peruutustilan välillä. TEC:n joukkoon lisättiin GreA:ta ja magnesiumia, mikä sai aikaan RNA:n leikkautumisen peruutustilassa. RNA:n 3'-pään toiseksi viimeinen nukleotidi oli analogi 2AP, jonka fluoresenssi kasvaa sen erkaantuessa hiljentäjästänsä (RNA:n 3'-pään kolmanneksi viimeinen emäs, guaniini). 2AP:n (sininen A) avulla RNA:n leikkautuminen voitiin havaita mittaamalla fluoresenssinmuutosta. RNA:n 5'-päähän liitetty Atto680-leima mahdollisti myös RNA:n leikkautumistuotteiden havaitsemisen geeliltä. RNA:n leikkautumista rajoittaa peruutustilaan siirtyminen, joten koeasetelmaa käytettiin vertaamaan miten nopeasti TEC siirtyy peruutustilaan leikkaamaan RNA:ta transkriptiotekijän σ^{70} läsnäollessa.

Kuten aiemmin on havaittu (Turtola & Belogurov, 2016), NusG estää peruutustilaan siirtymistä, sillä sen läsnäollessa leikkautumisreaktion puoliintumisaika kaksinkertaistui (kuva 27). Sitä vastoin σ^{70} :n läsnäollessa havaitsimme RNA-polymeraasin siirtyvän peruutustilaan noin 1.5 kertaa nopeammin kuin ilman transkriptiotekijöitä.

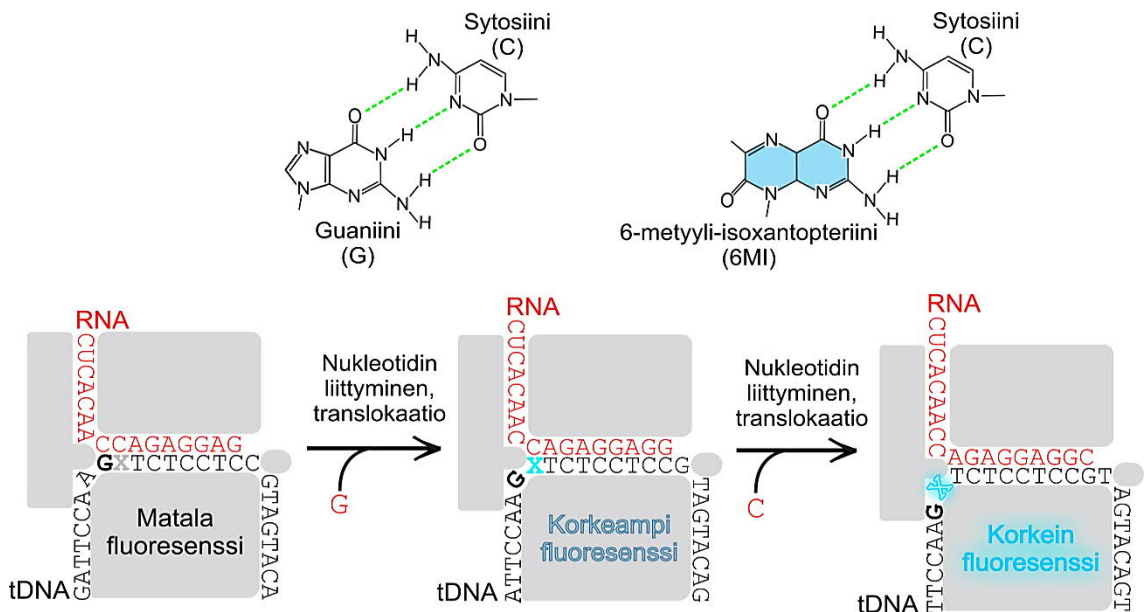
Taulukko 8. Transkriptiotekijän σ^{70} vaikutuksien tutkimisessa käytetyt DNA-RNA-kehikot. Taulukossa on esitetty DNA-RNA-kehikkojen rakenteet ennen reaktioita.

DNA-RNA-kehikko	Kehikon rakenne	TEC:n konformaatiot	Emäs-analogit
Kehikko D1 tDNA: S076 RNA: R052 ntDNA: S057	<p style="text-align: right;">CCAGAGGAGA</p> <p>S057 5' -ACTTGTAGCGATCTAAGGTT CGTCATTGCAGTAGAGTAGC-3'</p> <p>S076 3' -TGAACATCGCTAGATTCCAAGGTCTCCTCTGCAGTAACGTCATCTCATCG-5'</p> <p style="text-align: center;">CCAGAGGAGX</p> <p style="text-align: center;">R052 5' Atto680-CUCACAA C</p>	11 pariutuvaa emästä, voi siirtyä 1 nukleotidin peruutustilaan	2AP (X) RNA:ssa, i+2 asema
Kehikko D2 tDNA: S041M RNA: R024 ntDNA: S042	<p style="text-align: right;">CCAGAGGAGG</p> <p>S042 5' -ACTTGTAGCGATCTAAGGTT CATCATGTCAGTAGAGTAGC-3'</p> <p>S041M 3' -TGAACATCGCTAGATTCCAAGXTCTCCTCCGTAGTACAGTCATCTCATCG-5'</p> <p style="text-align: center;">CCAGAGGAG</p> <p style="text-align: center;">R024 5' Atto680-CUCACAA</p>	9 pariutuvaa emästä	6MI (X) tDNA:ssa, i-8 asema
Kehikko D3 tDNA: S041M RNA: R030 ntDNA: S042	<p style="text-align: right;">CCAGAGGAGG</p> <p>S042 5' -ACTTGTAGCGATCTAAGGTT CATCATGTCAGTAGAGTAGC-3'</p> <p>S041M 3' -TGAACATCGCTAGATTCCAAGXTCTCCTCCGTAGTACAGTCATCTCATCG-5'</p> <p style="text-align: center;">CCAGAGGAG</p> <p style="text-align: center;">R030 5' -CUCACAA</p>	9 pariutuvaa emästä	6MI (X) tDNA:ssa, i-8 asema



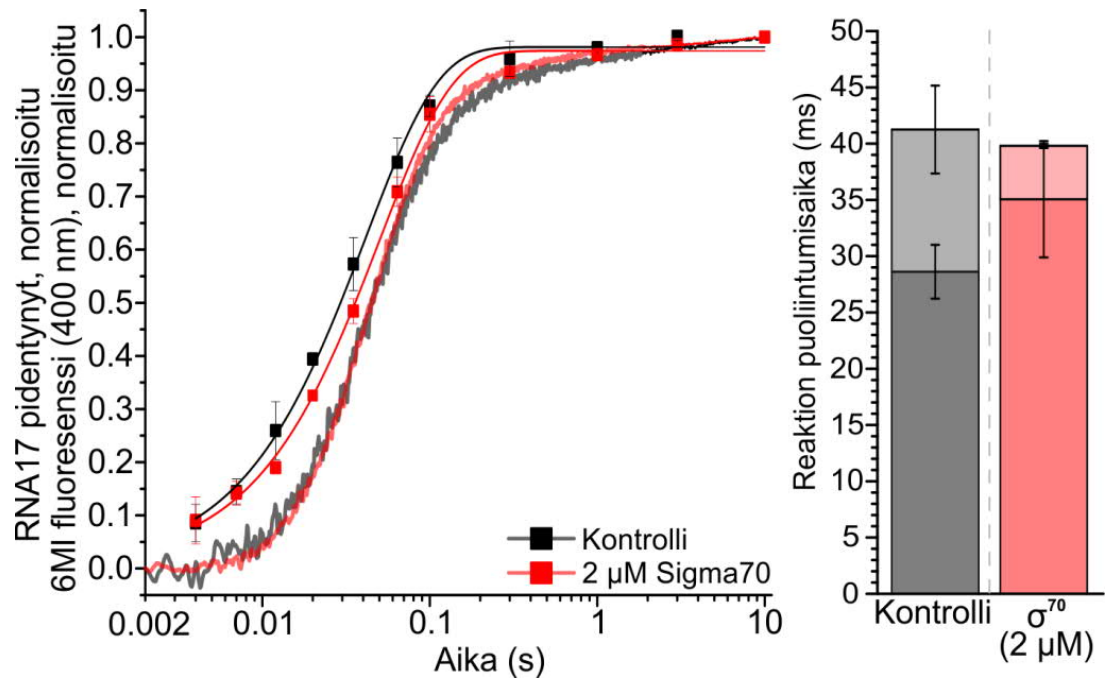
Kuva 27. Transkriptiotekijöiden vaikutus GreA:n indusoimaan RNA:n leikkautumiseen. RNA-polymeraasin siirtymistä peruutustilaan tutkittiin GreA:n indusoiman RNA:n leikkautumisen avulla joko transkriptiotekijän σ^{70} tai NusG läsnäollessa. Kontrollireaktiossa TEC:iä inkuboitii ilman transkriptiotekijöitä. GreA:n indusoimaa RNA:n leikkautumista seurattiin kahdella menetelmällä: aikaerotteisesti denaturoivalla polyakryyliamidigeelillä (yllä kvantointi sekä geelikuvat) ja 2AP:n leikkautumisesta havaittavan fluoresenssinmuutoksen perusteella (alhaalla vasemmalla). Leikkautumistuotteiden määrä ja 2AP:n leikkautumisesta aiheutuva fluoresenssin muutos aikayksikössä sovitettiin Weibullin venytettyyn eksponenttiyhtälöön ja sovitetuista käyristä määritettiin reaktioiden puoliintumisaajat. (Alhaalla oikealla) Fluoresenssin muutoksesta määritetyt puoliintumisaajat (violetti) ja geelillä analysoitujen leikkautumisreaktioiden puoliintumisaajat (harmaa). $n = 2$.

Mahdollinen mekanismi, jolla σ^{70} voisi tehostaa peruutustilaan siirtymistä, on translokaation hidastaminen, mikä lisäisi pre-tilan määrää ja siten RNA-polymeraasin todennäköisyyttä siirtyä peruutustilaan. Tästä syystä tutkimme σ^{70} :n vaikutusta nukleotidin liittymisen ja translokaation nopeuksiin. Kokeissa käytettiin kehikkoja D2 ja D3, joissa 9 emäsparia pitkä hybridisoituva alue stabiloi TEC:n post-tilaan (**taulukko 8**). Kehikkoa D2 käytettiin GTP:n liittymisen (katalyysin) reaktionopeuden selvittämiseen quench-flow-laitteella. Kehikkoa D3, jossa RNA oli leimaamaton (ei Atto680-leimaa RNA:n 5'-päässä), käytettiin translokaation seuraamisen reaaliajassa stopped-flow-laitteella. Tämä oli mahdollista tDNA:han liitetyn fluoresoivan 6MI-leiman avulla. Havaitut fluoresenssin muutokset perustuvat viereisten nukleotidien emästen "stacking"-vuorovaikutuksiin, joissa analogin viereinen emäs estää fluoresenssiä. RNA-polymeraasin liikuessa myös fluoresoiva 6MI-leima liikkuu ja erkanee hiljentäjästä kasvattaen fluoresenssisignaalia (**kuva 28**) (Hawkins, 2008; Malinen ym. 2015).



Kuva 28. Fluoresoivan 6MI-leiman käyttö translokaation havaitsemisessa. (Ylhäällä) 6MI muodostaa sytosiinin kanssa Watson-Crick-emäsparin guaniiniemäksen tavoin. Vetysidokset on esitetty vihreillä katkoviivoilla. (Alla) Translokaatiota seurattiin stopped-flow-laitteistolla tDNA:n i-8 asemaan liitetyn fluoresoivan 6MI-leiman avulla. Kun RNA pidentyy yhdellä nukleotidilla ja RNA-polymeraasi translokoi, 6MI-leima (X) siirtyy i-9 asemaan ja sen hiljentäjä (guaniiniemäs, lihavoitu) erkanee leimasta, jolloin fluoresenssi kasvaa (Malinen ym. 2015). Kun RNA-polymeraasi translokoi uudelleen, 6MI-leiman tuottama fluoresenssi kasvaa entisestään (Turtola & Belogurov, 2016).

Nukleotidin liittämistä ja translokaatiota seurattiin millisekunnin aikaskaalalla ilman σ^{70} :ntä (kontrolli) ja σ^{70} :n (2 μ M) läsnä ollessa (**kuva 29**). Havaitimme σ^{70} :n läsnä ollessa nukleotidin liittymisen puoliintumisajan olevan keskimäärin 6 millisekuntia pidempi. Sitä vastoin translokaation puoliintumisaika laski 7 millisekuntia suhteessa villityyppiin (12 millisekunnista 5 millisekuntiin). Tämä viittaa translokaation nopeutuneen σ^{70} :n läsnä ollessa.



Kuva 29. Transkriptiotekijän σ^{70} vaikutus nukleotidin liittymiseen ja translokaatioon. (Vasemmalla) RNA:n pidentymistä (nukleotidin liittymistä) seurattiin quench-flow-laitteistolla aikaerotteisesti. Translokaatiota seurattiin stopped-flow-laitteistolla tDNA:n i-8 asemaan liitetyn fluoresoivan 6MI-leiman avulla (**kuva 28**). Havainnot sovitettiin yhden eksponentin yhtälöön (luku 3.5.6) ja sovitetuista käyristä määritettiin reaktioiden puoliintumisajat. (Oikealla) Nukleotidin liittymisen (alempi pylväs, tumma) ja translokaation (ylempi pylväs, vaalea) puoliintumisajat. $n = 2$.

5. Tulosten tarkastelu

Selvittääksemme peruutustilan mekanismia tutkimme erilaisia RNA-polymeraasivariantteja käyttämällä erilaisia DNA-RNA-kehikkoja, joissa RNA-polymeraasi on stabiloitu yhden tai kahden nukleotidin pituisiin peruutustiloihin. Käyttämämme koeasetelmat mahdollistavat lyhyiden peruutustilojen määrän tarkan kvantitoinnin, peruutustilaan siirtymisen ja sieltä palautumisen nopeuksien selvittämisen sekä RNA:n leikkautumisen tarkastelun. Näillä koeasetelmilla on mahdollista tutkia yhden nukleotidin pituista peruutustilaa, jonka havaitsemiseen ei ole aiemmin ollut sopivia menetelmiä.

5.1 Liipaisinsilmukan laskostuminen ja magnesium stabiloivat peruutustilaa

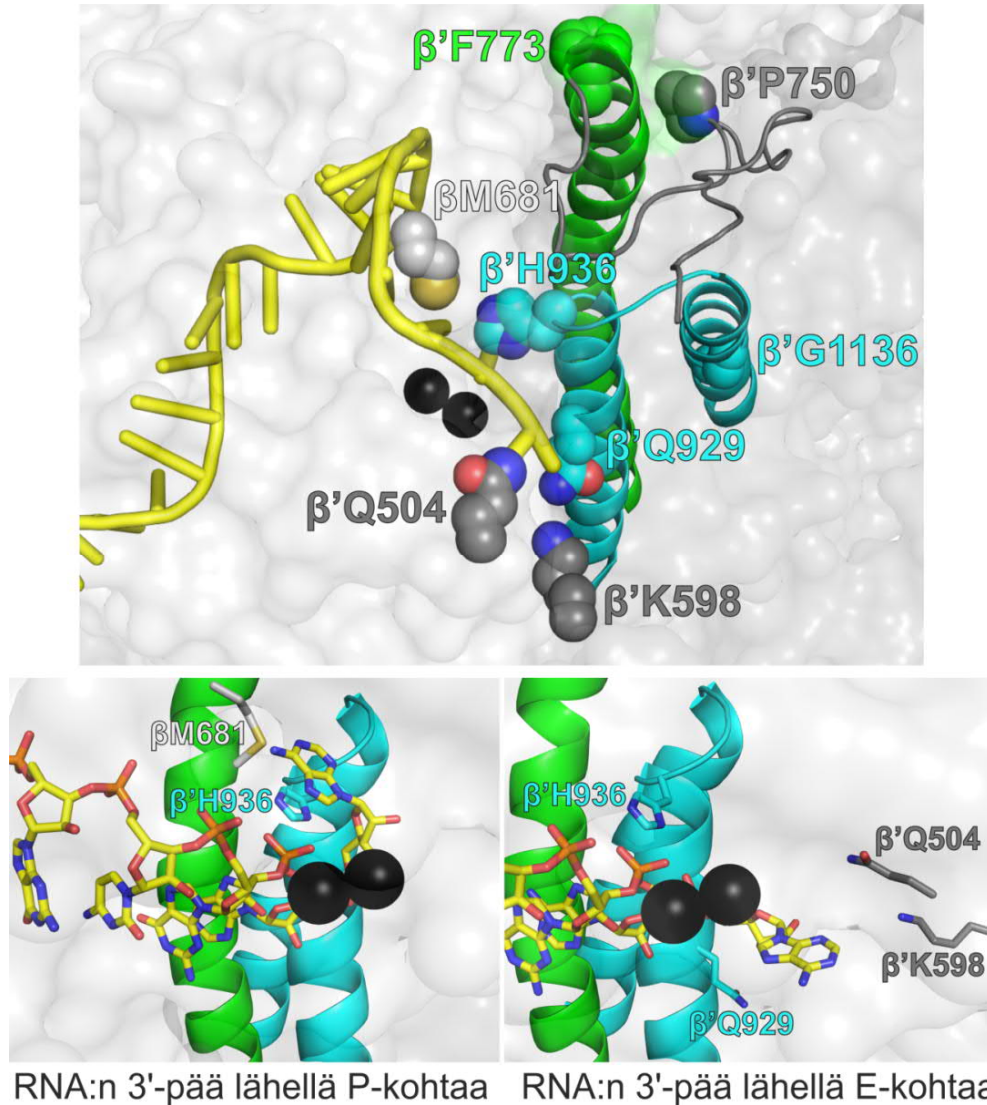
Havaitsimme liipaisinsilmukkaa stabiloivien RNA-polymeraasi varianttien β 'P750L, β 'F773V (Malinen ym. 2014) ja β 'G1136S (Meija ym. 2015) olevan villityyppiä enemmän peruutustilassa ja poistuvan sieltä huomattavasti hitaammin. Vastaavasti β 'H936Q, joka destabiloi RNA:n ja liipaisinsilmukan välisiä vuorovaikutuksia (Mishanina ym. 2017), oli hyvin vähän peruutustilassa. Nämä tulokset osoittavat liipaisinsilmukan laskostuneen konformaation stabiloivan peruutustilaa. Tämä on ristiriidassa peruutustilassa olevan *T. thermophilus* RNA-polymeraasin kiderakenteen kanssa (Sekine ym. 2015, PDB: 4WQS). Tässä kiderakenteessa liipaisinsilmukka on taipunut pois päin aktiivisesta keskuksesta osittain laskostumattomaan muotoon (**kuva 8**, sivu 21). Tämä malli on saatu kiteytetyistä elongaatiokomplekseista, jotka muodostettiin ilman magnesiumia. Tuloksemme osoittavat magnesiumin stabiloivan peruutustilaa, joten magnesiumin puuttuminen kristallisoiduista TEC:eista voi selittää havaittuja eroja mallien ja kokeellisen datan välillä. Lisäksi viimeaikaisissa julkaisuissa on havaittu, että liipaisinsilmukan aminohappojen mutaatiot vaikuttavat eripituisten peruutustilojen stabiilisuuteen (Mishanina ym. 2017), mitä havaintomme tukevat.

5.2 RNA:n leikkautuminen riippuu liipaisinsilmukan laskostumisesta sekä vuorovaikutuksista P-kohdan ja E-kohdan kanssa

Saamamme tulokset osoittavat liipaisinsilmukan olevan keskeinen tekijä myös RNA:n leikkautumisessa. Variantit β 'P750L, β 'F773V ja β 'G1136S leikkasivat tehokkaasti RNA:ta, vaikka ne eivät voi sijaintinsa vuoksi suoraan vuorovaikuttaa RNA:n kanssa (**kuva 30**). Muutokset RNA:n leikkautumisessa johtuvat siis niiden vaikutuksista liipaisinsilmukan laskostuneen muodon stabiilisuuteen. RNA:n leikkautumista tarkasteltiin RNA:n 3'-pään ollessa pariutunut (rA-dT-pari, kehikko B1, **taulukko 5**) ja RNA:n ollessa pariutumaton (rA-dG-pari, kehikko B2, **taulukko 5**). Laskostunutta liipaisinsilmukkaa stabiloivat variantit leikkasivat RNA:ta molemmissa tapauksissa huomattavasti villityyppiä tehokkaammin, mikä on selitettävissä peruutustilan stabiloitumisella silloin, kun RNA:n 3'-pää on pariutunut. Väärä emäspari (rA-dG-pari) RNA:n 3'-päässä stabiloi RNA-polymeraasin peruutustilaa destabiloimalla pre- ja post-tiloja, jolloin laskostuneen liipaisinsilmukan vaikutus peruutustilan stabiilisuuteen ei yksinään selitä yli 3 kertaa nopeampaa RNA:n leikkautumista suhteessa villityyppiin varianteissa β 'P750L, β 'F773V ja β 'G1136S. Jos liipaisinsilmukka tehostaisi RNA:n leikkautumista ainoastaan stabiloimalla peruutustilaa, variantit β 'P750L, β 'F773V ja β 'G1136S leikkaisivat RNA:ta yhtä nopeasti kuin villityyppi peruutustilaan stabiloidussa elongaatiokompleksissa, kuten peruutustilaa destabiloivien varianttien β M681Y ja β 'H936Q havaittiin tekevän.

Tulokset antavat viitteitä siitä, että liipaisinsilmukan laskostuminen ei pelkästään stabiloi peruutustilaa vaan tehostaa myös RNA:n leikkautumista. Tätä päätelmää tukee edelleen se, että mutaatiot liipaisinsilmukassa itsessään (β 'Q929A, β 'H936A ja β 'H936Q) vaikuttivat voimakkaasti RNA:n leikkautumiseen. Inaktivoivat alaniinimutaatiot käytännössä hävittivät RNA-polymeraasin sisäisen RNAasiaktiivisuuden ja konservoituneen histidiinin vaihdos glutamiiniksi (β 'H936Q) heikensi leikkautumista RNA:n 3'-pään ollessa pariutunut todennäköisesti estämällä peruutustilan muodostumista. Nämä tulokset tukevat artikkelissa Mishanina ym. 2017 esitettyjä johtopäätöksiä, joiden mukaan liipaisinsilmukka ohjaa RNA:n 3'-pään orientaatiota leikkautumisessa. Tulosten varmentamiseksi tulisi kuitenkin selvittää voivatko

liipaisinsilmukan laskostunutta muotoa stabiloivat variantit β' P750L, β' F773V ja β' G1136S stabiloia peruutustilaa edelleen silloin, kun RNA:n 3'-pää ei ole pariutunut.



Kuva 30. Malli peruutustilassa olevasta RNA:sta. (Yllä) Aminohapot, joihin tutkimuksessa kohdistettiin mutaatioita, on esitetty palloina niiden sijainnin osoittamiseksi. Esitetyssä mallissa liipaisinsilmukka (syaani) on laskostuneessa muodossa. Siltakierre on värjätty vihreäksi. RNA (keltainen) on yhden nukleotidin pituisessa peruutustilassa. (Alla) Kaksi mallia, joissa RNA:n 3'-pää on eri orientaatioissa. Kuvan rakennemallit on muokattu artikkelissa Turtola & Belogurov 2016 esitetystä rakennemallista.

Fysiologisesti on täysin ymmärrettävää, että liipaisinsilmukka itsessään ei leikkaa RNA:ta, sillä muuten RNA:n leikkautuminen kilpailisi nukleotidin liittymisen kanssa, mikä hidastaisi transkriptiota. Näin ollen leikkautuminen tapahtuu tehokkaasti vain RNA-polymeraasin ollessa peruutustilassa, jossa

RNA:n 3'-pää ei ole katalyyttisessä kohdassa vaan ohjautunut pois päin aktiivisesta keskuksesta. Peruutustilassa liipaisinsilmukka ohjaa RNA:n leikkautumisen kannalta suotuisaan asemaan, muttei osallistu leikkautumisreaktion katalyyysiin. Riippumatta RNA:n leikkautumismekanismista on selvää, että liipaisinsilmukalla on oltava siinä keskeinen rooli.

Tutkimme myös, miten P-kohtaan kohdistettu mutaatio β M681Y ja E-kohtaan kohdistetut mutaatiot β 'Q504R ja β 'K598W vaikuttavat peruutustilan stabiilisuuteen ja RNA:n leikkautumiseen. Näiden muutosten avulla pyrimme selvittämään missä konformaatiossa RNA:N 3'-pää on yhden nukleotidin peruutustilassa. Variantti β M681Y, jonka havaittiin olevan villityyppiä vähemmän peruutustilassa, leikkasi RNA:ta villityyppiä hitaammin RNA:n 3'-pään ollessa pariutunut eli hidas leikkautuminen on selitettävissä peruutustilan vähäisellä määrällä. Vastaavasti RNA-polymeraasin ollessa stabiloituna peruutustilaan variantti β M681Y leikkasi RNA:ta yhtä nopeasti kuin villityyppi eli mutaatio todennäköisesti vaikutti leikkautumiseen ainoastaan destabiloimalla peruutustilaa. Yllättäen E-kohdan varianteissa β 'Q504R ja β 'K598W RNA:n leikkautuminen oli tehokkaampaa kuin muissa *E. coli* RNA-polymeraasivarianteissa. Näillä mutaatioilla pyrittiin heikentämään yhden nukleotidin peruutustilassa olevan RNA:n 3'-pään sitoutumista E-kohtaan. Variantilla β 'Q504R havaittiin vähemmän peruutustilaa kuin villityypillä, kun taas β 'K598W ei vaikuttanut peruutustilan määrään. Tästä huolimatta molemmat variantit leikkasivat RNA:ta huomattavasti nopeammin kuin muut variantit silloinkin, kun RNA-polymeraasi kykeni poistumaan peruutustilasta. E-kohtaan kohdistettujen mutaatioiden vaikutukset peruutustilan stabiilisuuteen eivät siis selitä RNA:n leikkautumisen nopeutumista näillä varianteilla. Yksi mahdollinen selitys leikkautumisen nopeutumiselle on, RNA:n sitoutuminen E-kohtaan suojaaa RNA:ta leikkautumiselta *E. coli* RNA-polymeraasissa, jolloin E-kohdan ja RNA:n 3'-pään vuorovaikutusten heikentäminen mutaatioilla tehostaa RNA:n leikkautumista. P- ja E-kohta ovat aktiivisessa keskuksessa erillään toisistaan, mutta molempiin kohtiin kohdistetut mutaatiot vaikuttivat merkittävästi peruutustilan stabiilisuuteen ja leikkautumiseen. Tästä on mahdollista päätellä, että peruutustilassa oleva RNA:n 3'-pää voi esiintyä eri orientaatioissa ja siten vuorovaikuttaa eri aminohappotähteiden kanssa (**kuva 30**).

Leikkautumiskokeiden toistojen välillä havaittiin merkittävästi hajontaa erityisesti niissä kokeissa, joissa RNA-polymeraasi leikkasi RNA:ta nopeasti. Koska RNA:n leikkautumisreaktiot ovat hyvin hitaita, pienimmätkin muutokset olosuhteissa, kuten Mg^{2+} -pitoisuudessa, pH:ssa, lämpötilassa ja RNA-polymeraasin aktiivisuudessa voivat muuttaa reaktionopeuksia merkittävästi kasvattaen hajontaa kokeiden välillä. Tulosten luotettavuuden kannalta on siis tärkeää lisätä toistojen määrää ja muokata koeasetelmassa käytettyjä olosuhteita niin, että hajonta kokeiden välillä pienenee.

5.3 Gre-tekijän kärkiosan aminohapot ohjaavat RNA:n leikkautumista

Tutkimuksessa tuotimme GreA-variantin GreAB, jossa osa GreA:n kärkiosan aminohapoista on vaihdettu vastaamaan GreB:tä. Tämän variantin avulla yritimme selvittää, mitkä aminohapot GreB:n kärkiosassa ohjaavat RNA:ta leikkautumaan eri kohdasta kuin GreA:n indusoimassa leikkautumisessa. Mutaatiot R37A, E38S, H39Q, L42R ja K43S GreA:n kärjessä yhdessä aikaansaiivat muutoksen leikkautumisen spesifisyydessä: GreAB indusoi RNA:n leikkautumista ainoastaan samasta kohdasta kuin GreB. Kaikissa kokeissa GreAB:n läsnä ollessa RNA:ta leikkautui vähemmän kuin GreA:n ja GreB:n läsnä ollessa, mikä johtuu joko heikentyneestä sitoutumisesta RNA-polymeraasiin, leikkautumis-reaktion vääränlaisesta koordinoimisesta tai molemmista.

Tulosten avulla ei voi suoraan päätellä mitkä mutaatioista saivat aikaan muutoksen leikkautumisen spesifisyydessä. Tarkasteltaessa julkaistua kiderakennetta, jossa *T. thermophilus* RNA-polymeraasi on kompleksoitunut kimeerisen GreA-Gfh1-proteiinin kanssa (PDB: 4WQT), havaitaan, että GreA:n kärjen aminohapot D41, L42, K43 ja E44 työntyvät sekundääriskanavan kautta aktiiviseen keskukseen (Sekine ym. 2015). Aspartaatti D41 ja glutamaatti E44 sitovat aktiivisen keskuksen magnesiumia, jonka oletetaan osallistuvan leikkautumisreaktion katalyysiin (Sosunova ym. 2003), joten näiden aminohappojen välissä olevat aminohappotähteet (leusiini L42 ja lysiini K43 GreA:ssa, arginiini R42 ja seriini S43 GreB:ssä) saattaisivat vaikuttaa siihen miten D41 ja E44 koordinoivat magnesiumia ja siten leikkautumista.

Jatkotutkimuksia varten tulisi tuottaa GreA-variantteja, joissa mutaatioita on kohdennettu vain aminohappotähteisiin L42 ja K43, tai GreB-variantteja, joissa päinvastoin mutatoidaan aminohappotähteet R42 ja S43 vastaamaan GreA:ta.

Lisäksi havaitsimme tDNA:n ja ntDNA:n välillä olevien muutosten vaikuttavan merkittävästi Gre-tekijöiden kykyyn indusoida leikkautumista. Kun RNA:n 3'-pään emäs vaihdettiin adeniinista analogiksi 2AP, Gre-tekijöiden indusoima RNA:n leikkautuminen väheni 20-prosenttiyksikköä. 2AP siis häiritsi RNA:n leikkautumista eli leikkautuvan nukleotidin emäsosan rakenne mahdollisesti vaikuttaa leikkautumiseen, kuten aiemmin on esitetty (Zenkin ym. 2006). Kun tDNA:n ja ntDNA:n välille tuotettiin dC-dC-pari, RNA:n leikkautumisen määrä ei laskenut, mutta viiden nukleotidin verran leikkautunutta RNA:ta ei enää havaittu. Samalla havaittiin enemmän kolmen nukleotidin verran leikkautunutta RNA:ta. Tämä viittaa siihen, että dC-dC-pari esti RNA:ta leikkautumasta enempää kuin kolmen nukleotidin verran. Kun käytimme epäjatkovaa ntDNA, jossa oli 10 nukleotidiä pitkä katkos RNA-tDNA-hybridin kohdalla, GreA:n ja GreB:n läsnä ollessa RNA:sta leikkautui 80–90 % eli leikkautuminen tehostui huomattavasti. Katkonainen ntDNA-juoste myös muutti GreA:n indusoimaa leikkautumista siten, että suurin osa leikkautumistuotteista on leikkautunut kahdella, kun muissa kehikoissa GreA leikkasi RNA:ta kahden ja kolmen nukleotidin verran lähes yhtä paljon. Nämä tulokset antavat ymmärtää, että Gre-tekijän indusoima leikkautumiseen vaikuttaa koko RNA-tDNA-hybridin rakenne, ei pelkästään peruutustilassa oleva RNA. Nämä tulokset vaativat lisäselvityksiä tarkemman hypoteesin muodostamiseksi.

5.4 RNA leikkautuu tehokkaasti ja spesifisesti kahden guaniiniemäksen välistä

Tutkiessamme RNA:n sisäistä RNAasiaktiivisuutta havaitsimme RNA:ssa olevan sekvenssin "GGA" ohjaavan RNA:n leikkautumista spesifisesti kahden guaniiniemäksen välistä. Tutkimuksissamme havaitsimme, että *E. coli* RNA-polymeraasi villityyppi ja sen variantit sekä *D. radiodurans* RNA-polymeraasi leikkasivat RNA:ta peruutustilassa spesifisesti kahden guaniiniemäksen välistä. Havaitsimme samankaltaista spesifisyyttä RNA:n leikkautumisessa, kun

tutkimme Gre-tekijöiden indusoimaa leikkautumista. Gre-tekijöiden läsnä ollessa RNA leikkautui myös tarkasti kahden guaniiniemäksen välistä silloin, kun Gre-tekijä kykeni leikkaamaan RNA:ta enemmän kuin kolmen nukleotidin verran. GGA-sekvenssi todennäköisesti lukitsee RNA:n 3'-pään leikkautumiselle suotuisaan asemaan ja voi sitä kautta mahdollisesti tehostaa RNA-polymeraasin palautumista pysähtyneistä komplekseista transkription aikana.

5.5 Tehostamalla peruutustilaan siirtymistä σ^{70} voi säädellä siirtymistä transkription aloituksen ja pidennysvaiheen välillä

Transkriptiossa RNA-polymeraasi ei yksinään liiku DNA:ta pitkin, vaan siihen on sitoutuneena eri aikoina vähintään yksi transkriptiotekijä, joka vaikuttaa RNA-polymeraasin toimintaan. Tästä syystä havaitsemamme erot transkription aloitustekijän σ^{70} ja pidennystekijän NusG välillä kuvastavat eroja transkription säätelyssä sen eri vaiheissa. Havaitsimme, että tekijää σ^{70} sitova RNA-polymeraasi siirtyy peruutustilaan noin 3 kertaa nopeammin kuin NusG:tä sitova RNA-polymeraasi. Ohjaamalla RNA-polymeraasin siirtymistä peruutustilaan σ^{70} hidastaa RNA:n pidentymistä transkription alussa antaen pidennystekijä NusG:lle aikaa sitoutua. Tämän jälkeen NusG estää peruutustilaan siirtymistä näin tehostaen RNA:n synteesiä pidennysvaiheessa. Siitä, miten kauan σ^{70} pysyy sitoutuneena RNA-polymeraasiin, on vaihtelevia tutkimustuloksia (Reppas ym. 2006; Mooney ym. 2009; Harden ym. 2016). On kuitenkin huomioitava, että hidastamalla transkriptiota sen alkuvaiheissa σ^{70} säätelee koko transkription nopeutta: mitä kauemmin σ^{70} on sitoutuneena RNA-polymeraasiin, sitä kauemmin koko transkriptio kestää. RNA-polymeraasin hidas eteneminen rajoittaa myös muiden RNA-polymeraasien sitoutumista promootorialueelle, mikä vähentää geenin luennan määrää (Epshtein & Nudler, 2003). Jatkotutkimuksia varten tulisi yksityiskohtaisesti selvittää, millä mekanismeilla σ^{70} tehostaa peruutustilaan siirtymistä. Myös eri σ -tekijöiden välillä voi olla eroja niin peruutustilaan ohjaamisessa kuin RNA-polymeraasiin sitoutumisessa, joten niidenkin vaikutuksia peruutustilaan ja sitä kautta transkription säätelyyn tulisi tutkia.

6. Yhteenveto

Vaikka RNA-polymeraasin peruuttaminen pysäyttääkin RNA:n synteesin, se on keskeinen osa transkriptiota ja geenien ilmenemisen säätelyä niin bakteereilla kuin eukaryooteillakin. Esimerkiksi selkäjänteisillä peruutustilasta riippuvainen RNA-polymeraasin pysähtyminen promoottorialueen lähellä säätelee jopa tuhansien geenien ilmenemistä. Peruutustilan muodostumisen ja peruutustilasta palautumisen tutkiminen auttaa ymmärtämään geenien ilmenemisen säätelyä. Transkriptiossa tapahtuvien virheiden korjaaminen eli transkription oikoluku vaatii myös peruutustilaan siirtymisen, jotta RNA-polymeraasi voi leikata liittämänsä väärän nukleotidin pois RNA:sta. Transkription oikoluvun mekanismin selvittäminen on tärkeää, sillä bakteereilla RNA:n leikkaaminen voi toimia resistenssimekanismina antibiooteiksi kehitettyjä nukleosidianalogeja vastaan. Kehittämämme koeasetelmat mahdollistavat lyhyiden peruutustilojen ja RNA:n leikkautumisen yksityiskohtaisen tarkastelun. Lisäksi niiden avulla on mahdollista seurata, miten eri transkriptiotekijät ohjaavat RNA-polymeraasin toimintaa peruutustilan kautta.

Lähteet

Abbondanzieri EA, Greenleaf WJ, Shaevitz JW, Landick R, Block SM (2005). Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*, **438(7067)**, s. 460–465.

Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, s. 36–42.

Adebali O, Chiou YY, Hu J, Sancar A, Selby CP (2017). Genome-wide transcription-coupled repair in *Escherichia coli* is mediated by the Mfd translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114(11)**, s. E2116–E2125.

Artsimovitch I, Landick R (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97(13)**, s. 7090–7095.

Bar-Nahum G, Epshtein V, Ruckenstein AE, Rafikov R, Mustaev A, Nudler E (2005). A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell*, **120(2)**, s. 183–193.

Basu RS, Warner BA, Molodtsov V, Pupov D, Esyunina D, Fernández-Tornero C, Kulbachinskiy A, Murakami KS (2014). Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, **289(35)**, s. 24549–24559.

Borukhov S, Sagitov V, Goldfarb A (1993). Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell*, **72(3)**, s. 459–466.

Bubunenko MG, Court CB, Rattray AJ, Gotte DR, Kireeva ML, Irizarry-Caro JA, Li X, Jin DJ, Court DL, Strathern JN, Kashlev M (2017). A Cre Transcription Fidelity Reporter Identifies GreA as a Major RNA Proofreading Factor in *Escherichia coli*. *Genetics*, **206(1)**, s. 179–187.

Burmann BM, Schweimer K, Luo X, Wahl MC, Stitt BL, Gottesman ME, Rösch P (2010). A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science*, **328(5977)**, s. 501–504.

Carpousis AJ, Gralla JD (1980). Cycling of Ribonucleic Acid Polymerase To Produce Oligonucleotides During Initiation in Vitro at the lac UV5 Promoter.

Chakraborty A, Wang D, Ebright YW, Korlann Y, Kortkhonjia E, Kim T, Chowdhury S, Wigneshweraraj S, Irschik H, Jansen R, Nixon BT, Knight J, Weiss S, Ebright RH (2012). Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp. *Science*, **337(6094)**, s. 591–595.

Charlet-Berguerand N, Feuerhahn S, Kong SE, Ziserman H, Conaway JW, Conaway R, Egly JM (2006). RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. *EMBO J.*, **25(23)**, s. 5481–5491.

Chen CY, Richardson JP (1987). Sequence elements essential for rho-dependent transcription termination at lambda tR1. *J. Biol. Chem.* **262(23)**, s. 11292–11299.

Chen FX, Woodfin AR, Gardini A, Rickels RA, Marshall SA, Smith ER, Shiekhattar R, Shilatifard A (2015). PAF1, a Molecular Regulator of Promoter-Proximal Pausing by RNA Polymerase II. *Cell*, **162(5)**, s. 1003–1015.

Cheung AC, Cramer P (2011). Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation. *Nature*, **471(7337)**, s. 249–253.

Cook VM, deHaseth PL (2007). Strand opening-deficient Escherichia coli RNA polymerase facilitates investigation of closed complexes with promoter DNA: effects of DNA sequence and temperature. *J. Biol. Chem.* **282(29)**, s. 21319–21326.

Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT (2008). Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science*, **322(5909)**, s. 1845–1848.

Core LJ, Waterfall JJ, Gilchrist DA, Fargo DC, Kwak H, Adelman K, Lis JT (2012). Defining the status of RNA polymerase at promoters. *Cell Rep.* **2(4)**, s. 1025–1035.

Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 ångstrom resolution. *Science*, **292(5523)**, s. 1863–1876.

Cramer P (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12(1)**, s. 89–97.

Da LT, Wang D, Huang X (2012). Dynamics of pyrophosphate ion release and its coupled trigger loop motion from closed to open state in RNA polymerase. *J. Am. Chem. Soc.*, **134(4)**, s. 2399–2406.

Dangkulwanich M, Ishibashi T, Liu S, Kireeva ML, Lubkowska L, Kashlev M, Bustamante CJ (2013). Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism. *Elife*, **2**: e00971.

Darst SA (2001). Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11(2)**, s. 155–162.

Dutta D, Shatalin K, Epshtein V, Gottesman ME & Nudler E (2011). Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell*, **146(4)**, s. 533–543.

d'Aubenton Carafa Y, Brody E, Thermes C (1990). Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.*, **216(4)**, s. 835–858.

Ehara H, Yokoyama T, Shigematsu H, Yokoyama S, Shirouzu M, Sekine S (2017). Structure of the complete elongation complex of RNA polymerase II with basal factors. *Science*, **357(6354)**, s. 921–924.

Epshtein V, Nudler E. (2003). Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation. *Science*, **300**, s. 801–805.

Esyunina D, Turtola M, Pupov D, Bass I, Klimašauskas S, Belogurov G, Kulbachinskiy A (2016). Lineage-specific variations in the trigger loop modulate RNA proofreading by bacterial RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, **44(3)**, s. 1298–1308.

Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, **292(5523)**, s. 1876–1882.

Gout JF, Thomas WK, Smith Z, Okamoto K, Lynch M (2013). Large-scale detection of in vivo transcription errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110(46)**, s. 18584–18589.

Grachev MA, Zaychikov EF (1980). Initiation by Escherichia coli RNA-polymerase: transformation of abortive to productive complex. *FEBS Lett.*, **115(1)**, s. 23-26.

Gries TJ, Kontur WS, Capp MW, Saecker RM, Record MT Jr. (2010). One-step DNA melting in the RNA polymerase cleft opens the initiation bubble to form an unstable open complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107(23)**, s. 10418–10423.

Guo X, Myasnikov AG, Chen J, Crucifix C, Papai G, Takacs M, Schultz P, Weixlbaumer A (2018). Structural Basis for NusA Stabilized Transcriptional Pausing. *Mol Cell*. **69(5)**, s. 816–827.

Gusarov I, Nudler E (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell.*, **3(4)**, s. 495-504.

Harden TT, Wells CD, Friedman LJ, Landick R, Hochschild A, Kondev J, Gelles J (2016). Bacterial RNA polymerase can retain $\sigma 70$ throughout transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113(3)**, s. 602–607.

Hart CM, Roberts JW (1991). Rho-dependent transcription termination: Characterization of the requirement for cytidine in the nascent transcript. *J. Biol. Chem.*, **266(35)**, s. 24140–24148.

Hausner W, Lange U, Musfeldt M (2000). Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **275(17)**, s. 12393–12399.

Hawkins ME (2010). Fluorescent pteridine probes for nucleic acid analysis. *Methods Enzymol.*, **450**, s. 201–231.

Hein PP, Palangat M, Landick R (2011). RNA transcript 3'-proximal sequence affects translocation bias of RNA polymerase. *Biochemistry*, **50(32)**, s. 7002–7014.

Hengrung N, El Omari K, Martin IS, Vreede FT, Cusack S, Rambo RP, Vonrhein C, Bricogne G, Stuart DI, Grimes JM, Fodor E (2015). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from influenza C virus. *Nature*, **527(7576)**, s. 114–117.

Herbert KM, La Porta A, Wong BJ, Mooney RA, Neuman KC, Landick R, Block SM (2006). Sequence-resolved detection of pausing by single RNA polymerase molecules. *Cell*, **125(6)**, s. 1083–1094.

Herbert KM, Zhou J, Mooney RA, Porta AL, Landick R, Block SM (2010). E. coli NusG inhibits backtracking and accelerates pause-free transcription by promoting forward translocation of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **399(1)**, s. 17–30.

Imashimizu M, Oshima T, Lubkowska L, Kashlev M (2013). Direct assessment of transcription fidelity by high-resolution RNA sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **41(19)**, s. 9090–9104.

Imashimizu M, Takahashi H, Oshima T, McIntosh C, Bubunencko M, Court DL, Kashlev M (2015). Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases in vivo. *Genome Biol.*, **16**: 98.

Ishihama A, Fujita N, Glass RE (1987). Subunit assembly and metabolic stability of E. coli RNA polymerase. *Proteins*. **2(1)**, s. 42–53.

Izban MG, Luse DS (1992). The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII. *Genes Dev.* **6(7)**, s. 1342–1356.

Jin J, Bai L, Johnson DS, Fulbright RM, Kireeva ML, Kashlev M, Wang MD (2010). Synergistic action of RNA polymerases in overcoming the nucleosomal barrier. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17(6)**, s. 745–752.

Jun SH, Reichlen MJ, Tajiri M, Murakami KS (2011). Archaeal RNA polymerase and transcription regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **46(1)**, s. 27–40.

Kang JY, Mishanina TV, Bellecourt MJ, Mooney RA, Darst SA, Landick R (2018). RNA Polymerase Accommodates a Pause RNA Hairpin by Global Conformational Rearrangements that Prolong Pausing. *Mol. Cell*, **69(5)**, s. 802–815.

Kaplan CD, Larsson KM, Kornberg RD (2008). The RNA polymerase II trigger loop functions in substrate selection and is directly targeted by alpha-amanitin. *Mol. Cell*, **30(5)**, s. 547–556.

Kellinger MW, Ulrich S, Chong J, Kool ET, Wang D (2012). Dissecting chemical interactions governing RNA polymerase II transcriptional fidelity. *J. Am. Chem. Soc.*, **134(19)**, s. 8231–8240.

Kettenberger H, Armache KJ, Cramer P (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS. *Mol. Cell*, **16(6)**, s. 955–965.

Kireeva ML, Nedialkov YA, Cremona GH, Purtov YA, Lubkowska L, Malagon F, Burton ZF, Strathern JN, Kashlev M (2008). Transient reversal of RNA polymerase II active site closing controls fidelity of transcription elongation. *Mol. Cell*, **30(5)**, s. 557–566.

Kireeva ML, Kashlev M (2009). Mechanism of sequence-specific pausing of bacterial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106(22)**, s. 8900–8905.

Kontur WS, Saecker RM, Capp MW, Record MT Jr. (2008). Late steps in the formation of *E. coli* RNA polymerase-lambda P R promoter open complexes: characterization of conformational changes by rapid [perturbant] upshift experiments. *J. Mol. Biol.*, **376(4)**, s. 1034–1047.

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**, s. 1755–1760.

Komissarova N, Kireeva MI, Becker J, Sidorenkov I, Kashlev M (2003). Engineering of elongation complexes of bacterial and yeast RNA polymerases. *Methods Enzymol.*, **371**, s. 233–251.

Koslover DJ, Fazal FM, Mooney RA, Landick R, Block SM (2012). Binding and translocation of termination factor rho studied at the single-molecule level. *J. Mol. Biol.*, **423(5)**, s. 664–676.

Kotlajich MV, Hron DR, Boudreau BA, Sun Z, Lyubchenko YL, Landick R (2015). Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria. *Elife*, **4**:e04970.

Kwak H, Lis JT (2013). Control of Transcriptional Elongation. *Annu Rev Genet.*, **47**, s. 483–508.

Landick R (2001). RNA polymerase clamps down. *Cell*, **105(5)**, s. 567–570.

Landick R (2006). The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, s. 1062–1066.

Lane WJ, Darst SA (2010a). Molecular Evolution Of Multisubunit RNA Polymerases: Sequence Analysis. *J. Mol. Biol.*, **395**, s. 671–685.

Lane WJ, Darst SA (2010b). Molecular Evolution Of Multisubunit RNA Polymerases: Structural Analysis. *J. Mol. Biol.*, **395**, s. 686–704.

Larson MH, Mooney RA, Peters JM, Windgassen T, Nayak D, Gross CA, Block SM, Greenleaf WJ, Landick R, Weissman JS (2014). A pause sequence enriched at translation start sites drives transcription dynamics in vivo. *Science*, **344(6187)**, s. 1042–1047.

Lee C, Li X, Hechmer A, Eisen M, Biggin MD, Venters BJ, Jiang C, Li J, Pugh BF, Gilmour DS (2008). NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol.*, **28(10)**, s. 3290–3300.

Liu B, Steitz TA (2017). Structural insights into NusG regulating transcription elongation. *Nucleic Acids Res.*, **45(2)**, s. 968–974.

Maffioli SI, Zhang Y, Degen D, Carzaniga T, Gatto GD, Serina S, Monciardini P, Mazzetti C, Gugliera P, Candiani G, Chiriack AI, Facchetti G, Kaltofen P, Sahl HG, Deho G, Donadio S, Ebricht RH (2017). Antibacterial Nucleoside-Analog Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, **169(7)**, s. 1240–1248.

Malinen A, Turtola M, Parthiban M, Vainonen L, Johnson MS, Belogurov GA (2012). Active site opening and closure control translocation of multisubunit RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **40(15)**, s. 7442–7451.

Malinen A, Nandymazumdar M, Turtola M, Malmi H, Grocholski T, Artsimovitch I, Belogurov G (2014). CBR antimicrobials alter coupling between the bridge helix and the β subunit in RNA polymerase. *Nat. Commun.* **5**: 3408.

Malinen A, Turtola M, Belogurov GA (2015). Monitoring translocation of multisubunit RNA polymerase along the DNA with fluorescent base analogues. *Methods in Molecular Biology*. **1276**, s. 31–51.

Marr MT, Roberts JW (2000). Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site. *Mol. Cell*, **6(6)**, s. 1275–1285.

Mejia YX, Nudler E, Bustamante C (2015). Trigger loop folding determines transcription rate of Escherichia coli's RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112(3)**, s. 743–748.

Min IM, Waterfall JJ, Core LJ, Munroe RJ, Schimenti J, Lis JT (2011). Regulating RNA polymerase pausing and transcription elongation in embryonic stem cells. *Genes Dev.* **25(7)**, s. 742–754.

Mishanina TV, Palo MZ, Nayak D, Mooney RA, Landick R (2017). Trigger loop of RNA polymerase is a positional, not acid-base, catalyst for both transcription and proofreading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114(26)**, s. E5103–E5112.

Mitchell RE, Durbin RD (1981). Tagetitoxin, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*: purification and partial characterization. *Physiological Plant Pathology*. **18(2)**, s. 157–68.

Mooney RA, Davis SE, Peters JM, Rowland JL, Ansari AZ, Landick R (2009). Regulator trafficking on bacterial transcription units in vivo. *Mol. Cell*, **33(1)**, s. 97–108.

Nedialkov YA, Nudler E, Burton ZF (2012). RNA polymerase stalls in a post-translocated register and can hyper-translocate. *Transcription*, **3(5)**, s. 260–269.

Neuman KC, Abbondanzieri EA, Landick R, Gelles J, Block SM (2003). Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell*, **115(4)**, s. 437–447.

Ni Z, Saunders A, Fuda NJ, Yao J, Suarez JR, Webb WW, Lis JT (2008). P-TEFb is critical for the maturation of RNA polymerase II into productive elongation in vivo. *Mol. Cell Biol.*, **28(3)**, s. 1161–1170.

Nudler E (2012). RNA polymerase backtracking in gene regulation and genome instability. *Cell*. **149(7)**, s. 1438-45.

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(1)**, s. 33–41.

Orlova M, Newlands J, Dast A, Goldfarb A, Borukhov S (1995). Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92(10)**, s. 4596–4600.

Paget MSB, Helmann JD (2003). The σ^{70} family of sigma factors. *Genome Biol.*, **4(1)**:203.

Palangat M, Landick R (2001). Roles of RNA:DNA hybrid stability, RNA structure, and active site conformation in pausing by human RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.*, **311(2)**, s. 265–282.

Park JS, Roberts JW (2006). Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103(13)**, s. 4870–4875.

Perdue SA, Roberts JW (2011). σ^{70} -dependent transcription pausing in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **412(5)**, s. 782–792.

Pomerantz RT, O'Donnell M (2008). The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase. *Nature*, **456(7223)**, s. 762–766.

Pomerantz RT, O'Donnell M (2010). Direct restart of a replication fork stalled by a head-on RNA polymerase. *Science*, **327(5965)**, s. 590–592.

Proshkin S, Rahmouni R, Mironov A, Nudler E (2010). Cooperation between Translating Ribosomes and RNA Polymerase in Transcription Elongation. *Science*, **328(5977)**, s. 504–508.

Rasmussen EB, Lis JT (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90(17)**, s. 7923–7927.

Reppas NB, Wade JT, Church GM, Struhl K (2006). The transition between transcriptional initiation and elongation in *E. coli* is highly variable and often rate limiting. *Mol. Cell*, **24(5)**, s. 747–757.

Revyakin A, Liu C, Ebricht RH, Strick TR (2006). Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science*, **314(5802)**, s. 1139–1143.

Ring BZ, Yarnell WS, Roberts JW (1996). Function of *E. coli* RNA Polymerase σ Factor $\sigma 70$ in Promoter-Proximal Pausing. *Cell*, **86(3)**, s. 485–493.

Saecker RM, Tsodikov OV, McQuade KL, Schlax PE Jr, Capp MW, Record MT Jr (2002). Kinetic studies and structural models of the association of *E. coli* sigma(70) RNA polymerase with the lambdaP(R) promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates. *J Mol Biol.*, **319(3)**, s. 649–671.

Schwinghammer K, Cheung AC, Morozov YI, Agaronyan K, Temiakov D, Cramer P (2013). Structure of human mitochondrial RNA polymerase elongation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20(11)**, s. 1298–1303.

Sekine S, Murayama Y, Svetlov V, Nudler E, Yokoyama S (2015). The Ratcheted and Ratchetable Structural States of RNA Polymerase Underlie Multiple Transcriptional Functions. *Mol. Cell*, **57(3)**, s. 408–421.

Shaevitz JW, Abbondanzieri EA, Landick R, Block SM (2003). Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*, **426(6967)**, s. 684–687.

Sosunov V, Sosunova S, Mustaev A, Bass I, Nikiforov V, Goldfarb A (2003). Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *The EMBO Journal*, **22(9)**, s. 2234–2244.

Sosunova E, Sosunov V, Kozlov M, Nikiforov V, Goldfarb A, Mustaev A (2003). Donation of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor Gre. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100(26)**, s. 15469–15474.

Steitz TA (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature*, **391(6664)**, s. 231–232.

Stepanova E, Wang M, Severinov K, Borukhov S (2009). Early transcriptional arrest at Escherichia coli rplN and ompX promoters. *J. Biol. Chem.*, **284(51)**, s. 35702–35713.

Svetlov V, Vassylyev DG, Artsimovitch I (2004). Discrimination against deoxyribonucleotide substrates by bacterial RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **279(37)**, s. 38087–38090.

Sydow JF, Brueckner F, Cheung AC, Damsma GE, Dengl S, Lehmann E, Vassylyev D, Cramer P (2009). Structural basis of transcription: mismatch-specific fidelity mechanisms and paused RNA polymerase II with frayed RNA. *Mol. Cell*, **34(6)**, s. 710–721.

Tagami S, Sekine S, Kumarevel T, Hino N, Murayama Y, Kamegamori S, Yamamoto M, Sakamoto K, Yokoyama S (2010). Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein. *Nature*, **468(7326)**, s. 978–982.

Tan L, Wiesler S, Trzaska D, Carney HC, Weinzierl RO (2008). Bridge helix and trigger loop perturbations generate superactive RNA polymerases. *J. Biol.* **7(10)**: 40.

Tchernachenko V, Halvorson HR, Kashlev M, Lutter LC (2008). DNA bubble formation in transcription initiation. *Biochemistry*, **47(7)**, s. 1871–1884.

Thomsen ND, Berger JM. Running in reverse: the structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. *Cell*, **139(3)**, s. 523–534.

Tornaletti S, Hanawalt PC (1999). Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie*, **81(1-2)**, s. 139–146.

Toulokhonov I, Zhang J, Palangat M, Landick R (2007). A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing. *Mol. Cell*, **27(3)**, s. 406–419.

Turtola M, Belogurov G (2016). NusG inhibits RNA polymerase backtracking by stabilizing the minimal transcription bubble. *Elife*, **5**, e18096.

Turtola M, Mäkinen JJ, Belogurov G (2018). Active site closure stabilizes the backtracked state of RNA polymerase. (julkaisematon artikkeli)

Vassilyev DG, Vassilyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I (2007a). Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, **448(7150)**, s. 157–162.

Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Zhang J, Palangat M, Artsimovitch I, Landick R (2007b). Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. *Nature*, **448(7150)**, s. 163–168.

von Hippel PH, Yager TD (1992). The elongation-termination decision in transcription. *Science*, **255(5046)**, s. 809–812.

Vrentas CE, Gaal T, Ross W, Ebricht RH, Gourse RL (2005). Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the ω subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev.*, **19(19)**, s. 2378–2387.

Wang HY, Elston T, Mogilner A, Oster G (1998). Force generation in RNA polymerase. *Biophys. J.*, **74(3)**, s. 1186–1202.

Wang D, Bushnell DA, Westover KD, Kaplan CD, Kornberg RD (2006). Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, **127(5)**, s. 941–954.

Weixlbaumer A, Leon K, Landick R, Darst SA (2013). Structural basis of transcriptional pausing in bacteria. *Cell*, **152(3)**, s. 431–441.

Werner F, Grohmann D (2011). Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9(2)**, s. 85–98.

Westover KD, Bushnell DA, Kornberg RD (2004). Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*, **119(4)**, s. 481–489.

Wilson KS, Conant CR, von Hippel PH (1999). Determinants of the stability of transcription elongation complexes: interactions of the nascent RNA with the DNA template and the RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **289(5)**, s. 1179–1194.

Windgassen TA, Mooney RA, Nayak D, Palangat M, Zhang J, Landick R (2014). Trigger-helix folding pathway and SI3 mediate catalysis and hairpin-stabilized pausing by Escherichia coli RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **42(20)**, s. 12707–12721.

Wu CH, Yamaguchi Y, Benjamin LR, Horvat-Gordon M, Washinsky J, Enerly E, Larsson J, Lambertsson A, Handa H, Gilmour D (2003). NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in Drosophila. *Genes Dev.* **17(11)**, s. 1402–1414.

Yuzenkova Y, Zenkin N (2010). Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107(24)**, s. 10878–10883.

Yuzenkova Y, Gamba P, Herber M, Attaiech L, Shafeeq S, Kuipers OP, Klumpp S, Zenkin N, Veening JW. (2014). Control of transcription elongation by GreA determines rate of gene expression in Streptococcus pneumoniae. *Nucleic Acids Res.*, **42(17)**, s. 10987–10999.

Zakharova N, Bass I, Arsenieva E, Nikiforov V, Severinov K (1998). Mutations in and monoclonal antibody binding to evolutionary hypervariable region of Escherichia coli RNA polymerase beta' subunit inhibit transcript cleavage and transcript elongation. *J. Biol. Chem.*, **273(38)**, s. 24912-24920.

Zaychikov E, Martin E, Denissova L, Kozlov M, Markovtsov V, Kashlev M, Heumann H, Nikiforov V, Goldfarb A, Mustaev A (1996). Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science*, **273(5271)**, s. 107–109.

Zenkin N, Yuzenkova Y, Severinov K (2006). Transcript-assisted transcriptional proofreading. *Science*, **313(5786)**, s. 518–520.

Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K, Darst SA (1999). Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, **98(6)**, s. 811–824.

Zuo Y, Steitz TA (2015). Crystal structures of the E. coli transcription initiation complexes with a complete bubble. *Mol. Cell*, **58(3)**, s. 534–540.