

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

ŽIVILĖ STRAZDAITĖ - ŽIELIENĖ

**ENDORIBONUKLEAZIŲ POVEIKIO  
ANKSTYVIESIEMS BAKTERIOFAGO T4  
TRANSKRIPTAMS TYRIMAS**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2013 metai

Disertacija rengta 2007 – 2013 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute

Moksliniai vadovai:

habil. dr. Rimantas Nivinskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P, vadovavo nuo 2007-10-01 iki 2010-04-21).

dr. Lidija Truncaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P, vadovavo nuo 2010-04-22 iki 2013-11-30).

## Turinys

Santrumpų sąrašas .....	6
Įvadas .....	7
1. Literatūros apžvalga.....	11
1.1. Bakteriofago T4 genomo struktūra ir savybės .....	11
1.2. Bakteriofago T4 genų raiškos reguliacija .....	13
1.2.1. Genų raiškos reguliacija transkripcijos lygyje.....	13
1.2.1.1. Transkripcijos reguliacija priešreplikaciniame periode .....	14
1.2.1.2. Transkripcijos reguliacija poreplikaciniame periode .....	17
1.2.2. Fago T4 genų raiškos reguliacija potranskripciniame lygyje ...	19
1.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> mRNR degradacija .....	19
1.2.2.2. Bakteriofago T4 endoribonukleazė RegB.....	21
1.2.2.3. <i>E. coli</i> endoribonukleazės fago T4 RNR metabolizme .....	27
1.2.2.3.1. Endoribonukleazė E.....	27
1.2.2.3.2. Endoribonukleazė G .....	30
1.2.2.3.3. Endoribonukleazė III.....	31
1.2.2.3.4. Endoribonukleazė LS .....	33
1.2.2.4. <i>E. coli</i> egzoribonukleazės .....	34
1.2.3. Fago T4 genų raiškos reguliacija translacijos lygyje .....	36
1.3. Bakteriofago T4 koduojama polinukleotidkinazė.....	39
1.4. Baltymų modifikavimas bakteriofago T4 infekcijos metu .....	43
2. Medžiagos ir metodai.....	47
2.1. Medžiagos.....	47
2.1.1. Bakteriofagai, <i>E. coli</i> kamienai, plazmidinės DNR .....	47
2.1.2. Terpės ir buferiniai tirpalai .....	51
2.1.3. Reagentai .....	52
2.2. Metodai.....	54
2.2.1. Bakteriofagų padauginimas .....	54
2.2.2. Fagų titro nustatymas .....	54
2.2.3. DNR amplifikavimas <i>in vitro</i> PGR metodu.....	55
2.2.4. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje .....	55

2.2.5. Bendrosios ląstelės RNR išskyrimas .....	56
2.2.6. DNR pradmens žymėjimas .....	56
2.2.7. DNR elektroforezė denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje .....	57
2.2.8. mRNR nukleotidų sekos nustatymas .....	57
2.2.9. mRNR 5' galinio nukleotido nustatymas .....	58
2.2.10. Plazmidinės DNR išskyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių .....	58
2.2.11. DNR fragmentų hidrolizė restrikcijos endoribonukleazėmis ir DNR galų bukinimas .....	59
2.2.12. DNR fragmentų ligavimas .....	59
2.2.13. <i>E. coli</i> ląstelių transformacija .....	60
2.2.14. Rekombinantinių baltymų indukcija .....	60
2.2.15. Rekombinantinių baltymų modifikavimo tyrimas .....	60
2.2.16. Fago T4 <i>pseT</i> mutantų konstravimas .....	61
2.2.17. kPGR .....	62
2.2.18. Plazmidinių vektorių p184-21-1 ir p184-16b konstravimas ....	63
2.2.19. Genų koekspresija dviplazmidinėse sistemose .....	65
2.2.20. Rekombinantinių T4 ir T4K10 PNK baltymų indukcija ir gryninimas .....	66
2.2.21. Rekombinantinių T4 ir T4K10 PNK <i>in vitro</i> aktyvumo tyrimas .....	66
<b>3. Rezultatai ir jų aptarimas .....</b>	<b>68</b>
3.1. Naujų RegB kirpimo taikinių paieška fago T4 transkriptuose .....	68
3.2. Bakteriofago T4 potencialaus ankstyvojo promotoriaus aktyvumo patikrinimas .....	70
3.3. RNazės RegB kirptus transkriptus hidrolizuojančių endoribonukleazių nustatymas .....	72
3.3.1. Naujų antrinių kirpimo taikinių nustatymas .....	72
3.3.2. <i>E. coli</i> endoribonukleazių E ir G poveikio RegB kirptiems transkriptams tyrimas .....	75
3.4. Plazmidėje koduojamų fago T4 transkriptų jautrumo <i>E. coli</i>	



endoribonukleazėms tyrimas .....	80
3.4.1. Plazmidėse koduojamų genų <i>nrdC.3</i> , <i>motB</i> ir <i>55.2</i> transkriptų jautrumo <i>E. coli</i> endoribonukleazėms tyrimas plazmidžių-fagu sistemose .....	80
3.5. Bakteriofago T4 koduojamų veiksmių, turinčių įtakos <i>E. coli</i> ribonukleazių E ir G aktyvumui, nustatymas .....	83
3.5.1. RNazės G modifikavimo galimybės tyrimas plazmidžių-fagu sistemose .....	83
3.5.2. RnaG modifikavimo tyrimai dviplazmidinėse sistemose.....	87
3.5.2.1. Fago T4 riboziltransferazės geno <i>modA</i> koekspresija su <i>rnag</i> ir <i>ef-tu</i> .....	87
3.5.2.2. Fago T4 riboziltransferazių genų <i>alt</i> ir <i>modB</i> koekspresija su <i>rnag</i> bei <i>ef-tu</i> .....	89
3.5.3. Bakteriofago T4 delecinių mutantų transkriptų tyrimas .....	92
3.5.4. Fago T4 PNK įtakos RegB kirptų transkriptų degradacijai tyrimas .....	96
3.5.4.1. Tyrimas dviplazmidinėse sistemose.....	96
3.5.4.2. Fago T4K10 <i>pseT</i> geno mutacijų atstatymas genome .....	98
3.5.4.3. Viengubų T4K10 <i>pseT</i> geno mutantų <i>nrdC.3</i> transkriptų analizė .....	100
3.5.4.4. Rekombinantinių T4 PNK ir T4K10 PNK <i>in vitro</i> aktyvumo tyrimai.....	101
3.5.4.5. Fago T4 <i>pseT</i> delecinių mutantų konstravimas ir PNK įtakos RegB kirptiems transkriptams tyrimas.....	104
3.5.4.6. PNK įtakos ankstyvųjų fago T4 transkriptų degradavimui tyrimas .....	106
Rezultatų apibendrinimas .....	114
Išvados.....	120
Publikacijos disertacijos tema .....	121
Padėka.....	122
Literatūros sąrašas .....	123

## Santrumpų sąrašas

ar. – aminorūgštis  
AMV AT – paukščių mieloblastozės viruso atvirkštinė transkriptazė  
ASR – atviro skaitymo rėmelis  
bp – bazių pora  
CTD – C-galinis domenas  
DNazė – deoksiribonukleazė  
dgDNR – dvigrandinė deoksiribonukleorūgštis  
dgRNR – dvigrandinė ribonukleorūgštis  
gp – geno produktas  
hm<sup>5</sup>C – hidroksimetilcitozinas  
IPTG – izopropil-1-tio-β-D-galaktopiranozidas  
nt – nukleotidas  
NTD – N-galinis domenas  
P<sub>E</sub> – ankstyvasis promotorius  
P<sub>M</sub> – vidurinysis promotorius  
P<sub>L</sub> – vėlyvasis promotorius  
PGR – polimerazės grandininė reakcija  
PNK – polinukleotidkinazė  
RNazė – ribonukleazė  
SD – Šaino–Dalgarno seka  
vgDNR – viengrandinė deoksiribonukleorūgštis  
vgRNR – viengrandinė ribonukleorūgštis  
kPGR – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija  
ts – temperatūrai jautrus mutantas  
NDS PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė  
RBS – ribosomos prisijungimo vieta  
DEPC – dietilpirokarbonatas

## Įvadas

Virulentiniai bakteriofagai yra virusai greitai besidauginantys bakterinėje ląstelėje ir ją suardantys. Bakteriofagas T4 yra *Escherichia coli* infekuojantis virusas. Kaip ir daugelis virulentinių fagų, T4 geriausiai infekuoja eksponentinės augimo fazės ląsteles, kuriose vyksta aktyvūs metaboliniai procesai. Fagas šiuos procesus sustabdo ir pajungia savo vystymuisi. Tai pasiekama jau pirmomis infekcijos minutėmis, kai fago ankstyvųjų infekcijos stadijų baltymai modifikuoja ląstelės baltymus. Genų raiškos perjungimas vyksta transkripcijos, transliacijos ir mRNR degradacijos lygiuose. Svarbų vaidmenį vaidina ir fago DNR koduojami genų raiškos reguliacijos signalai, kurių struktūra lemia sklandžius genų raiškos pokyčius fago infekcijos eigoje.

Svarbiausias procesas, užtikrinantis nuoseklią fago genų raišką yra transkripcijos reguliacija laike, kuomet laipsniškai modifikuojama ląstelės šeimininkės RNR polimerazė nukreipiamą nuosekliai fago ankstyvųjų, viduriniųjų ir vėlyvųjų promotorių atpažinimui ir atitinkamų genų transkripcijai (Miller ir kt., 2003). Fago T4 genų raiška iš ankstyvosios į vėlyvąją pasikeičia greičiau nei per 30 min (O'Farrell ir Gold 1973; Christensen ir Young 1983; Kai ir kt., 1996). Toks greitas genų raiškos pokytis negali būti užtikrinamas vien tik fagui nuosekliai aktyvuojant skirtingas promotorių grupes, tam reikalinga efektyvi ir greita jau nereikalingų mRNR degradacija atlaisvinant nukleotidus ir transliacijos aparatą naujų genų raiškai. Šie tarpusavyje priklausomi procesai yra reguliuojami tiek mRNR struktūros, tiek ir baltymų modifikacijų lygyje.

Nustatyta, kad fagas T4 modifikuoja ir *E. coli* transliacijos baltymus, taip nukreipdamas juos fago baltymų sintezę reguliuojančių sekų atpažinimui. Tuo tarpu T4 mRNR brendimas ir degradacija yra ko gero mažiausiai ištirti procesai. Žinoma, kad *E. coli* RNazė E dalyvauja fago mRNR degradacijos procese viso infekcinio ciklo metu (Mudd ir kt., 1990), o fago koduojama RNazė RegB yra atsakinga už daugelio ankstyvųjų transkriptų degradaciją.

RegB nukleazės taikiniai, kurių būtinas motyvas yra GGAG, yra nustatyti išimtinai ankstyvuosiuose transkriptuose, efektyviausi – Šaino-Dalgarno (SD) sekose (Durand ir kt., 2006). Kirpdama šias sekas, RegB išjungia jų transliaciją ir pagreitina degradaciją, taip užtikrindama sklandų genų raiškos perjungimą iš ankstyvosios į viduriniąją fazę (Sanson ir kt., 2000).

RegB taikinius turi dauguma ankstyvųjų transkriptų, tačiau neaišku, kaip RegB hidrolizuoti transkriptai degraduojami toliau ir kaip šiame procese galėtų dalyvauti RNazė E ar kitos *E. coli* RNazės, kurioms fago transkriptuose nustatyti tik pavieniai taikiniai. Be to, nėra jokių konkrečių duomenų apie pačių ląstelės ribonukleazių modifikavimą. Nustatyta, kad T4 infekcijos metu kintant RNazės E ir G specifiškumui, kai kurių fago transkriptų atsparumas šiems fermentams padidėja, o bakterinių sumažėja (Ueno ir Yonesaki, 2004). Deja, kokie fago veiksniai galėtų modifikuoti ribonukleazes bei stabilizuoti ar destabilizuoti mRNR yra žinoma nedaug. Nustatyta, kad fago T4 infekcinio ciklo metu genas *dmd* yra reikalingas vidurinių ir vėlyvųjų mRNR stabilumui (Ueno ir Yonesaki, 2001). Baltymas Dmd yra RNazės LS inhibitorius, tačiau RNazės E aktyvumo neveikia ir su ja tiesiogiai nesąveikauja (Kanesaki ir kt., 2005; Otsuka ir Yonesaki, 2005; Otsuka ir kt., 2007). Naujais duomenimis rodo, kad Dmd gali slopinti ir kitas ribonukleazes (Otsuka ir Yonesaki, 2012), todėl gali būti, kad bakteriofagas T4 turi išvystę sudėtingą RNazių reguliavimo mechanizmą, kuris nėra ištirtas. Ypač mažai žinoma apie ankstyvojo periodo transkriptų degradaciją. Išskyrus endoribonukleazės RegB poveikį, jokių kitų *E. coli* ar fago koduojamų baltymų poveikis netirtas.

Šiame darbe buvo siekiama nustatyti kokios *E. coli* endoribonukleazės turi įtakos RegB hidrolizuotų ankstyvųjų fago T4 transkriptų brendimui ir degradacijai, patikrinti ar bakterijos endoribonukleazės yra modifikuojamos faginės infekcijos metu ir ištirti kokie fago T4 koduojami veiksniai gali turėti įtakos endoribonukleazių aktyvumui.

**Darbo tikslas:** Ištirti *Echerichia coli* endoribonukleazių poveikį ankstyviesiems fago T4 transkriptams ir šių fermentų veikimo priklausomybę

nuo fago koduojamų veiksnių.

Šiam tikslui pasiekti buvo išskelti šie uždaviniai:

1. Nustatyti naujus endoribonukleazės RegB taikinius fago T4 transkriptuose.
2. Ištirti geno *segD* transkripciją.
3. Nustatyti endoribonukleazės, atsakingas už RNazės RegB skeltų transkriptų antrinį skaldymą.
4. Patikrinti endoribonukleazių modifikavimo galimybę ir modifikacijų įtaką ankstyvųjų transkriptų tolimesniam skaldymui.
5. Nustatyti, kokie fago T4 koduojami veiksniai daro įtaką *E. coli* endoribonukleazių aktyvumui.
6. Ištirti RegB kirptų transkriptų degradaciją.

### **Mokslinis naujumas**

Šio darbo metu mRNR sekoskaitos metodu nustatyti 7 nauji endoribonukleazės RegB taikiniai, esantys bakteriofago T4 ankstyvųjų transkriptų *ndd.4*, *mobD*, *sp*, *segD*, *pin* ir *dmd* SD sekose bei prieš geną *arn*. Analizuojant transkriptus P<sup>32</sup> žymėto pradmens ilginimo metodu prieš geną *segD*, aptiktas naujas ankstyvasis promotorius P<sub>EsegD</sub>, besiskiriantis nuo tipinės –35 sekos konservatyvioje pirmoje pozicijoje. Patvirtintas šio promotoriaus aktyvumas faginės infekcijos metu. Nustatyta, kad T4 *nrnC.3*, *ndd* ir *55.2* transkriptai 5-8 nt atstumu už RegB taikinių turi AU turtingas sritis su antriniais endoribonukleazių taikiniais. Panaudojus *E. coli* endoribonukleazių mutantinius kamienus, įrodyta, kad RNazės RegB kirptų ankstyvųjų fago transkriptų antrinę hidrolizę vykdo *E. coli* koduojamos endoribonukleazės E ir G. Pastaroji yra pagrindinė RegB kirptus transkriptus skelianti RNazė, o aptikti taikiniai yra pirmieji fago T4 transkriptuose nustatyti RNazės G taikiniai.

Tiriant RNazės G modifikavimo galimybę nustatyta, kad ji faginės infekcijos metu gali būti modifikuojama, tačiau tai neturi įtakos jos aktyvumui

RegB kirptų transkriptų atžvilgiu. Darbo eigoje buvo sukurtas naujas metodas leidžiantis greitai ir nebrangiai atlikti pradinius baltymų modifikavimo tyrimus bakterijos-fago sistemose.

Tyrimų metu buvo nustatyta, kad įterpimo/pakeitimo (I/S) sistemos bakteriofagas T4K10, naudojamas T4 mutantų konstravimui, *pseT* gene turi dvi mutacijas, lemiančias G14D ir R229H pakaitas koduojamoje polinukleotidkinazėje. Nustatyta, kad G14D pakaita sutrikdo fermento 5'-kinazinį aktyvumą, ir tai lemia RegB kirptų transkriptų antrinių taikinių jautrumo sumažėjimą RNazei G. PNK stoka fago vystymosi metu gali turėti keletą pasekmių, iš kurių pagrindinės susijusios su genų raiška, todėl gautasis rezultatas yra svarbus ir kitiems tyrėjams. Sukonstravus T4ΔPNK ir T4K10ΔPNK delecinius mutantus, buvo patvirtinta antrinius taikinius turinčių transkriptų degradacijos priklausomybė nuo fago koduojamos PNK. Pirmą kartą buvo pritaikyta moderni molekulinė technologija – kPGR fago T4 transkriptų degradacijos tyrimams. Nustatyta, kad fago T4 PNK 5'-kinazinis aktyvumas pagreitina RegB kirptų transkriptų degradaciją, tačiau ji gali vykti ir nuo PNK nepriklausomu keliu.

#### Ginamieji teiginiai:

1. Ankstyvasis promotorius P<sub>EsegD</sub>, nepaisant pakitimų –35 srityje, yra aktyvus faginės infekcijos metu.
2. Ribonukleazės RegB kirptų transkriptų antrinę hidrolizę vykdo *E. coli* koduojamos endoribonukleazės E ir G.
3. RNazė G yra pagrindinė endoribonukleazė atsakinga už visų iki šiol nustatytų antrinius skėlimo taikinius turinčių RegB kirptų transkriptų hidrolizavimą.
4. Bakteriofago T4K10 koduojamoje polinukleotidkinazėje esanti G14D pakaita sutrikdo fermento 5'-kinazinį aktyvumą.
5. Fago T4 koduojamos polinukleotidkinazės 5'-kinazinis aktyvumas lemia RegB kirptų transkriptų antrinių taikinių jautrumą RNazei G ir skatina jų degradaciją.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Bakteriofago T4 genomo struktūra ir savybės

Bakteriofagas T4, priklausantis *Myoviridae* šeimai, yra virulentinis fagas, infekuojantis enterobakteriją *Escherichia coli*. Bakteriofagas T4 buvo ir yra viena svarbiausių modelinių sistemų genetikos, molekulinės biologijos ir biochemijos vystymuisi nuo 1940-ųjų metų iki dabar. Tai yra vienas iš geriausiai ištirtų bakterinių virusų, kurio genomo seka buvo nustatyta viena pirmųjų. Bakteriofago T4 dvigrandinėje DNR molekulėje, kurios dydis 168,903 bp, yra apie 290 genų, koduojančių baltymus. Apie 180 šių baltymų funkcijos yra žinomos (Petrov ir kt., 2006). Taip pat bakteriofago T4 genome yra 8 tRNR genai ir 2 genai, koduojantys mažas stabilias RNR, kurių funkcijos nėra žinomos. Bakteriofago T4 DNR sudaro ~50 % bakteriofago masės (Wagner, 2002).

Fago T4 genome tik 62 genai yra būtinieji standartinėmis laboratorinėmis sąlygomis (Mesyanzhinov ir kt., 2004). Tai yra genai, koduojantys replisomos baltymus, keletą transkripcijos reguliacijos veiksnių ir daugumą fago struktūrinių baltymų bei virionų susirinkimo veiksnių (Miller ir kt., 2003). Fago T4 genome yra apie 40 % nežinomų funkcijų atvirų skaitymo rėmelių (ASR), kurie yra nebūtinai fagų vystymuisi laboratorinėmis sąlygomis, todėl manoma, jog šie genai yra svarbūs prisitaikymui prie natūralių gyvavimo sąlygų (Nolan ir kt., 2006). Tai daugiausiai maži genai, kurie nėra charakterizuoti ir nėra homologiški kitų organizmų genams (Kawabata ir kt., 2000).

Pagal pasireiškimo laiką fago vystymosi ciklo metu, bakteriofago T4 genus galima suskirstyti į ankstyvuosius, vidurinius ir vėlyvuosius. Ankstyvieji ir viduriniai genai, kurių produktai dalyvauja ląstelės-šeimininkės metabolizmo ir raiškos sistemos pertvarkyme, fago DNR replikacijoje ir rekombinacijoje pasireiškia priešreplikaciniame periode. Šių genų produktai yra: ląstelės-šeimininkės DNR ardančios nukleazės (pvz., genai 46, 47, *denA*, *denB*, *dexA*), deoksiribonukleozidų biosintezės komplekso fermentai (pvz.,

genai *nrdA*, *nrdB*, *nrdC*, *cd*), replikacijoje ir rekombinacijoje dalyvaujantys baltymai (pvz., genai *30*, *uvsY*, *segA-E*), ląstelės-šeimininkės membraną modifikuojantys baltymai (pvz., genai *39*, *52*, *ac*, *imm*, *rIIA*, *rIIB*), fago T4 DNR modifikuojantys ir nuo ląstelės-šeimininkės restrikcinių endonukleazių apsaugantys baltymai (pvz., genai *1*, *42*, *agt*), keletas tRNR, pritaikytų fago T4 transkriptų translacijai (tRNR genai *arg*, *ile*, *thr*, *ser*, *pro*, *gly*, *leu*, *gln*), *E. coli* RNR polimerazės struktūrą ir funkciją modifikuojantys baltymai (pvz. genai *33*, *44*, *45*, *55*, *62*, *modA*, *alc*, *asiA*), *E. coli lon* proteazės inhibitorius (genas *pinA*), fago T4 endoribonukleazė, turinti įtakos ankstyvųjų transkriptų stabilumui (genas *regB*).

Kiti fago T4 genai pasireiškia išskirtinai arba dominuojančiai poreplikaciniame periode. Šie genai koduoja fago viriono struktūrinius baltymus (>50 genų), fermentus, karpančius ir pakuojančius fago DNR į kapsidę (genai *16*, *17*), ir ląstelės-šeimininkės lizėje dalyvaujančius baltymus (genai *e* ir *t*).

Daugelis funkcinio požiūriu susijusių fago genų yra susitelkę į sandaugas ir išsidėstę viena kryptimi bei turi bendras reguliacines sekas. Didžiausias funkcinį genų sandaugas sudaro genai, koduojantys baltymus, dalyvaujančius fago morfogenezėje ir DNR replikacijoje (Miller ir kt., 2003). Fago T4 genų raiška yra kontroliuojama ankstyvųjų ( $P_E$ ), viduriniųjų ( $P_M$ ) arba vėlyvųjų ( $P_L$ ) promotorių (Luke ir kiti, 2002). Visi ankstyvieji genai yra nurašomi nuo l-DNR grandinės prieš laikrodžio rodyklę, o vėlyvieji genai - ir nuo l-DNR, ir nuo r-DNR grandinių abiem kryptimis. Nežinomos funkcijos genai dažniausiai yra nurašomi prieš laikrodžio rodyklę nuo stiprių ankstyvųjų promotorių. Tik 16 nežinomos funkcijos genų pasireiškia vėlyvojoje bakteriofago T4 infekcijos stadijoje (Miller ir kt., 2003).

Kai kurie bakteriofago T4 genai koduoja daugiau nei vieną baltymą (pvz., *16*, *17* ir *49* genai) (Miller ir kt., 2003). Taip pat yra persidengiančių genų, kurie koduoja baltymus skirtingais skaitymo rėmeliais. Jie gali būti skaitomi ta pačia kryptimi, pvz., *30.3'* genas kitu skaitymo rėmeliu visiškai išsidėstęs *30.3* gene (Zajančkauskaitė ir kt., 1994). Taip pat jie gali būti skaitomi priešingomis



kryptimis, taip kaip *repEA* ir *repEB* genai (Vaiškūnaitė ir kt., 1999). Dažnai terminacijos kodonas persidengia su sekančio geno iniciacijos kodonu (Miller, 2003). Bakteriofago T4 genome yra rasti 3 intronai, esantys genuose *td*, *nrdB* ir *nrdD* (Mathews ir kt., 2002).

Nekoduojančių sričių fago genome yra ~5 kb arba 5,3 % viso geno. Dauguma bakteriofago T4 reguliacinių sekų yra tarpgeninėse srityse (Desplats ir kt., 2003). Reguliacinės sritys yra kompaktiškos, kartais persidengiančios su koduojančiomis sritimis (Miller ir kt., 2003). Jose išsidėstę transkripcijos ir translacijos reguliacijos signalai bei endoribonukleazijų taikiniai.

Dar 1952 metais buvo nustatyta, kad fagas T4 DNR sudėtyje vietoj citozino turi modifikuotą pirimidiną – 5-hidroksimetilcitoziną ( $hm^5C$ ), kuris būna gliukozilintas  $\alpha$  arba  $\beta$  padėtyse.  $hm^5C$  vandenilniais ryšiais jungiasi su guaninu taip, kaip guaninas su citoziniu kitų organizmų DNR molekulėse (Mathews ir kt., 2002). Dauguma bakteriofago T4 hidroksilinių  $hm^5C$  grupių yra gliukozilintos  $\alpha$  padėtyje – 70 % gliukozilintų ryšių, o  $\beta$  padėtyje – 30 % (Carlson, 1994). Gliukozilinimas apsaugo fago DNR nuo ląstelės-šeimininkės fermentinės sistemos, atpažįstančios negliukozilintą  $hm^5C$  sritis DNR molekulėje ir inicijuojančios jų suardymą. Hidroksimetilinė modifikacija saugo fago DNR ir nuo jo paties restrikcijos endonukleazijų aktyvumo (Karam ir kt., 1994).

## **1.2. Bakteriofago T4 genų raiškos reguliacija**

### **1.2.1. Genų raiškos reguliacija transkripcijos lygyje**

Genų raiškos kontrolė yra vienas iš pagrindinių būdų, kuriais gyvi organizmai gali reaguoti į savo gyvenamosios aplinkos pokyčius. Efektyvi genų raiška priklauso nuo informacinių molekulių kiekio, kurį, didžiaja dalimi, lemia transkripcijos efektyvumas. Informacinių RNR kiekį lemia ir šių molekulių skirtingas stabilumas. Bakteriofago T4 skirtingos genų grupės įjungiamos ir išjungiamos specifiniais infekcinio ciklo momentais, o genų

raiškos reguliacija laike daugiausia vyksta transkripcijos lygyje. Vystantis fagui nuosekliai aktyvuojamos 3 promotorių grupės: ankstyvieji, vidurinieji ir vėlyvieji (Miller ir kt., 2003).

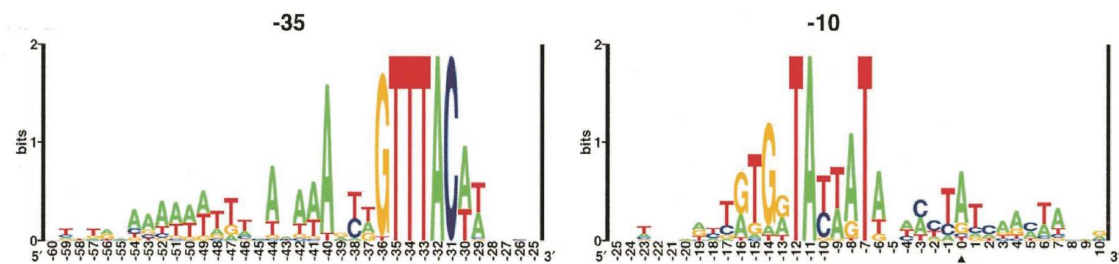
Bakteriofagas T4 nekoduoja savo paties RNR polimerazės, todėl jo genų transkripcija yra visiškai priklausoma nuo ląstelės-šeimininkės RNR polimerazės, kuri infekcinio ciklo metu yra nuolat modifikuojama fago koduojamų baltymų. Tiriant fago T4 genų raišką buvo nustatyta, kad genai, kurių produktai yra reikalingi pajungti ląstelėje vykstančius procesus fago reikmėms (DNR metabolizmo ir modifikacijos baltymai, transkripcijos aktyvatoriai bei transliacijos reguliatoriai ir papildomos tRNR) pasireiškia prieš DNR replikaciją. Tik besireplikuojanti DNR yra tinkama vėlyvųjų genų transkripcijai. Šiame periode sintetinami fago viriono struktūriniai komponentai, DNR pakavimo fermentai bei ląstelės lizės fermentai (Mosig ir Eiserling, 2006).

#### **1.2.1.1. Transkripcijos reguliacija priešreplikaciniame periode**

Ankstyvųjų fago genų transkripcija prasideda iš karto po to, kai fagas T4 infekuoją *E. coli*. Per pirmas kelias minutes nemodifikuota *E. coli* RNR polimerazė nurašo fago ankstyvuosius genus (Mathews ir kt., 2002). Bakteriofagas T4 savų priešreplikacinių genų (ankstyvųjų ir viduriniųjų) transkripcijai naudoja ne tik bakterijos-šeimininkės šerdinę RNR polimerazę, bet ir šeimininkės  $\sigma^{70}$  veiksni, kuris atsakingas už  $-10$  srities atpažinimą. Nors  $\sigma^{70}$  yra modifikuojamas vidurinės infekcijos periode, fago ankstyvieji ir vidurinieji promotoriai turi panašią į *E. coli*  $\sigma^{70}$  promotorių  $-10$  sritį (Wilkens ir Rüger, 1994).

Bakteriofago T4 ankstyvųjų promotorių struktūroje aptikta  $-35$  bp atstumu nuo transkripcijos pradžios esanti labai konservatyvi sritis, sudaryta iš 7 bp GTTTACA, kuri skiriasi nuo *E. coli* konservatyvios  $-35$  srities TTGACA (Wilkens ir Rüger, 1994). Tuo tarpu nukleotidų sekos, esančios fago T4  $P_E-10$  srityje yra labai konservatyvios ir panašios į *E. coli*  $\sigma^{70}$  promotorių sekas

(TATAAT). Fago T4 ankstyvųjų promotorių –10 sritis dažnai būna prailginta tGTGG motyvu (Wilkens ir Rürger, 1996). Be to, stiprūs ankstyvieji fago T4 promotoriai dar turi sekas, primenančias *E. coli* promotorių UP elementus – du A tandemus (iki A<sub>6</sub>) –52 ir –42 padėtyse, atskirtus panašaus ilgio T seka (1 pav.). Šios specifinės fago T4 savybės lemia tai, kad nemodifikuota RNR polimerazė fago P<sub>E</sub> promotorius atpažįsta labai efektyviai (Wilkens ir Rürger, 1996).



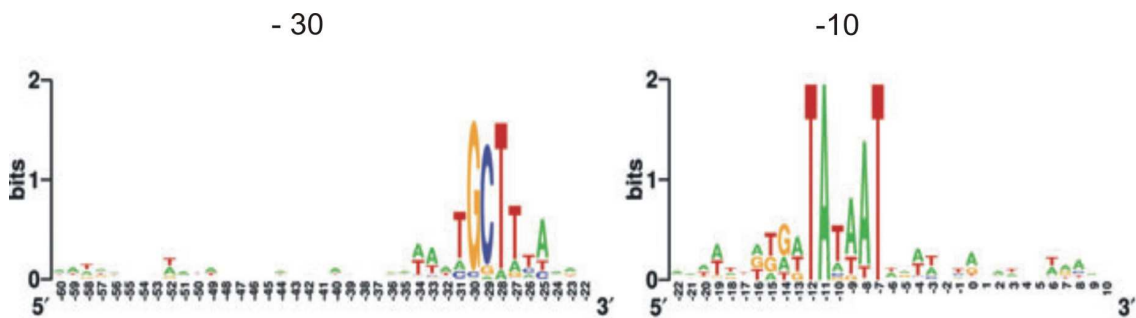
**1 pav. Ankstyvųjų fago T4 promotorių tipinės sekos** (Miller ir kt., 2003). Juodas trikampis žymi +1 transkripcijos pradžios nukleotidą. Ši tipinė seka nustatyta ištyrus 39 ankstyvuosius promotorius. Raidžių dydis atitinka konservatyvumo laipsnį.

Dar efektyvesnė transkripcija nuo P<sub>E</sub> prasideda tada, kai bakteriofago genų produktai modifikuoja RNR polimerazę (Wilkens ir Rürger, 1996; Sommer ir kt., 2000). Svarbiausia modifikacija yra vieno iš dviejų RNR polimerazės  $\alpha$  subvienetų Arg<sup>265</sup> aminorūgšties (ar.) ADP–ribozilinimas. Jį vykdo fago koduojamas baltymas Alt, kuris patenka į ląstelę kartu su fago DNR (Goff, 1979). Pagrindinis Alt taikinytis, aminorūgštis Arg<sup>265</sup>, yra būtina  $\alpha$ -CTD sąveikai su promotoriaus UP elementu ir su keletu kitų *E. coli* baltymų-aktyvatorių. Manoma, kad Alt susilpnina RNR polimerazės sąveiką su šeimininkės promotoriais, kurių aktyvavimui reikia arba baltymų-aktyvatorių, arba kurių transkripciją aktyvina  $\alpha$ -CTD ir UP elemento sąveika (Hinton, 2010). Fagas T4 koduoja dar du ADP-ribozilinančius baltymus ModA ir ModB, kurie yra fago ankstyvųjų genų produktai (Koch ir kt., 1995). ModA ribozilina abu RNR polimerazės  $\alpha$  subvienetus. Manoma, kad tai padeda susilpninti tiek bakterijos-šeimininkės, tiek fago promotorių aktyvumą. Taip fagas perprogramuoja

transkripcijos aparatą vidurinei transkripcijai vykdyti (Hinton, 2010).

Vidurinių bakteriofago T4 genų transkripcija prasideda apie 1,5-2 min po infekcijos. Fago viduriniai genai gali būti nurašomi arba nuo vidurinių promotorių ( $P_M$ ), arba tęsiant transkripciją nuo prieš juos esančių ankstyvųjų promotorių, arba abiem minėtais būdais (Stitt ir Hinton, 1994). Ankstyvųjų genų transkripcija gali vykti ir be fago baltymų sintezės, tuo tarpu vidurinių transkriptų sintezei reikalingi fago koduojami baltymai, kurie aktyvuoja vidurinius promotorius ir dalyvauja antiterminacijoje (Hinton, 2010).

Vidurinių promotorių  $-10$  sritis yra konservatyvi ir panaši į ankstyvųjų promotorių atitinkamą sritį ( $5'$ -TATAAT- $3'$ ), tačiau jie neturi  $P_E$  būdingos  $-35$  srities (Miller ir kt., 2003). Fago T4  $P_M$  yra būdinga nukleotidų seka (a/t)(a/t)(a/t)TGCTTtA, išsidėsčiusi  $-30$  bp nuo transkripcijos pradžios (2 pav.).



**2 pav. Vidurinių bakteriofago T4 promotorių tipinės sekos** (Stoškienė ir kt., 2007). Ši tipinė seka nustatyta ištyrus 50 eksperimentiškai patvirtintų vidurinių promotorių struktūrą. Raidžių dydis atitinka konservatyvumo laipsnį.

Ši  $P_M$   $-30$  seka yra 11-13 (dažniausiai 12) nukleotidų atstumu nuo  $-10$  srities (Brody ir kt., 1983; Guild ir kt., 1988; Marshall ir kt., 1999; Truncaitė ir kt., 2003; Stoškienė ir kt., 2007). Ši specifinė  $-30$  seka yra vadinama MotA dėžute. Vidurinių promotorių  $-10$  sritys yra labai konservatyvios tarp visų žinomų vidurinių promotorių, tuo tarpu kai kurių vidurinių promotorių  $-30$  sritys skiriasi nuo MotA dėžutės tipinės sekos netgi itin konservatyviose pozicijose (Marshall ir kt., 1999; Truncaitė ir kt., 2002, 2003; Stoškienė ir kt., 2007).

Transkripcijai nuo fago  $P_M$  yra būtina modifikuota RNR polimerazė bei

du fago ankstyvųjų genų produktai MotA (transkripcijos aktyvatorius) ir AsiA (transkripcijos koaktyvatorius) (Ouhammouch ir kt., 1995). Veikdami kartu, AsiA/MotB reguliuoja viduriniąją transkripciją: AsiA prisijungęs prie RNR polimerazės blokuoja transkripciją nuo daugumos bakterijos-šeimininkės promotorių (Hinton ir kt., 2000), o prisijungęs prie RNR polimerazės/MotA komplekso – aktyvuoja transkripciją nuo viduriniųjų promotorių (Ouhammouch ir kt., 1995; Hinton ir kt., 1996). MotA ir AsiA kartu veikdami padidina RNR polimerazės giminingumą fago T4 viduriniams promotoriams (Hinton ir kt., 1996). Manoma, kad MotA baltymas sąveikauja ir su promotoriaus DNR seka, ir su  $\sigma^{70}$  subvieneto 4 sritimi (Hinton, 2010) ir tik tada aktyvuoja viduriniąją transkripciją (Hsieh ir kt., 2013). Modifikuota RNR polimerazė *in vitro* sudaro su viduriniaisiais promotoriais nestabilius kompleksus, kuriuos stabilizuoja MotA baltymas, sudarydamas papildomus ryšius baltymų ir DNR komplekse (Adelman ir kt., 1998; Yuan ir Hochschild, 2009).

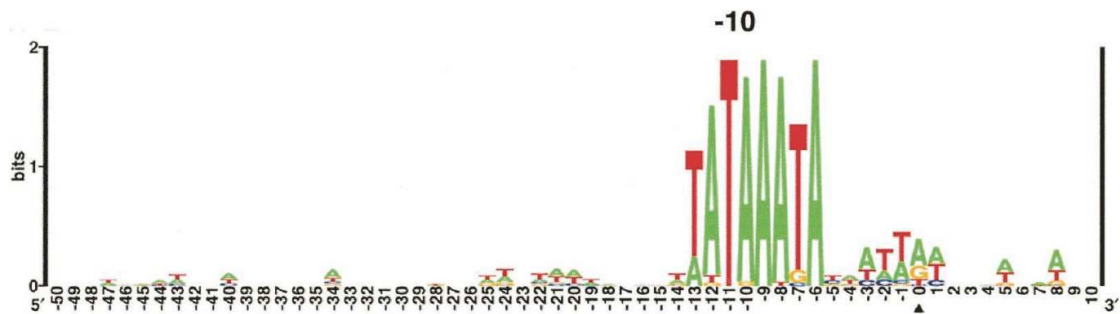
### **1.2.1.2. Transkripcijos reguliacija poreplikaciniame periode**

Prasidėjus fago T4 DNR replikacijai, transkripcija nuo fago viduriniųjų promotorių mažėja ir prasideda vėlyvųjų transkriptų sintezė. Vėlyvieji bakteriofago T4 genai yra nurašomi nuo besireplikuojančios fago DNR, turinčios viengrandžius trūkius (Herendeen ir kt., 1992).

Vėlyvieji promotoriai ( $P_L$ ) neturi nei –35, nei –30 konservatyvių sekų. Vėlyvųjų promotorių seką atitinka pailginta –10 sritis, kuri yra labai konservatyvi tarp daugelio T4 tipo fagų, ją sudaro nukleotidų oktetas: TATAAATA (Miller ir kt., 2003) (3 pav.).

Atstumas nuo šios konservatyvios sekos iki transkripcijos iniciacijos pradžios gali būti nuo 5 iki 10 nukleotidų. Vėlyvųjų promotorių transkripcijai yra būtina bakterijos-šeimininkės RNR polimerazė, du fago T4 koduojami su ja sąveikaujantys baltymai gp55 (arba sigma veiksnys  $\sigma^{55}$ ) bei gp33 ir fago T4 geno produktas 45, kuris yra replisomos slystantis žiedas (Geiduschek ir

Kassavetis, 2010). Tokiu būdu, vėlyvoji transkripcija yra priklausoma nuo fago DNR replikacijos (Nechaev ir Severinov, 2003; Twist ir kt., 2011).



**3 pav. Vėlyvųjų fago T4 promotorių tipinės sekos** (Miller ir kt., 2003). Juodas trikampis žymi +1 transkripcijos pradžios nukleotidą. Ši tipinė seka nustatyta ištyrus 50 vėlyvųjų promotorių struktūrą. Raidžių dydis atitinka konservatyvumo laipsnį.

gp55 specifiskai atpažįsta  $-10$  sritį, tačiau nors jis yra reikalingas atrankiam transkripcijos inicijavimui ties T4 vėlyvaisiais promotoriais, jo nepakanka (Miller ir kt., 2003). Po to, kai gp55 atpažįsta  $P_L -10$  sritį, prie RNR polimerazės  $\beta$  subvieneto jungiasi gp33, kuris veikia kaip vėlyvosios transkripcijos koaktyvatorius, tarpininkaujantis tarp  $\sigma^{55}$  ir slystančio žiedo (gp45) (Kolesky ir kt., 2002, Twist ir kt., 2011). Bakteriofago T4 gp45 trimeras, fago DNR polimerazės komplekso slystantis žiedas, apglėbiantis DNR grandinę, yra būtinas transkripcijos iniciavimui nuo  $P_L$ . Tik jam prisijungus prie RNR polimerazės-gp55-gp33 komplekso, prasideda promotoriaus aktyvavimas ir vėlyvųjų transkriptų sintezė (Geiduschek ir Kassavetis, 2010; Twist ir kt., 2011). Taip pat sėkmingai transkripcijai yra būtini gp44 bei gp62, kurie sudaro slystančio žiedo užkelėjo kompleksą (Herendeen ir kt., 1992; Kelch ir kt., 2011). Geno produktas 45 slysta DNR grandine aktyvuodamas vėlyvuosius promotorius už  $\sim 1000$  bp nuo jungimosi vietos (Miller ir kt., 2003). Nesant slystančio žiedo, gp33 stipriai slopina transkripciją nuo vėlyvųjų promotorių (Brody ir kt., 1995; Nechaev ir Geiduschek, 2006, 2008). Transkripcijos aktyvavimui yra reikšminga ATP arba dATP hidrolizė ir DNR matrica, turinti viengrandį trūkį, kuris reikalingas slystančiam žiedui užkelti ant DNR. Viengrandis trūkis turi būti netranskribuojamoje grandinėje, kad slystantis žiedas būtų užkeltas reikiama kryptimi (Geiduschek ir Kassavetis, 2010).

### **1.2.2. Fago T4 genų raiškos reguliacija potranskripciniame lygyje**

Nors fago T4 genų raiškos reguliacija dominuoja transkripcijos lygyje, tačiau mRNR brendimas ir degradacija taip pat yra labai svarbūs faktoriai, apsprendžiantys transkriptų kiekius. Greitas genų raiškos perjungimas iš ankstyvosios į vėlyvąją yra užtikrinamas atrankiai degraduojant arba stabilizuojant transkriptus. Bakteriofagų transkriptų brendimas ir degradacija paprastai yra priklausomi ir nuo bakterijos-šeimininkės, ir nuo fago koduojamų endo- ir egzoribonukleazių (Ueno ir Yonesaki, 2001).

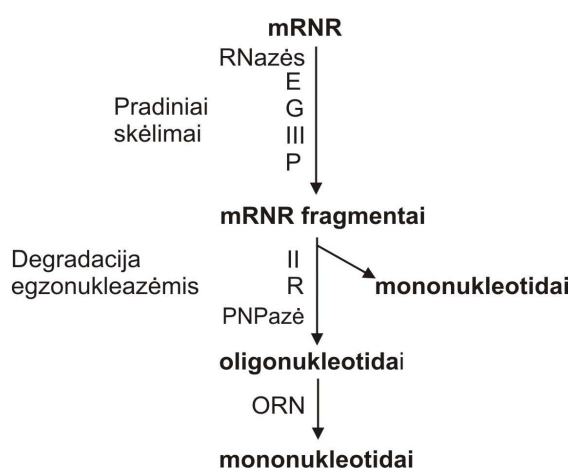
Iš karto po fago T4 infekcijos, bakterijos-šeimininkės mRNR yra sparčiai degraduojamos (Ueno ir Yonesaki, 2004). Paeiliui yra ekspresuojamos fago ankstyvosios, vidurinėsios ir vėlyvosios mRNR, kurios yra nuosekliai kaupiamos ir degraduojamos priklausomai nuo fago vystymosi etapo. Tokią banguotą genų raišką pirmiausia skatina laipsniškas bakterijos-šeimininkės RNR polimerazės modifikavimas (Miller ir kt., 2003). Kitas mechanizmas, palaikantis laipsnišką genų raišką, yra prieš tai buvusių mRNR degradavimas vėlesnėje stadijoje, pvz. vėlyvojoje infekcijos stadijoje modifikuota bakterijos-šeimininkės RNR polimerazė aktyviai nurašo vėlyvasias mRNR, tuo tarpu viduriniųjų genų mRNR transkripcija yra nutraukiama, ir jos degraduojamos labai greitai.

#### **1.2.2.1. *Escherichia coli* mRNR degradacija**

Bakterijose mRNR degradacija yra vykdoma kartu veikiant endo- ir egzonukleazėms. Pirmiausiai endonukleazė atpažįsta skėlimo taikinio seką ir ją hidrolizuoja taip inaktyvuodama transkriptą, kad jis taptų netinkamas transliuoti. Papildomi endonukleolitiniai skėlimai padalija mRNR į fragmentus. Tik po to, kai mRNR yra hidrolizuojama endoribonukleazių, egzoribonukleazės ją suskaido iki mononukleotidų (Deutscher, 2006).

*E. coli* yra rasta ir aprašyta daugiau nei 20 RNazių (Deutscher, 1988; Deutscher, 1993a, 1993b; Tock ir kt., 2000; Otsuka ir Yonesaki, 2005). Pagrindinės RNazės, dalyvaujančios mRNR metabolizme yra endoribonukleazės E, G, III, P ir 3'→5' egzoribonukleazės II, R, PNPazė bei oligoribonukleazė (ORN) (Otsuka ir Yonesaki, 2005; Yamanishi ir Yonesaki, 2005; Deutscher ir kt., 2006) (4 pav.).

## Degradacija



4 pav. *E. coli* mRNR degradacijos schema (Deutscher, 2006).

Be to, buvo nustatyta, kad endoribonukleazė Z taip pat gali būti svarbi *E. coli* mRNR degradacijai (Perwez ir Kushner, 2006). Kitos *E. coli* nukleazės dalyvauja rRNR bei tRNR brandinime (Steege, 2000). Dauguma tirtų prokariotų turi tik 3'→5' egzoribonukleazės (Rauhut ir Klug, 1999; Deana ir Belasco, 2005). Iki šiol žinoma tik viena bakterija (*B. subtilis*), turinti 5'→3' egzoribonukleazę J1 (Mathy ir kt., 2007, 2010; Lechnik-Habrink ir kt., 2012).

Manoma, kad mRNR degradacija *E. coli* dažniausiai prasideda, kai transkriptą kerpa pagrindinis *E. coli* mRNR degradacijos fermentas RNazė E. Žymiai rečiau mRNR degradavimas šiose ląstelėse prasideda, kai transkriptą skelia viena iš šių endonukleazių: RNazė III, RNazė G arba RNazė P (Schmeissner ir kt. 1984; Umitsuki ir kt. 2001; Li ir Altman 2003; Deutscher ir kt. 2006; Arraiano ir kt., 2010).



Ištirus ir charakterizavus baltymus, dalyvaujančius mRNR degradacijoje paaiškėjo, kad RNR degradacija yra labai organizuotas ląstelinis procesas, kuriame dalyvauja ne tik nukleazės, bet ir kiti bakterijos baltymai. *E. coli* atveju, baltymai dalyvaujantys mRNR degradacijos procese yra randami didelės molekulinės masės komplekse – degradosomoje. Kita pagrindinė mRNR apykaitą reguliuojanti grupė yra prie RNR prisijungiantys baltymai. Jų prisijungimas prie RNR stabilizuoja arba destabilizuoja mRNR veikdamas transkriptų prieinamumą ribonukleazėms (Anderson ir Dunman, 2009). Yra nustatyta, kad mRNR stabilumas priklauso ir nuo kitų veiksnių, tokių kaip transliacijos iniciacija ir elongacija, antrinių struktūrų buvimas 5' ir 3' netransliuojamose srityse ir poliadenilinimas (Coburn ir Mackie, 1999; Kushner, 2004; Carpousis ir kt., 2009; Belasco, 2010).

Bakterinių mRNR gyvavimo trukmė taip pat priklauso nuo to, ar transkriptas yra susijungęs su ribosomomis. Eksperimentiškai yra parodyta, kad daugelis mRNR gali būti destabilizuotos, esant mutacijoms SD srityje, kuri yra atsakinga už susirišimą su ribosomos 16S rRNR (Wagner ir kt. 1994; Sharp ir Bechhofer, 2003). Priešingai, mutacijos, kurios pagerina ribosomų prisijungimą, gali prailginti mRNR gyvavimo trukmę (Jain ir Kleckner 1993; Matsunaga ir kt., 1997). Šie rezultatai rodo, kad ribosomų prisijungimas prie RBS sričių padeda apsaugoti mRNR nuo ribonukleazių poveikio (Deana ir Belasco, 2005; Dreyfus, 2009; Pedersen ir kt., 2011).

#### **1.2.2.2. Bakteriofago T4 endoribonukleazė RegB**

Endoribonukleazė RegB yra sekai specifinė RNazė, kuri skelia mRNR GGAG motyvą, o retais atvejais GGAU motyvą, per vidurį. Efektyviausi šios RNazės skėlimo taikiniai yra fago T4 ankstyvųjų transkriptų tarpinėse srityse. Efektyviai kerpami GGAG motyvai dažnai būna ankstyvųjų genų SD sekose (Uzan ir kt., 1988; Ruckman ir kt., 1989; Sanson ir Uzan, 1993, 1995). Skeldama ankstyvųjų transkriptų SD sekas, RegB ne tik efektyviai išjungia jų transliaciją, bet ir destabilizuoja ankstyvuosius transkriptus. Dauguma

ankstyvųjų transkriptų, skirtingai nei vidurinieji ar vėlyvieji, yra jautrūs šiai ribonukleazei (Sanson ir kt., 2000). Fago T4 *regB*<sup>-</sup> mutanto (*regBL52*) ankstyvųjų transkriptų cheminis pusperiodis padidėja iki 4 kartų, tuo tarpu funkcinis pusperiodis padvigubėja. Tuo tarpu viduriniųjų ir vėlyvųjų transkriptų stabilumas išlieka toks pat tiek *regB*<sup>-</sup>, tiek *regB*<sup>+</sup> fago infekcijos atvejais. Remiantis šiais duomenimis buvo padaryta išvada, kad RegB vaidina esminį vaidmenį efektyviam genų raiškos perjungimui iš ankstyvosios į viduriniąją stadiją (Sanson ir kt., 2000).

Skeldama mRNR ribosomų atpažinimo vietose, RegB nukleazė nutraukia ankstyvųjų mRNR transliaciją, tačiau yra žinoma, kad ši nukleazė gali ir stimuliuoti kai kurių priešreplikacinių baltymų sintezę, pvz.: nesant RegB baltymo, DNR polimerazės (*gp43*) sintezės lygis sumažėja. Tai paaiškinama tuo, kad monocistroniniai *43* transkriptai transliuojami daug efektyviau už policistroninius (Hsu ir Karam, 1990). RegB nukleazė, skeldama ankstyvąjį policistroninį transkriptą 50 nt prieš geną *43*, padidina monocistroninių šio geno transkriptų kiekį ir pašalina prieš jį esančias transliacijos inhibicijos sekas (Sanson ir kt., 2000). Taigi RegB nukleazės funkcija gali būti panaudojama tiek ankstyvųjų genų raiškos reguliacijai, tiek perėjimui nuo ankstyvųjų prie viduriniųjų baltymų sintezės, nes vidurinieji transkriptai turi konkuruoti dėl ribosomų su gausiais ankstyvaisiais transkriptais.

Fago T4 genas *regB* yra nurašomas nuo tipiško ankstyvojo promotoriaus, kuris yra išsidėstęs prieš pat *regB* geną. Šis genas koduoja RegB baltymą, kuris yra sudarytas iš 153 aminorūgščių, tarp kurių dominuoja lizinas ir argininas (Uzan, 2001). Fago T4 endoribonukleazė RegB reguliuoja savo sintezę, kirpdama tiek SD srityje esantį GGAG motyvą, tiek ir tris papildomus GGAG motyvus, esančius koduojančioje *regB* transkripto dalyje (Ruckman ir kt., 1989).

Tyrimų metu buvo parodyta, jog nukleazės RegB fermentiniam aktyvumui pasireikšti *in vitro* nereikia kitų fago T4 baltymų, tačiau RegB aktyvumą maždaug 100 kartų stimuliuoja *E. coli* ribosomos 30S subvienetas, kai tuo tarpu 50S subvienetas jokios įtakos aktyvumui neturi. Buvo nustatyta, jog

ribosominis baltymas S1 *in vitro* stimuliuoja RegB aktyvumą (Ruckman ir kt., 1994). S1, esantis 30S ribosominiame subvienete, yra didžiausias ribosominis baltymas (556 ar.). Jis sudarytas iš 6 pasikartojančių konservatyvių S1 motyvų, kurie yra aptinkami daugelyje tiek prokariotinių, tiek eukariotinių baltymų, dalyvaujančių RNR metabolizme (Sorensen ir kt., 1998). Tiesioginės sąveikos tarp RegB ir S1 nėra aptikta, todėl bendras RegB veikimo mechanizmas nėra visiškai išaiškintas.

Ne visas GGAG sekas RegB skelia vienodai efektyviai. Kai šios sekos yra išsidėsčiusios geno koduojančioje dalyje, tetranukleotidas yra skeliamas neefektyviai arba visai neskeliamas. Motyvai GGAG, esantys viduriniųjų arba vėlyvųjų transkriptų SD sekose, taip pat yra atsparūs RegB endoribonukleazei (Sanson ir kt., 2000). Buvo nustatyta, kad vėlyvųjų transkriptų GGAG motyvai, esantys SD sekose, nėra skeliami ir dviplazmidinėje sistemoje. Tai rodo, kad šios sekos tiesiog nėra RegB nukleazės substratai (Sanson ir kt., 2000). Viduriniuosiuose genuose GGAG motyvai negausūs. Tuo tarpu vėlyvuosiuose transkriptuose GGAG motyvas yra neretas (iš 44 vėlyvųjų genų yra 14, t.y. 32%), tačiau buvo nustatyta, kad nei vienas iš jų nėra skeliamas endoribonukleazės RegB net *in vitro* (Sanson ir kt., 2000). Kaip RNazė RegB atpažįsta ir pasirenka specifinius skėlimo taikinius, iki šiol nėra žinoma. Manoma, jog tai gali lemti struktūrizuota GGAG sekos konformacija, kurią pateikia arba stabilizuoja 30S ribosominis baltymas S1 (Lebars ir kt., 2001; Bisaglia, 2003; Aliprandi ir kt., 2008). Spėjama, kad baltymas S1 gali pakeisti mRNR antrinę struktūrą taip, kad joje esantis RegB nukleazės taikinis tampa lengviau atpažįstamas šios nukleazės (Lebars ir kt., 2001).

Atlikus RegB hidrolizuojamų ir nehidrolizuojamų sekų analizę, buvo nustatyta, jog be konservatyvios GGAG sekos, hidrolizuojama RNR turi AU turtingą sritį sekos GGAG 3' gale. Taip pat šioje srityje beveik nebuvo citozino, kai tuo tarpu nehidrolizuojamuose transkriptuose citozinai visada aptinkami (Uzan, 2001). Išanalizavus iki šiol žinomus RegB taikinius buvo parodyta, kad fago T4 endoribonukleazės RegB skeliama seka apima 11 viengrandės RNR nukleotidų, tarp kurių yra 100% konservatyvus GGA tripletas 5' gale ir

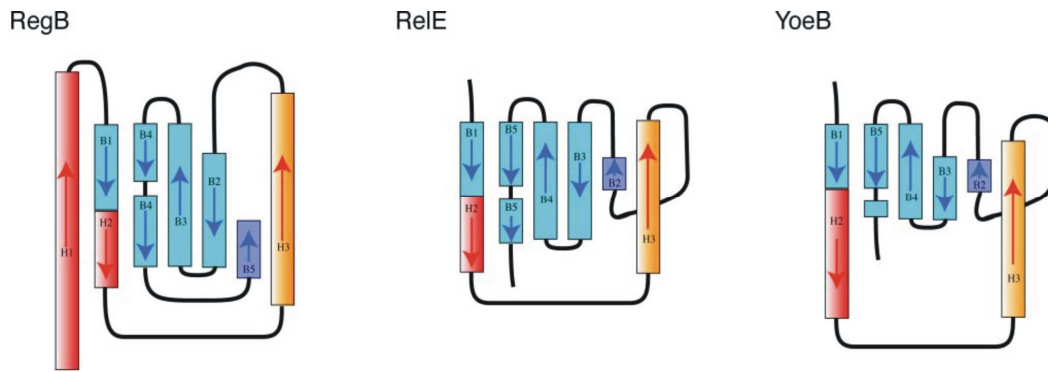
degeneruota konservatyvi seka už jos. Laipsniška delecinė analizė, fago T4 RNR skeliamų ir neskeliamų sekų bei nukleotidų pakaitų specifinėse padėtyse tyrimai, leido aptikti tokią konservatyvią taikinio seką: GGAGRAYARAA, kurioje R yra bet koks purinas, o Y – bet kuris pirimidinas (Durand ir kt., 2006). 2007 metų pradžioje buvo nustatyta endoribonukleazės RegB tretinė struktūra. Nepaisant to, kad nėra jokio sekų panašumo, o aktyviojo centro aminorūgščių liekanos yra skirtingos organizacijos, RegB yra struktūriškai panaši į toksinų-antitoksinų sistemų endoribonukleazes YoeB ir RelE (Odaert ir kt., 2007). Kaip ir RegB, ribonukleazės YoeB ir RelE turi mišrią paralelinę/antiparalelinę  $\beta$  klostę, o priešais ją yra dvi spirалės (5 pav.).



**5 pav. Endoribonukleazių RegB, RelE ir YoeB erdvinės struktūros** (Odaert ir kt., 2007). Paveiksle raudona ir oranžine spalvomis pažymėtos konservatyvios  $\alpha$  spirалės, o žydra spalva – konservatyvios  $\beta$  klostės. Mėlyna spalva pažymėti nekonservatyvūs motyvai.

Tačiau tarp šių trijų ribonukleazių yra ir struktūrinių skirtumų (6 pav.). Pagrindiniai skirtumai yra šie:

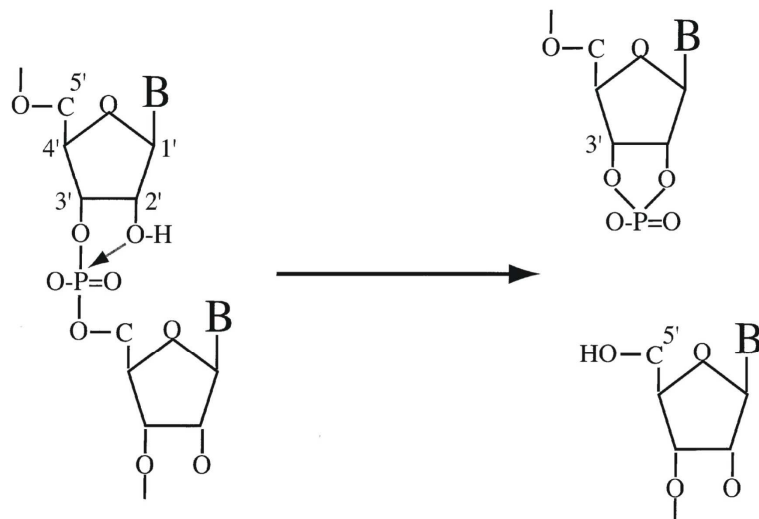
- pirmosios RegB spirалės (6 pav. H1) nėra YoeB/RelE,
- ribonukleazėse YoeB/RelE trumpoje antroje vijoje yra insercija, tokia pat insercija yra penktojoje RegB vijoje,
- YoeB atveju antrinių struktūrinių elementų ilgiai skiriasi nuo randamų RegB struktūroje,
- YoeB H2 spirалė yra ilgesnė už atitinkamas spirales, esančias RegB ir RelE.



**6 pav. Endoribonukleazių RegB, RelE ir YoeB struktūrinių elementų išsidėstymo schema** (Odaert ir kt., 2007). Paveiksle raudona ir oranžine spalvomis pažymėtos konservatyvios  $\alpha$  spiralės, o žydra spalva – konservatyvios  $\beta$  klostės. Mėlyna spalva pažymėti nekonservatyvūs motyvai.

Buvo nustatyta, kad tarp endonukleazių RegB, YoeB ir RelE yra ir funkcinių panašumų. Ribonukleazė RelE taip pat atpažįsta trinukleotidines sekas, be to, ji, o kai kuriais atvejais ir YoeB, skelia mRNR seką-taikinį tarp antrojo ir trečiojo nukleotido taip pat kaip ir RegB (Pedersen ir kt., 2003, Christensen ir kt., 2004). Buvo pasiūlyta endoribonukleazės RegB, RelE ir YoeB išskirti į naują struktūriškai ir funkciškai atskirą ribonukleazių šeimą, kurios narės pasižymi siauru substratiniu specifiškumu ir geba inaktyvuoti mRNR, esančią ribosomos viduje (Odaert ir kt., 2007). Tačiau RelE ir YoeB yra aktyvios tik sąveikaudamos su ribosomominiais subvienetais (atitinkamai su 30S ir 50S) (Yamaguchi ir Inouye M., 2011), o ar RegB tiesiogiai sąveikauja su S1 iki šiol nėra nustatyta. RelE neturi ribonukleazinio aktyvumo *in vitro* ir yra aktyvi tik ribosomose *in vivo* (Pedersen ir kt., 2003). Ji hidrolizuoja mRNR nespecifiškai *in vivo* (Hurley ir kt., 2011). YoeB yra aktyvi ir *in vitro*, tačiau *in vivo* skelia tik aktyviai transliuojamas mRNR (Christensen ir kt., 2004).

Endoribonukleazė RegB hidrolizuoja transkriptus taip pat kaip ir RNazė A, RNazė T1, RNazė T2, barnazė, YoeB bei RelE ir šioms nukleazėms giminingi fermentai: RNR 5' galinėje dalyje susidaro –OH grupė, o 3' galinėje dalyje – 2',3'–fosfodiesteris, kuris gali būti hidrolizuojamas toliau (7 pav.) (Saida ir kt., 2003; Neubauer ir kt., 2009; Feng ir kt., 2013).



7 pav. Barnazės, RNazės A, RNazės T1, RNazės T2, RelE, YoeB ir RegB vykdoma fosfodiesterinės jungties hidrolizavimo schema (Saida ir kt., 2003).

Visos žinomos transfosforilazės turi vieną arba du histidinus ir vieną glutaminą aktyviajame centre. Buvo parodyta, kad pakeitus H48A, RegB aktyvumas yra panaikinamas, tuo tarpu H68A pakaita sumažina endoribonukleazės aktyvumą penkis kartus (Saida ir kt., 2003; Odaert ir kt., 2007). Tačiau šie du histidiniai yra priešingose baltymo dalyse ir negali kartu formuoti katalitinio centro. Visi kiti histidiniai RegB funkcijai yra nesvarbūs. Q19 ir Q105 yra galimi kandidatai aktyvaus centro formavimui. Buvo parodyta, kad mutacija Q19 sumažina RegB toksiškumą, bet visiškai jo nepanaikina. Manoma, kad argininai taip pat gali būti svarbūs RegB funkcijai, kadangi R11, R56 ir R52 mutacijos sumažina RegB aktyvumą (Odaert ir kt., 2007). Tačiau tiksli aktyviojo endoribonukleazės RegB centro struktūra vis dar yra nenustatyta.

Manoma, kad endoribonukleazė RegB potencialiai galėtų skelti ir *E. coli* GGAG motyvus, taip sustabdydama jų transliaciją. Preliminarūs duomenys rodo, kad SD vyraujantis motyvas GGAG yra dažnesnis ne tik *E. coli*, bet ir kitų T4 giminingų bakteriofagų bakterijų-šeimininkų transkriptuose. Tačiau iki šiol yra nustatytas tik vienas *E. coli* genas (*ftsZ*), kurį hidrolizuoja RegB (Uzan, 2001, 2009).

### 1.2.2.3. *E. coli* endoribonukleazės fago T4 RNR metabolizme

#### 1.2.2.3.1. Endoribonukleazė E

Pagrindinis *E. coli* mRNR degradacijos fermentas yra RNazė E, kuri nepasižymi specifiškumu sekai ir hidrolizuoja viengrandes AU turtingas sekas (Ehretsmann ir kt., 1992; Lin-Chao ir kt., 1994). Nors yra nustatyta didelė dalis jos hidrolizuojamų taikinių, tačiau neįmanoma nuspėti RNazės E kirpimo vietų vien tik remiantis RNR sekomis arba struktūromis (Kaberdin, 2003). Ji turi taikinius beveik visuose *E. coli* transkriptuose ir hidrolizuodama mRNR sukuria naujus taikinius 3'→5' egzoribonukleazėms taip pagreitindama transkriptų degradaciją. RNazė E skeldama RNR teikia pirmenybę tiems RNR substratams, kurie 5' gale turi monofosfatinę grupę ir nėra aktyviai transliuojami (Mackie, 1998, 2000; Baker ir Mackie, 2003). Substratai, 5' gale turintys hidroksilo arba trifosfatinę grupes yra hidrolizuojami lėtai ir labai neefektyviai (Jiang ir kt., 2000; Jiang ir Belasco, 2004). Nustačius RNazės E kristalo erdvinę struktūrą, buvo patvirtinta, kad RNazė E turi struktūrinę kišenę, kuri skirta 5'-galinei monofosfatinei grupei prisijungti (Callaghan ir kt., 2005). 2007 metais buvo nustatyta, kad *E. coli* koduoja specifinį fermentą pirofosfohidrolazę (RppH), kuri transkriptų 5' gale esančias trifosfatines grupes verčia monofosfatinėmis (Celesnik ir kt., 2007; Deana ir kt., 2008). RNazė E gali pradėti mRNR degradaciją dviem būdais: tiesiogiai skeldama transkriptus, turinčius gale trifosfatą, arba nuo 5' galo priklausomu mRNR degradacijos keliu, kai trifosfatinė liekana veikiant pirofosfohidrolazei yra pakeičiama 3' monofosfatu (Belasco, 2010). Taip pat, RNazė E gali hidrolizuoti transkriptus po kitų endoribonukleazių arba savo pačios skėlimo, kai 5' gale lieka monofosfatinė grupė.

Eksperimentiškai buvo parodyta, kad kai kurie *E. coli* transkriptai gali būti sparčiai degraduojami net ir tuo atveju, jei 5' gale nėra monofosfatinės grupės (Baker ir Mackie, 2003; Kime ir kt., 2010). Tai bandoma aiškinti nauju mRNR destabilizavimo modeliu, pagal kurį du ar keli transkripto viengrandžiai

segmentai sąveikaudami su RNaze E gali būti skeliami nepaisant to, ar jų 5' gale yra monofosfatas (Kime ir kt., 2010). Tačiau kol kas šis modelis yra mažai tirtas ir nėra aišku ar atspindi situaciją *in vivo*.

RNazė E yra esminė bakterijos ribonukleazė, jos perteklius arba nepakankamumas gali apsunkinti ląstelės augimą ir vystymąsi (Apirion, 1978; Claverie-Martin ir kt., 1991; Jain ir kt., 2002). RNazė E vykdo savo pačios autoreguliaciją taip užtikrindama savo pastovų kiekį ląstelėje. Fermentas karp savo transkriptą, taip paspartindamas mRNR degradaciją (Mudd ir Higgins, 1993; Jain ir Belasco, 1995; Diwa ir kt., 2000; Sousa ir kt., 2001; Ow ir kt., 2002). Kai RNazės aktyvumas yra mažas arba kai jos transkriptų-taikinių tampa daug *rne* karpymas sumažėja, dėl to padaugėja RNazės E baltymo. Tokie veiksniai, kaip nekoduojančios RNR, prie RNR prisijungiantys baltymai ir transliacijoje dalyvaujantys veiksniai dažnai netiesiogiai turi įtakos RNazės E poveikiui transkriptams-taikiniams, keisdami jų pasiekiamumą fermentui (Anderson ir Dunman, 2009).

RNazė E yra 1061 ar. baltymas, susidedantis iš funkciškai skirtingų domenų. Katalitiškai aktyvios N-galinės baltymo dalies (1-498 ar. liekanos) pakanka fermento ribonukleazinei funkcijai vykdyti. Tuo tarpu C-galinė baltymo dalis (499-1061 ar. lieknos) susideda iš prolino liekanomis turtingos jungties, kuri palengvina fermento sąveiką su vidine membrana, arginino liekanomis turtingo su RNR susirišančio domeno bei C-galinio domeno, prie kurio gali jungtis daugiabaltyminio komplekso – degradosomos baltymai (McDowall ir Cohen, 1996; Vanzo ir kt., 1998; Khemici ir kt., 2008). Fermentas yra homotetramerinis, tokia jo struktūra yra svarbi katalitinio centro susiformavimui (Carpousis, 2007). Be to, kad RNazė E dalyvauja daugumos *E. coli* transkriptų degradacijoje, ji taip pat dalyvauja sRNR (Masse ir kt., 2003; Kim ir Lee, 2004), rRNR (Ghora ir Apirion, 1978; Li ir kt., 1999) ir tRNR (Ow ir Kushner, 2002; Li ir Deutscher, 2002; Mohanty ir Kushner, 2008) brendime ir visame bakterijos RNR metabolizme.

RNazė E ląstelėje aptinkama multifermentiniame komplekse – degradosomoje. Kartu su RNaze E į degradosomos sudėtį įeina PNPazė, RNR



helikazė B (RhlB) ir enolazė. Degradosoma, manoma, vaidina svarbų vaidmenį mRNR degradavime (Carpousis ir Krish, 1994; Carpousis ir kt., 2002; Bandyra ir kt., 2013), tačiau nėra būtinas elementas transkriptų destabilizavimui (Carpousis, 2007).

Nustatyta, kad bakteriofago T4 mRNR metabolizme ribonukleazė E veikia visu fago vystymosi ciklo laikotarpiu (Mudd ir kt., 1990). Tai rodo, kad šis baltymas nėra degraduojamas fago infekcijos metu, bet yra panaudojamas jo vystymuisi. Keletas RNazės E skėlimo taikinių fago T4 transkriptuose yra nustatyti (trys iš jų rasti geno 32 transkriptų sekose, vienas geno  *$\alpha$ -gt* ir dar vienas – geno *soc* transkriptuose) (Mudd ir kt., 1988; Otsuka ir kt., 2003), tačiau manoma, kad dauguma jos taikinių dar nėra aptikti. Nustatyta, kad tiek cheminis, tiek funkcinis fago T4 transkriptų stabilumas yra atitinkamai 4 ir 2 kartus didesnis fagui vystantis RNazės E ts mutantuose nepermissyvinesė sąlygose (Masse ir kt., 2003). Parodyta, kad ir fago T4 vystymasis žymiai sulėtėja ir galutinė fagų išeiga mažėja 50 procentų fagui vystantis *E. coli* kamienne turinčiame mutaciją *rne* gene (Mudd ir kt., 1990).

Kaip minėta, RNazė E atpažįsta seką, kurios sudėtyje yra daug AU nukleotidų. Bakteriofago T4 genomo sudėtyje yra ~65,5 procentai AT nukleotidų (Miller ir kt., 2003), tuo tarpu bakterija-šeimininkė jų turi tik apie 50 procentų. Todėl manoma, kad fago T4 transkriptai turi daugiau potencialių RNazės E skėlimo taikinių, nei *E. coli* transkriptai (Uzan, 2009), tačiau infekcijos metu kintant RNazės E specifiškumui, fago transkriptų atsparumas šiam fermentui padidėja (Ueno ir Yonesaki, 2004).

Nėra nustatyta, ar degradosoma turi kokią nors reikšmę fago T4 mRNR degradacijai ir ar degradosoma yra modifikuojama fago infekcijos metu. Tačiau yra parodyta, kad fago infekcijos metu, bakterijos-šeimininkės transkriptų destabilizavimui degradosoma yra reikalinga (Ueno ir Yonesaki, 2004). Taip pat nėra įrodymų, kad bakterijos-šeimininkės RNR pirofosfohidrolazė RppH dalyvauja T4 transkriptų destabilizavime (Uzan ir Miller, 2010).

### 1.2.2.3.2. Endoribonukleazė G

RNazė G (anksčiau vadinta CafA) yra RNazės E paralogas (Wachi ir kt., 1991; McDowall ir kt., 1993), kuris priklauso RNazių E/G šeimai ir dalyvauja RNR degradacijos ir brendimo procesuose (Tock ir kt., 2000; Carpousis ir kt., 2009). RNazė G yra homologiška RNazės E N-galiniam domeniui, kuris panašus į RNazės E atitinkamą domeną 35 procentais. Tačiau RNazė G neturi arginino liekanomis turtingos srities ir C-galinės dalies (McDowall ir kt., 1993; Okada ir kt., 1994), dėl to ji negali formuoti į degradosomą panašaus komplekso (Briant ir kt., 2003). Šie du fermentai turi panašų specifiškumą: RNazė G, kaip ir RNazė E, skelia viengrandes RNR AU turtingose srityse ir teikia pirmenybę tiems RNR substratams, kurie 5' gale turi monofosfatinę grupę (Jiang ir kt., 2000). Be to, buvo nustatyta, kad RNazė G labiau nei RNazė E yra jautri 5' monofosforilintam galui (Tock ir kt., 2000). 5'-monofosfatinė grupė, kuri stimuliuoja RNazės G aktyvumą, yra sukuriama RppH (Deana ir kt., 2008) arba kitos endonukleazės, pvz. E, RNazės III (Lee ir kt., 2002). Tačiau biologinės RNazių E ir G funkcijos *E. coli* yra skirtingos: RNazė E yra būtina *E. coli* augimui ir yra ypač svarbi mRNR degradacijai bei tRNR ir rRNR brendimui (Apirion, 1978; Ono ir Kuwano, 1979; Ow ir Kushner, 2002). RNazė G nėra būtinas *E. coli* fermentas. Jo nebuvimas nesukelia pastebimai žalingų efektų *E. coli* augimui bei daugelio RNR subrandinimui, netgi tų, kurios, manoma, yra priklausomos nuo RNazės G (Wachi ir kt., 1997; Lee ir kt., 2002). Endoribonukleazės G bakterijos ląstelėje yra apie 25 kartus mažiau nei jos homologės – RNazės E (Lee ir kt., 2002).

Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms, RNazė G negali komplementuoti RNazės E funkcijų (Wachi ir kt. 1997, Lee ir kt. 2002, Ow ir kt., 2003). Net padidinus viduląstelinį endoribonukleazės kiekį 30 kartų, RNazė G negali komplementuoti *rne-1* (ts mutantas) arba *rneΔ1018* (*rne* delecija, nulinis mutantas) mutacijų. Tačiau RNazės G mutantai, turintys *rng-219* arba *rng-248* mutacijas, gali iš dalies pavaduoti RNazę E mRNR degradacijos procese bei šiek tiek tRNR brendimo procese, tuo tarpu 9S rRNR brendimas yra

visiškai komplementuojamas (Chung ir kt., 2010).

Naudojant mikrogardelių metodą, buvo nustatyta, kad RNazė G kontroliuoja transkriptų, susijusių su cukrų metabolizmu, kiekius (Lee ir kt., 2002). Be to, ląstelės turinčios inaktyvuotą RNazę G sintetino didelius piruvato rūgšties kiekius (Sakai ir kt., 2007). Šie tyrimai rodo, kad RNazė G yra susijusi su pagrindinių metabolinių kelių reguliavimu *E. coli* (Arraiano ir kt., 2010).

RNazės G molekulinė masė yra 56 kDa, tačiau po baltymų elektroforezės yra stebimos dvi baltymų juostelės, iš kurių didesnioji – 112 kDa. Jei prieš elektroforezę į tirpalą įdedama 2-merkaptoetanolio, didesnioji juostelė išnyksta. Tai rodo, kad RNazė G gali formuoti dimerą per disulfidinius tiltelius (Fang ir kt., 2009).

Manoma, kad RNazė G, taip pat kaip ir RNazė E, dalyvauja bakteriofago T4 mRNR apykaitoje. Bakteriofago T4 išėiga sumažėja 30 procentų fagui vystantys *E. coli* kamienė, turinčiame *rng* geno mutaciją (Uzan, 2009). Tai rodo, kad ši endoribonukleazė taip pat dalyvauja fago T4 transkriptų degradacijoje, bet iki šiol šios endoribonukleazės taikinių fago T4 transkriptuose nerasta. Tačiau buvo parodyta, kad fago infekcijos metu padidėja pačios *E. coli* mRNR jautrumas RNazei G (Ueno ir Yonesaki, 2004). Tai rodo, kad ji dalyvauja ir *E. coli* mRNR degradacijoje faginės infekcijos metu.

#### **1.2.2.3.3. Endoribonukleazė III**

RNazė III yra dvigrandinėi RNR (dgRNR) specifinė RNazė (Bradwell ir kt., 1989), kuri dalyvauja koduojančių ir nekoduojančių RNR degradacijoje bei brendime (Court, 1993; Nicholson, 1999; Drider ir Condon; 2004). Dvigrandinės RNR hidrolizė yra svarbi daugumos genų raiškai ir reguliavimui ne tik bakterijose, bet ir kitose organizmų grupėse. RNazė III ląstelėje yra homodimerinė (Li ir Nicholson, 1996). Vienas endoribonukleazės subvienetas (226 ar.) yra sudarytas iš N-galinio nukleazinio domeno ir C-galinio prie RNR

prisijungiančio domeno.

Endoribonukleazė III gali paveikti genų raišką dviem būdais: arba hidrolizuodama dgRNR ir veikdama, kaip aktyvus fermentas, arba kaip reguliatorinis baltymas, kuris prisijungia prie dgRNR, bet jos neskelia (Oppenheim ir kt., 1993; Dasgupta ir kt., 1998; Calin-Jageman ir Nicholson, 2003; Nicholson, 2013). RNazė III gali skelti tiek natūralios, tiek sintetinės kilmės dgRNR iki mažų 10–18 bp dvigrandinių fragmentų. Vykstant hidrolizės reakcijai, vienas iš dviejų prie dgRNR prisijungiančių domenų (dsRBD) atpažįsta tinkamą substratą ir prie jo prisijungia, kartu pritraukdamas nukleazinį domeną ir antrąjį dsRBD. Taip suformuojamas tinkamas katalitinis kompleksas dgRNR degradavimui (Blaszczuk ir kt., 2004). Šis katalitinis kompleksas skelia dgRNR, palikdamas 3'-hidroksilinę ir 5'-fosfatinę grupes RNR galuose bei 2 nt išsikišimą 3' gale (Robertson, 1982; Court, 1993; Meng ir Nicholson, 2008; Nicholson, 2013). Šią endoribonukleazę koduojantis genas *rnc* nėra būtinas, tačiau mutacijas jame turinčios bakterijos auga žymiai lėčiau (Nicholson, 1999). Buvo manoma, jog RNazės III vaidmuo mRNR degradacijoje nėra reikšmingas. Tačiau naujausiais mRNR transkriptų, kurių kiekis buvo reguliuojamas esant RNazės III pertekliui, tyrimais buvo parodyta, kad *E. coli* genome yra dar beveik 100 galimų RNazės III taikinių (Sim ir kt., 2010; Stead ir kt., 2011). Taip pat buvo nustatyta, kad RNazė III dalyvauja osmosinio šoko genų *bdm* (Sim ir kt., 2010; Kim ir kt., 2010) ir *proU* (Kavalchuk ir kt., 2012) transkriptų degradacijoje. Šie tyrimai rodo, kad RNazė III gali padėti *E. coli* prisitaikyti prie greitai pasikeitusių aplinkos sąlygų, kontroliuodama tikslinių transkriptų kiekius (Stead ir kt., 2011). Be to, RNazė III dalyvauja tRNR ir rRNR brendime (Bram ir kt., 1980).

RNazė III taip pat dalyvauja fago T4 RNR metabolizme, tačiau panašu, kad jos vaidmuo nėra svarbus, kadangi bendras funkcinis T4 mRNR stabilumas *E. coli* RNazės III<sup>+</sup> ir RNazės III<sup>-</sup> kamienuose išlieka toks pat (Mudd ir kt., 1990). Iki šiol nėra nustatyti du skėlimo taikiniai fago T4 geno 49 mRNR (Barth ir kt., 1988). Ši dgRNR specifinė endoribonukleazė dar dalyvauja fago T4 tRNR brendimo procese (Pragai ir Apirion, 1981).

#### 1.2.2.3.4. Endoribonukleazė LS

2005 metais buvo atrasta *E. coli* RNazė LS, dalyvaujanti fago T4 RNR metabolizme (Otsuka ir Yonesaki, 2005). Iš pradžių buvo pastebėta, kad bakteriofago T4 ASR 61.5 esanti *amber* mutacija sutrikdo fago vystymąsi. Šis ASR buvo pavadintas *dmd*. Tolimesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad *dmd* mutanto baltymų sintezė iki vidurinėsios infekcijos stadijos pradžios yra normali, o vėliau genų *uvs*, *23* ir *soc* transkriptuose buvo aptikti endonukleolitiniai skėlimai, kurių nebuvo randama laukinio tipo fago T4 transkriptuose. Buvo nustatyta, kad fago T4 infekcinio ciklo metu genas *dmd* reikalingas mRNR stabilumo reguliavimui (Ueno ir Yonesaki, 2001). Kai genas *dmd* yra neveiklus, fago T4 viduriniai ir vėlyvieji transkriptai degraduojami labai greitai. Tokią greitą degradaciją lemia *dmd*<sup>-</sup> mutantui būdingi mRNR skėlimai. Buvo nustatyta, kad *E. coli* koduojama endoribonukleazė LS sukelia *dmd*<sup>-</sup> mutantams būdingus mRNR skėlimus, taip sutrikdydama fago vystymosi ciklą. Baltymas Dmd yra RNazės LS inhibitorius, tuo tarpu išgrynintas Dmd baltymas *in vitro* RNazės E aktyvumo neveikia ir su ja tiesiogiai nesąveikauja. Šis faktas rodo, kad bakteriofagas T4 turi išvystęs sudėtingą RNazių reguliavimo mechanizmą (Kanesaki ir kt., 2005; Otsuka ir Yonesaki, 2005; Otsuka, 2007).

Biocheminių tyrimų duomenys parodė, kad RNazės LS aktyvumas yra susijęs su didelės molekulinės masės (~1000 kDa) kompleksu, kurį sudaro daugiau nei 10 baltymų. Du iš jų buvo nustatyti: RnlA ir triozės fosfatizomerazė. Pastaroji randama ląstelėje panašiais kiekiais kaip ir RnlA ir su ja susiriša. Mutacija triozės fosfatizomerazės gene iš dalies palaiko defektyvų *dmd* geną turinčio fago vystymąsi, dėl to, kad RnlA ir triozės fosfatizomerazė funkciškai sąveikauja tarpusavyje. Iki šiol nėra žinoma, ar RNazė LS turi tik vieną endonukleazinį aktyvumą (greičiausia suteiktą RnlA baltymo). Be to, nenustatyta ar RnlA aktyvumas yra veikiamas kitų komplekso komponentų (Uzan ir Miller, 2010).

Buvo nustatyta, kad *rnlAB* operonas priklauso II tipo toksinų-antitoksinų

sistemai, kurioje baltymas RnlA yra toksinas, o RnlB yra antitoksinas (Koga ir kt., 2011). Fagas T4 sustabdo bakterijos-šeimininkės genų raišką iškart patekęs į ląstelę (Svenson ir Karlstrom, 1976; Kashlev ir kt., 1993; Ueno ir Yonesaki, 2004), todėl nestabilus RnlB baltymas yra degraduojamas fago vystymosi ciklo pradžioje, dėl ko padidėja RNazės LS aktyvumas. Nesant Dmd baltymo, fagas T4 negali vystytis dėl greitos vėlyvųjų mRNR transkriptų degradacijos, kurią sukelia RNazė LS (Kai ir kt., 1996). Baltymas RnlB supresuoja RNazės LS aktyvumą. Buvo nustatyta, kad nesant RnlB, baltymas RnlA nekontroliuojamai degraduoja daugumą *E. coli* mRNR (Koga ir kt., 2011). Taip pat visai neseniai buvo nustatyta, kad baltymas Dmd ne tik veikia kaip antitoksinas prieš bakterijos koduojamą toksiną RnlA, bet ir prieš kitą *E. coli* toksiną – LsoA, taip apsaugodamas fago T4 mRNR nuo degradacijos ir užtikrindamas sėkmingą fago vystymąsi. Tai yra pirmas nustatytas atvejis, kai fagas koduoja vieną antitoksiną, kuris veikia prieš keletą toksinų (Otsuka ir Yonesaki, 2012).

RNazės LS specifiskumas bei veikimo modelis dar nėra nustatyti. Iš ~30 nagrinėtų viduriniųjų ir vėlyvųjų transkriptų, RNazė LS dažniausiai skelia viengrandes mRNR turinčias pirimidiną 3' gale (Kai ir kt., 1996; Kai ir Yonesaki, 2002; Kanasaki ir kt., 2005). Gali būti, kad ir kiti nukleotidai 3' gale turi reikšmę endonukleolitiniam skėlimui. Išskyrus šiuos pastebėjimus, daugiau jokių panašių sekos arba struktūros motyvų RNazės LS taikiniuose neaptikta (Uzan ir Miller, 2010).

RNazė LS dalyvauja ir *E. coli* mRNR apykaitoje, tačiau jos poveikis transkriptams yra nedidelis lyginant su RNaze E (Otsuka ir Yonesaki, 2005). Manoma, kad pagrindinė endoribonukleazės LS funkcija yra bakterijos-šeimininkės apsauga nuo bakteriofagų, o fago T4 baltymas Dmd yra reikalingas tai apsaugai įveikti.

#### **1.2.2.4. *E. coli* egzoribonukleazės**

*E. coli* yra nustatytos 8 egzoribonukleazės, iš jų yra 4 pagrindinės procesyvos 3'→5' egzoribonukleazės, kurios vykdo mRNR fragmentų

degradavimą iki mononukleotidų (Donovan ir Kushner, 1986; Ghosh ir Deutscher, 1999). Šios keturios egzoribonukleazės yra polinukleotidribonukleazė (PNPazė), RNazė II, RNazė R ir oligoribonukleazė.

PNPazė yra egzonukleazė, kurios fermentinio aktyvumo rezultatas yra nukleozid 5'-difosfatai, tuo tarpu RNazė II ir RNazė R yra nukleazės, kurios oligonukleotidų galuose palieka nukleozid-monofosfatines grupes. Nors kiekviena iš šių trijų egzonukleazių turi skirtingas katalitines savybes, jų funkcijos žymiai persidengia (Deutscher, 2006). *E. coli* mutantų, neturinčių vienos iš trijų egzoribonukleazių, augimas nepakinta, tai įrodo, kad likę du fermentai gali atlikti ir trūkstamą funkciją. Ląstelės, turinčios dviejų fermentų būtinųjų ar. mutacijas yra negyvybingos (Donovan ir Kushner, 1986). Ląstelėse, kuriose yra neveiklūs RNazė R ir PNPazė koduojantys genai, pradeda kauptis vgRNR ir dgRNR fragmentai, dėl to ląstelės žūva (Cheng ir kt., 1998; Cheng ir Deutscher, 2003, 2005).

Egzoribonukleazės PNPazė, RNazė II ir RNazė R negali visiškai degraduoti mRNR iki galutinių produktų – mononukleotidų (Ghosh ir Deutscher, 1999). Mažus 2-5 nt ilgio mRNR fragmentus iki mononukleotidų suskaido fermentas oligoribonukleazė. Manoma, jog tai yra vienintelė biologinė oligoribonukleazės funkcija ląstelėje (Niyogi ir Datta, 1975; Yu ir Deutscher, 1995; Ghosh ir Deutscher, 1999). Genas, koduojantis šį fermentą, yra būtinas. Nesant oligoribonukleazės, ląstelėje ima kauptis trumpi oligonukleotidai, dėl ko ląstelė žūva (Ghosh ir Deutscher, 1999).

RNazė II ir RNazė R turi tiek struktūrinių, tiek funkcinių panašumų. Jų antrinės struktūros panašios 60 % (Cheng ir Deutscher, 2002). Jų abiejų N-gale randami du šalčio streso domenai (CSDS), taip pat randamas centrinis nukleazinis domenas ir S1 domenas C-gale (Barbas ir kt., 2008; Vincent ir Deutscher, 2009). Nepaisant šių panašumų, RNazė R yra išskirtinė egzoribonukleazė, kadangi ji skaldo dvigrandines RNR be RNR helikazių pagalbos (Cheng ir Deutscher 2002; Vincent ir Deutscher 2006, 2009). Ši egzoribonukleazė turi du aktyvumus – nukleazinį ir helikazinį, kurie yra nepriklausomi vienas nuo kito. CSD2 domenas turi helikazinį aktyvumą, o

CSD1 arba S1 domenai reikalingi jo optimaliam aktyvumui palaikyti (Awano ir kt., 2010). *In vivo*, pagrindinė RNazės R funkcija yra mRNR degradavimas antrinių struktūrų vietose (Cheng ir Deutscher 2002, 2003; Li ir kt., 2002). *E. coli* ląstelėse, RNazės R kiekiai padidėja nuo 3 iki 10 kartų šalčio streso metu, stacionarioje augimo stadijoje, bei kitomis streso sąlygomis (Cairrao ir kt., 2003; Cheng ir Deutscher, 2005; Andrade ir kt., 2006).

RNazė II yra 70 kDa monomerinis baltymas, kuris hidrolizuoja viengrandines mRNR. Dešimt nukleotidų yra minimalus RNR molekulės ilgis, reikalingas RNazės II aktyvumui pasireikšti, o galutinis produktas yra keturių nukleotidų oligomeras (Amblar ir kt., 2006, 2007). RNazė II skelia viengrandinę RNR apie keturis kartus greičiau nei RNazė R. Tačiau RNazė R negali hidrolizuoti trumpesnės nei 10 nt RNR, tuo tarpu RNazė II išlieka procesyvi ir palieka di- ir trinukleotidus (Vincent ir Deutscher, 2009).

Iki šiol neįrodyta ar bakterijos-šeimininkės 3'→5' egzoribonukleazės RNazė II, PNPazė, RNazė R ar RNR pirofosfohidrolazė RppH dalyvauja bakteriofago T4 mRNR apykaitoje. Tačiau panašu, kad RNazė II išlieka aktyvi fago infekcijos metu, kadangi ji reikalinga fago T4 tRNR brendimui (Uzan, 2009). Kitų fermentų aktyvumą faginės infekcijos metu dar reikia įrodyti.

### **1.2.3. Fago T4 genų raiškos reguliacija transliacijos lygyje**

Fagas T4 savo baltymų sintezei daugiausia naudoja ląstelės-šeimininkės transliacijos aparatą. Paties fago T4 genome koduojamos tik kai kurios fagui specifinės tRNR (Mosig ir Hall, 1994) ir transliaciją reguliuojantys baltymai-represoriai (Miller ir kt., 1994). Fago baltymai yra pradami sintetinti labai greitai po jo DNR patekimo į ląstelę. Yra nustatyta, kad jau po 1 min nuo fago T4 DNR patekimo į ląstelę-šeimininkę, šios baltymų sintezė yra sustabdoma. Taip atsitinka dėl fago T4 mRNR savybių (tokių kaip Šaino ir Dalgarno sekų stiprumas) bei keleto fago indukuojamų transliacijos aparato modifikacijų (Miller ir kt., 1994). Reikia paminėti, kad bakterijos-šeimininkės baltymų transliacija yra stabdoma net tuo atveju, kai *E. coli* yra infekuojama faginėmis



dalelėmis, vadinamais defektyviais fagais, neturinčiais galvutėje DNR. Buvo nustatyta, kad po infekcijos defektyviais fagais, šeimininkės ribosomos yra paruošiamos transliuoti išskirtinai fago T4 mRNR (Mosig ir Eiserling, 2006). Yra nustatyta, kad ribosomos, išskirtos iš fagu T4 infekuotų ląstelių, skiriasi nuo išskirtų iš bakterijos-šeimininkės tik S1 baltymu. Šis baltymas yra vienas iš keleto baltymų, kurie yra ADP-ribozilinami fago koduojamo baltymo ModB (Tiemann ir kt., 1999). Ribosominis baltymas S1 dalyvauja mRNR prisijungime ir kodonams specifinių tRNR atrankoje (Subramanian, 1983; Potapov ir Subramanian, 1992), todėl manoma, kad ši modifikacija mažina S1 giminingumą ribosomoms ir tuo pačiu bakterinėms mRNR. Be to, riboziltransferazė Alt, kuri yra fago galvučių sudėtinė dalis ir taip pat ribozilina S1, yra atsakinga už defektyvių fagų sukeltą efektą (Mosig ir Eiserling, 2006). Nustatyta, kad riboziltransferazė ModB ribozilina ir *E. coli* elongacijos veiksnį – EF-Tu (Depping ir kt., 2005). Tačiau kokios galimos to pasekmės kol kas nėra žinoma, manoma, kad ši modifikacija taip pat galėtų būti susijusi su genų raiškos reguliacija transliacijos lygyje.

Pagrindiniai faktoriai, lemiantys efektyvią transkriptų transliaciją, yra apspręsti pirminėje mRNR struktūroje (de Smit ir van Duin, 1990). Transliacijos efektyvumas priklauso nuo Šaino-Dalgarno sekos stiprumo, iniciacijos kodono, atstumo tarp SD ir iniciacijos kodono, nukleotidų, supančių iniciacijos pradžia, antrojo transliacijos kodono, o taip pat antrinių mRNR struktūrų (Kutter ir Wiberg, 1969).

Kai kurios fago T4 mRNR sudaro tarpmolekulines RNR struktūras, kurios tiesiogiai veikia transliacijos iniciacijos efektyvumą. Tokios slopinklės RNR struktūros yra fago T4 koduojamų genų *e*, *soc*, *49* ir *I-TevI* mRNR (Miller ir kt., 1994). Šiais atvejais, SD seka ir/arba AUG iniciacijos kodonas yra paslepiami RNR dvigrandinėje struktūroje, tai silpnina 30S subvieneto prisijungimą ir transliacijos iniciacijos komplekso susidarymą (Uzan ir Miller, 2010). Gerai ištirtas yra geno *e* (koduojančio lizocimą, reikalingą bakterijos-šeimininkės ląstelės suardymui) atvejis. Genas *e* yra nurašomas tiek ankstyvojoje, tiek vėlyvojoje fago vystymosi ciklo stadijose, bet baltymas yra

sintetinamas tik vėlyvojoje stadijoje (McPheeters ir kt., 1986). Jei jis būtų transliuojamas ankstyvojoje stadijoje, ląstelė-šeimininkė būtų suardoma fagui nepabaigus savo vystymosi ciklo. Transkriptai, atsiradę ankstyvojoje vystymosi stadijoje, yra ilgesni ir formuoja slopiklinę RNR struktūrą, kuri sumažina lizocimo sintezę 100 kartų, lyginant su transkriptais, kurie tokios RNR struktūros neturi. Transkriptai, nurašyti nuo vėlyvųjų promotorių, yra trumpesni ir neturi sekų, formuojančių antrines RNR struktūras, todėl yra normaliai transliuojami (Uzan ir Miller, 2010).

Bakteriofago T4 transliacijos reguliacijoje dalyvauja įvairūs baltymai, tačiau jie visi yra represoriai. Šiems represoriams yra būdinga autogeninė kontrolė, t.y. jie reguliuoja ir savo sintezę. Nustatyta, kad bakteriofagas T4 koduoja 3 transliacijos represorius: gp32, gp43 ir RegA. Pirmieji du sąveikauja tik su savo pačių mRNR, tuo tarpu RegA jungiasi su ~30 kitų bei su nuosava mRNR (Miller ir kt., 1994; Uzan ir Miller, 2010). Šių baltymų mRNR atpažinimo taikiniai yra smeigtuko pavidalo antrinės arba sudėtingesnės struktūros, esančios prieš jų mRNR transliacijos iniciacijos sritis. Dauguma *E. coli* ir fago T4 transliacijos represorių konkuruoja su ribosomomis dėl nukleotidų sekų, kurias transliacijos iniciacijos metu užima ribosoma, padengia tas vietas (sekas) ir tuo būdu neleidžia susidaryti transliacijos iniciacijos kompleksui (Miller ir kt., 1994).

Kitas svarbus elementas yra Šaino-Dalgarno seka, turinti 3-9 nukleotidų ilgio fragmento 5'-UAAGGAGGUGAUC-3' dalį (Shine ir Dalgarno, 1974). Dažniausiai tai būna 4-6 nukleotidai iš AGGAGG sekos (Stormo ir kt., 1986). Ši seka yra komplementari 16S rRNR 3'-galinės dalies nukleotidų sekai 5'-GAUCACCUCCUUA-3'. Sąveika tarp šios sekos ir SD srities yra svarbi transliacijos iniciacijos tikslumui ir efektyvumui. Transliacijos iniciacija gali vykti ir be SD sekos, tačiau gana neefektyviai. Atstumas tarp iniciacijos kodono ir SD sekos yra svarbus veiksnys baltymų biosintezei. Šis atstumas gali būti nuo 5 iki 13 nukleotidų, tačiau dažniausiai *E. coli* atveju būna 8 nukleotidai, o fago T4 atveju – 6 nukleotidai (Miller ir kt., 1994; Malys, 2012). Mažesnis nei 5 nukleotidų atstumas labai sumažina baltymo sintezės

efektyvumą (Stormo ir kt., 1986). SD sekų vyraujantis motyvas yra GGAG arba GAGG – šios sekos stipriai jungiasi prie anti-SD sekos. Abu motyvai vyrauja *E. coli* transkriptuose vienodu dažniu ir sudaro daugiau nei 60 % visų SD sekų motyvų (Ma ir kt., 2002). Bakteriofagas T4 GGAG sekų turi mažiau nei GAGG, ir pastarosios vyrauja ankstyvuosiuose bei viduriniuosiuose genuose (Malys ir Nivinskas, 2009; Malys, 2012). Šį faktą galima būtų aiškinti tuo, kad GAGG galėtų užtikrinti fago T4 mRNR apsaugą nuo endoribonukleazės RegB, kuri, kaip buvo minėta anksčiau, efektyviai skelia GGAG motyvą. Be to, motyvas GAGG sąveikoje su anti-SD seka yra toks pats efektyvus kaip ir GGAG, o GAGGA net ir dar efektyvesnis. Motyvas GGAG yra aptinkamas tuose ankstyvuosiuose genuose, kurių inaktyvavimas turi būti vykdomas iš karto po ankstyvosios fago T4 genų raiškos stadijos (Malys, 2012). SD pagrindinio motyvo variantas GAGGA taip pat turi trinukleotidą GGA, kuris gali sudaryti RegB skėlimo vietą tuo atveju, jei yra prieš A-turtingą seką, toks atvejis buvo nustatytas *motB* geno atveju (Durand ir kt., 2006), tačiau tokie alternatyvūs taikiniai yra hidrolizuojami mažiau efektyviai.

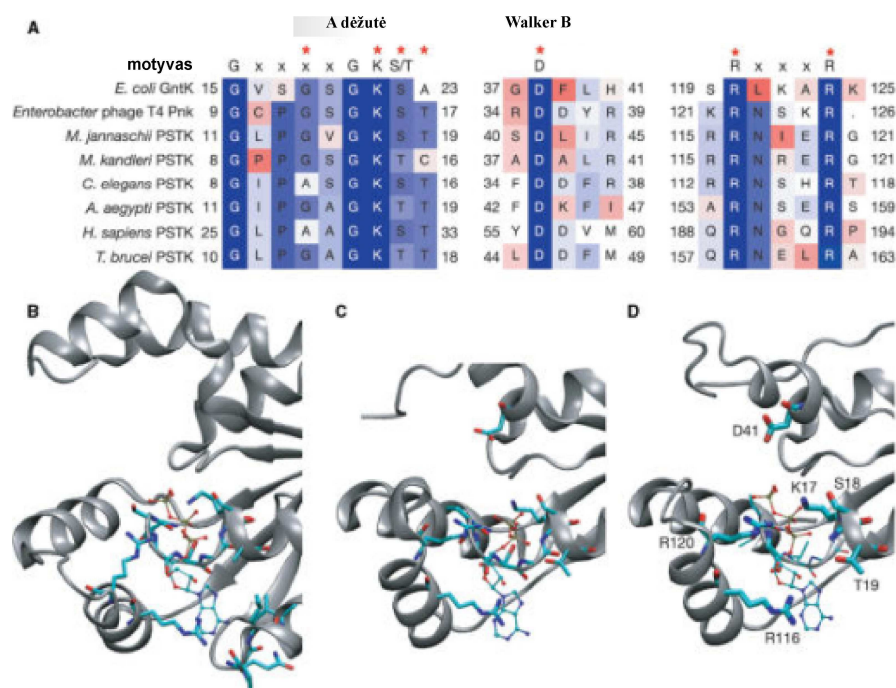
Efektyviai transliuojamos mRNR yra atsparesnės degradacijai, nes ribosomų prisijungimas prie RBS sričių padeda apsaugoti mRNR nuo ribonukleazių poveikio (Deana ir Belasco, 2005; Dreyfus, 2009; Pedersen ir kt., 2011).

### **1.3. Bakteriofago T4 koduojama polinukleotidkinazė**

Fago T4 ankstyvojo geno *pseT* koduojamas baltymas PNK (Sirotkin ir kt., 1978) katalizuoja  $\gamma$ -fosfato grupės pernašą nuo adenozintrifosfato (ATP) arba nuo kitų nukleozidtrifosfatų (Novogrodsky ir kt., 1966) ant polinukleotidų 5'-hidroksilo grupės (Richardson, 1965). Be to, PNK taip pat turi 3'-fosfatazės aktyvumą, kuris yra nepriklausomas nuo ATP (Cameron ir Uhlenbeck, 1977; Sirotkin ir kt., 1978) ir gali hidrolizuoti 2',3'-ciklines fosfodiesterines jungtis (Amitsur ir kt., 1987). Fago T4 PNK monomeras (301 ar.) yra sudarytas iš N-galinio kinazės (1-147 ar.) ir C-galinio (148-301 ar.) fosfatazės domenų (Wang

ir Shuman, 2001; Wang ir kt., 2002; Galburt ir kt., 2002; Eastberg ir kt., 2004; Zhu ir kt., 2007). N-galiniame domene yra 5'-kinazės aktyvusis centras, o C-galiniame – 3'-fosfatazės aktyvusis centras. Šie du aktyvumai yra nepriklausomi vienas nuo kito (Soltis ir Uhlenbeck, 1982; Wang ir Shuman, 2001). Aktyvus baltymas yra homotetramerinis polipeptidas. PNK tetrameras susiformuoja dėl sąveikų tarp fosfatazės-fosfatazės ir kinazės-kinazės homodimerų (Galburt ir kt., 2002).

N-gale esantį kinazės domeno aktyvųjį centrą sudaro būtiniosios ar. K15, S16, D35, R38 ir R126 (Wang ir Shuman, 2002), be to jame yra itin konservatyvus A dėžutės motyvas GXXGXXGKS, kuris yra aptinkamas daugelyje nuo NTP priklausomų fosfohidrolazių ir fosfotransferazių (8 pav.).

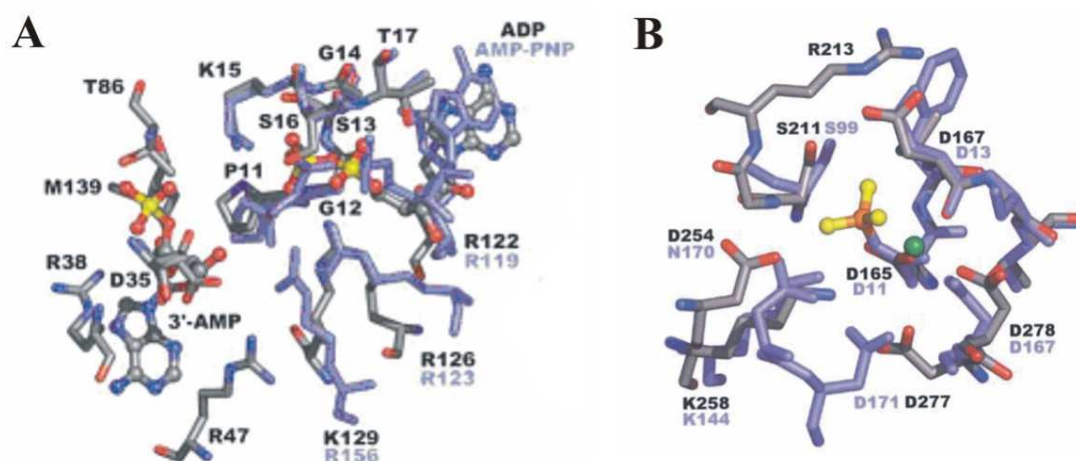


**8 pav. Kinazinio domeno konservatyvumas.** A) *E. coli* GntK (gliukonatkinazės), T4 PNK ir archėjinių bei eukariotinių PSTK (O-fosfoseril-tRNR<sup>Sec</sup> kinazių) ar. sekų palyginimas. Identiškos amino rūgštys yra pažymėtos vienoda spalva, žvaigždutės žymi būtinąsias aminorūgštis. Virš paveikslo yra pažymėti: A dėžutės motyvas, konservatyvi Asp liekana Walkerio B motyve bei konservatyvus RxxxR motyvas, kuris dalyvauja prisijungiant ATP bei koordinuoja Mg<sup>2+</sup> joną fago T4 PNK bei bakterijos GntK atvejais. B) fago T4 PNK kinazinio domeno struktūra. C) *E. coli* GntK kinazinio domeno struktūra. D) *M. jannaschii* PSTK kinazinio domeno struktūra (Sherrer ir kt., 2008).

T4 PNK geba fosforilinti įvairius DNR ir RNR substratus, tiek viengrandinius, tiek dvigrandinius, o minimalus jos substratas yra 3'-

fosfatmononukleozidas (Richardson, 1965). PNK teikia pirmenybę tiems oligonukleotidams, kurie gale turi guanino bazę, tuo tarpu lėčiausiai fosforilina substratus turinčius citoziną 5' gale (apie 6 kartus mažiau efektyviai lyginant su guaninu) (van Houten ir kt., 1998; Tang ir kt., 2005). Tiek vgDNR, tiek dgDNR molekulės, turinčios išsikišusius 5' galus, yra fosforilinamos žymiai efektyviau nei dvigrandinės molekulės, turinčios bukus arba išsikišusius 3' galus (Lillehaug ir kt., 1976). Nustatyta, kad fago T4 kinazės aktyvumui būtini magnio jonai, optimalus veikimo pH yra nuo 7,4 iki 8,0 (Richardson, 1965), be to, kinazinė reakcija yra grįžtama.

ATP prisijungus prie PNK, susidaro kompleksas, kuriame kinazės aktyvusis centras yra suformuotas iš negilaus tunelio. Jo paviršius sudarytas beveik vien tik iš turinčių krūvį arba polinių ar. liekanų, įskaitant R126, K129, K15, S16, R138, D35, T86 ir N33. Keletas hidrofobinių ar. liekanų (P11, V131, V135 ir M139) taip pat padeda formuoti tunelio sienelės. Nukleotido prisijungimo kišenė formuojama elektrostatiškos sąveikos dėka (9 pav. A).



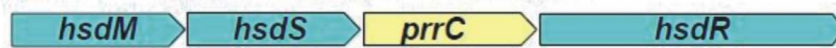
9 pav. Fago T4 PNK aktyviųjų centrų struktūros: A) kinazinio domeno B) fosfatazinio domeno (Galburt ir kt., 2002).

Būtiniosios aminorūgštys, formuojančios fosfatazinio domeno aktyvųjį centrą, yra D165, D167, R176, R213, D254 ir D278 (Wang ir Shuman, 2002) (9 pav. B). Nustatyta, kad fago T4 fosfatazės aktyvumui būtini magnio arba kobalto jonai, optimalus veikimo pH yra 6,0, ir fosfatazės reakcija geriau vyksta

esant DNR, o ne RNR substratui (Cameron ir Uhlenbeck, 1977).

Fago T4 PNK priklauso didelei 5'-kinazių/3'-fosfatazių šeimai, kurios taiso pažeistas nukleorūgščių grandines veikdamos kartu su atitinkamomis DNR arba RNR ligazėmis. Vienintelė iki šiol žinoma biologinė T4 PNK funkcija buvo bakterinės tRNR<sup>Lys</sup> antikodonų kilpų reparacija (Amitsur ir kt., 1987) (10 pav.).

A. *prrC* priklauso Ic tipo *Ecoprri* R-M grupei



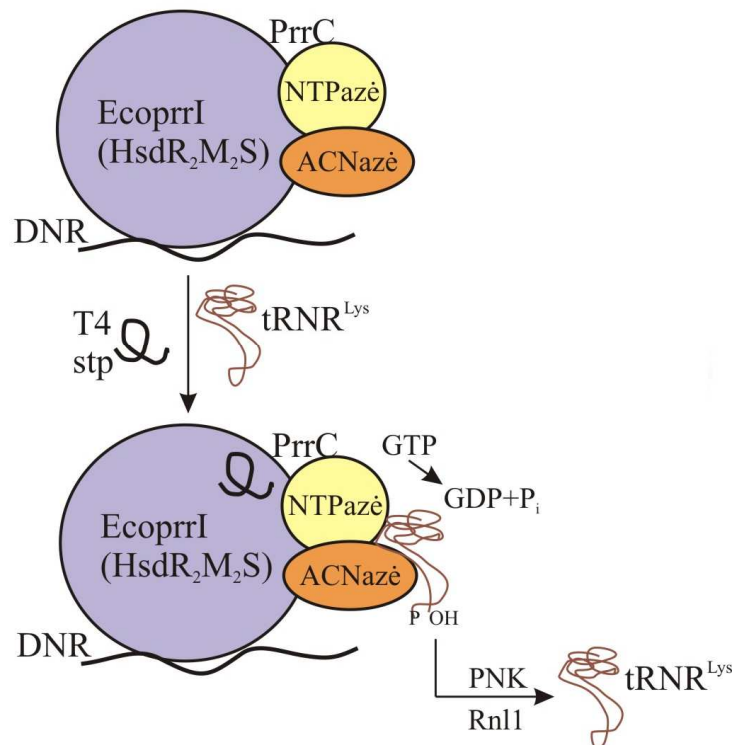
B. PrrC domenai



ABC ATPazė  
„PrrC dėžutė“

tRNR atpažinimas  
katalizė

C. PrrC sąveikos



**10 pav. PrrC tRNR antikodono nukleazės ir fago T4 gynybos mechanizmo sistema** (Uzan ir Miller, 2010). A) *E. coli* genas *prrC* yra *hsd* genų sandraulyje. B) PrrC turi N-galinį domeną, kuris sąveikauja su NTPazės bei *Ecoprri* kompleksu, ir C-galinį domeną (prasidedantį nuo 265 ar.), kuris dalyvauja tRNR atpažinime ir turi antikodono nukleazinį aktyvumą. C) tRNR skėlimo ir T4 reparacijos sistemų veikimo modelis: PrrC prisijungia prie *Ecoprri* ant DNR kaip neaktyvi endoribonukleazė. Fago T4 infekcijos metu, fago koduojamas polipeptidas *stp* prisijungia prie *Ecoprri* taip aktyvuodamas antikodono nukleazę, dėl kurios yra skeliama tRNR<sup>Lys</sup> antikodoninė kilpa. Pažeista tRNR yra atstatoma PNK ir RNR ligazei I veikiant kartu.

Bakteriofago T4 infekcijos metu *E. coli prr<sup>+</sup>* kamiene, fago koduojamas baltymas Stp prisijungia prie EcoprrI/PrrC komplekso. Tai keičia EcoprrI/PrrC sąveiką, indukuojami konformaciniai PrrC pokyčiai, dėl kurių yra aktyvuojamas tRNR<sup>Lys</sup> antikodono nukleazinis PrrC aktyvumas. Šiam procesui vykti reikalinga GTP hidrolizė. PrrC įvedamas trūkis bakterijos lizino tRNR antikodono kilpoje (tai yra vienintelis žinomas substratas *in vivo*) yra atsakas į fago T4 infekciją (Levitz ir kt., 1990; Tyndall ir kt., 1994; Penner ir kt., 1995; Uzan ir Miller, 2010). *E. coli* genas *prrC* yra randamas *EcoprrI* genų, koduojančių Ic tipo restrikcijos-modifikacijos baltymus, grupėje. Šie genai išsidėstę tokia tvarka: *hsdM-hsdS-prrC-hsdR* (Uzan ir Miller, 2010). Hsd baltymai yra susijungę į multimerinį kompleksą HsdR2M2S (10 pav.).

Dėl tRNR<sup>Lys</sup> pažaidos, yra efektyviai sustabdoma baltymų biosintezė, ir taip sutrikdomas fago replikacijos procesas. Fagas T4 evoliucijos eigoje išvystė tRNR reparacijos mechanizmą. Fago T4 PNK tRNR<sup>Lys</sup> kilpoje atsiradusius 5'-hidroksilinį ir 3'-fosfatinį galus, paliktus baltymo PrrC, pakeičia į 5'-fosfatinį ir 3'-hidroksilinį. Modifikuoti RNR galai toliau gali būti liguojami T4 RNR ligazės 1 (Rnl1). Taip bakteriofagas atstato tRNR ir gali tęsti transliaciją ir vystymąsi. Manoma, kad PNK modifikuoja tiek 3', tiek 5' galus vieno prisijungimo metu (Galburt ir kt., 2002).

#### **1.4. Baltymų modifikavimas bakteriofago T4 infekcijos metu**

Beveik visi eukariotų ir prokariotų baltymai yra modifikuojami transliacijos metu arba iškart po jos. Potransliacine modifikacija (PTM) – vadinama polipeptidinės grandinės modifikacija, dėl kurios baltymų struktūroje atsiranda pokyčiai, tokie kaip polipeptido sulankstymas, aminorūgščių modifikavimas, disulfidinio tiltelio susidarymas arba išardymas, baltymų modifikacijos palengvinančios jų susirišimą su kitais baltymais arba nukleorūgštėmis, pvz. glikozilinimas, acetilinimas, funkcinių grupių prijungimas. PTM keičia baltymo dydį bei struktūrą. Baltymas gali būti modifikuojamas vienu metu keliais skirtingais būdais. Potransliacinės

modifikacijos gali būti cheminės, kai prie polipeptidinių grandinių yra prijungiamos įvairios funkcinės grupės arba keičiama amino rūgšties cheminė prigimtis. Taip pat žinomos ir peptidinės modifikacijos, kai baltymai ar peptidai prisijungia prie kitų baltymų, pakeisdami jų konformaciją ir funkcijas.

Ankstyvajame bakteriofago T4 vystymosi ciklo etape yra sintetinama daug nedidelės molekulinės masės peptidų, kurie modifikuoja bakterijos-šeimininkės baltymus. Pvz., fago T4 genai: *dmd* – koduoja baltymą, modifikuojantį RNazę LS (Otsuka ir kt., 2007); *vs* – koduoja peptidą  $\tau$ , modifikuojantį *E. coli* valil-tRNR sintetazę (Neidhardt ir kt., 1969), *pin* – koduoja Lon proteazės inhibitorių (Skorupski, 1988), *arn* – koduoja RglB baltymo inhibitorių (Dharmalingam ir Goldberg, 1976; Dharmalingam ir kt., 1982), *stp* – koduoja polipeptidą, aktyvuojantį tRNA<sup>Lys</sup>-specifinę antikodono nukleazę PrrC (Kaufmann ir kt., 1986), *alc* – koduoja citoziną turinčios DNR transkripcijos inhibitorių (Kashlev ir kt., 1993). Be to, ankstyvajame fago vystymosi cikle yra sintetinama daug nenustatytos funkcijos peptidų, kurie greičiausiai irgi dalyvauja pertvarkant bakterijos-šeimininkės metabolizmą.

Iki šiol nustatyta tik viena fago T4 vykdoma cheminė baltymų modifikacija – ADP-ribozilinimas. Fagas T4 koduoja tris riboziltransferazes Alt, ModA ir ModB. Nustatyta, kad šie fermentai ribozilina *E. coli* baltymus bei pasižymi autoriboziliniu (Depping ir kt., 2005). Baltymų ADP-ribozilinimas yra svarbus procesas tiek prokariotų, tiek eukariotų ląstelėse. Prokariotų genomuose vyrauja mono ADP-ribozilinimas, kurio metu prie baltymo jungiama viena ADP-ribozės grupė. Mono-ADP-riboziltransferazės katalizuoja ADP-ribozilo pernašą nuo substrato ADP-ribozil-nikotinamido (NAD<sup>+</sup>) ant arginino arba histidino liekanų modifikuojamame baltyme. ADP-ribozilinimas pakeičia teigiamą Arg arba His liekanų krūvį dviem neigiamais fosfatinių grupių krūviais (Rohrer ir kt., 1975; Bell ir Eisenberg, 1996). Pernašos reakcija keičia elektrostatinį baltymo potencialą kartu paveikdama baltymo-baltymo arba baltymo-DNR (RNR) sąveikas (Kamzolova ir kt., 2000; Corda ir Girolamo, 2003).



Fago T4 riboziltransferazės Alt ir ModA dalyvauja genų raiškos reguliacijoje: fago koduojamas baltymas Alt modifikuoja vieno iš dviejų RNR polimerazės  $\alpha$  subvienetų Arg<sup>265</sup> aminorūgštį, kuri yra būtina  $\alpha$ -CTD sąveikai su ankstyvojo promotoriaus UP elementu ir su keletu kitų *E. coli* baltymų-aktyvatorių, tuo tarpu monoriboziltransferazė ModA ribozilina abu RNR polimerazės  $\alpha$  subvienetus ir taip keičia bakterijos-šeimininkės ir fago promotorių aktyvumą, kad galėtų vykti vidurinė transkripcija (Hinton, 2010). Baltymas ModB ribozilina ribosomos baltymą S1 (Tiemann ir kt., 2004), *E. coli* elongacijos faktorių Ef-Tu, trigerinį veiksniį ir keletą kitų bakterijos-šeimininkės baltymų. Tyrimais buvo parodyta, kad baltymai Alt, MotA ir MotB ribozilina dar eilę kitų *E. coli* baltymų (Depping ir kt., 2005). Bakteriofago T4 riboziltransferazės koduojantys genai *alt*, *modA* ir *modB* nėra būtinieji fago vystymuisi standartinėmis laboratorinėmis sąlygomis (Goff ir Setzer, 1980), tačiau daugelio bakterijos-šeimininkės baltymų ribozilinimas rodo, kad šie genų koduojami produktai gali būti labai svarbūs fago replikaciniam ciklui jų natūralioje aplinkoje.

Manoma, kad daugelis infekavusių bakteriją-šeimininkę bakteriofagu keičia jos fermentų aktyvumą, tačiau kol kas yra nustatyti, tik bakteriofago T7 koduojami veiksniai galintys modifikuoti bakterijos nukleazės. Fago T7 koduojama baltymų serino/treonino kinazė fosforilina RNazę III ir stimuliuoja jos aktyvumą (Mayer ir Schweiger, 1983), tuo tarpu RNazės E fosforilinimas stabilizuoja fago T7 RNR polimerazės susintetintą mRNR (Marchand ir kt., 2001). Be to, fago T7 koduojamas baltymas (proteinkinazė) fosforilina ribosominį baltymą S1 bei translacijos iniciacijos veiksnius IF1, IF2 ir IF3, taip stimuliuodamas vėlyvosios faginės mRNR translaciją (Robertson ir kt., 1992). Pastarųjų metų tyrimų duomenys rodo, kad bakteriofagai T2 bei T4 taip pat greičiausiai modifikuoja *E. coli* RNazes E bei G, keisdami jų specifiškumą substratams (Ueno ir Yonesaki, 2004; Kanasaki ir kt., 2005). Nors šių modifikacijų mechanizmas nėra iširtas, panašu, kad jis yra konservatyvus T4 giminingų bakteriofagų tarpe. Neabejotina, jog fagas T4 koduoja ir daugiau bakterijos šeimininkės baltymus modifikuojančių peptidų ir modifikacijos

fermentų, tačiau jie dar nenustatyti, nes beveik trečdalis fago T4 koduojamų produktų funkcijos iki šiol nėra žinomos. Apibendrinant literatūrinius duomenis galima teigti, kad bakteriofago T4 ankstyvųjų transkriptų brendimas ir degradacija yra tirti menkai, o *E. coli* nukleazių poveikis faginiams transkriptams tirtas tik pavienių genų atvejais. Todėl šio darbo tikslas buvo nustatyti ankstyvųjų transkriptų metabolizme dalyvaujančius fago T4 ir *E. coli* fermentus bei jų veikimo tarpusavio priklausomybę.

## 2. Medžiagos ir metodai

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Bakteriofagai, *E. coli* kamienai, plazmidinės DNR

##### Bakteriofagai:

1 lentelė. Darbe naudoti bakteriofagai.

Bakteriofagas	Pagrindinės savybės	Šaltinis
T4 <sup>+</sup>	Laukinis kamienas	Gautas iš dr. W. B. Wood
T4K10	I/S sistemos fagas ( <i>38amb262 51amS29 denAnd28 denB-rIIBΔrIIPT8</i> )	Gautas iš dr. K. N. Kreuzer
T4regB <sup>-</sup>	(regBL52)	Gautas iš dr. M. Uzan (Ruckman ir kt., 1989)
RB42	T4 giminingas bakteriofagas	Gautas iš dr. K. Carlson
RB49	T4 giminingas bakteriofagas	Gautas iš dr. K. Carlson
T4_H88	T4Δ <i>rIIB</i>	Gautas iš dr. L. W. Black
T4K10M14	Fagas T4K10 koduojamame baltyme PNK turintis G14D ar. pakaitą	Sukonstruotas šio darbo metu
T4K10M229	Fagas T4K10 koduojamame baltyme PNK turintis H229R ar. pakaitą	Sukonstruotas šio darbo metu
T4K10PNK+	Fagas T4K10, turintis atstatytą funkcionalų <i>pseT</i> geną	Sukonstruotas šio darbo metu
T4K10ΔPNK	Fagas T4K10Δ <i>pseT</i>	Sukonstruotas šio darbo metu
T4ΔPNK	Fagas T4Δ <i>pseT</i>	Sukonstruotas šio darbo metu
T4del12	Fagas T4 <sup>+</sup> turintis, <i>rIII-30.1</i> srities genų deleciją	Gautas iš dr. L. Truncaitės

## Bakterijų kamienai:

**2 lentelė. Darbe naudoti *E. coli* kamienai.**

Kamienas	Pagrindinės savybės	Šaltinis	Paskirtis
<i>E. coli</i> [N3433 <i>rne3071(ts)</i> ]	[ <i>Hfr(PO1)</i> , <i>lacZ43(Fs)</i> , $\lambda^-$ <i>rne3071(ts)</i> , <i>relA1 spoT thi-1</i> ]	Gautas iš dr. P. Regnier	Endoribonukleazės E poveikio antrinių skėlimų atsiradimo tyrimui
<i>E. coli</i> B <sup>E</sup>	( <i>sup</i> <sup>0</sup> )	Gautas iš dr. L. W. Black	T4 tipo fagų dauginimui
<i>E. coli</i> N3433	( <i>HfrH lacZ43</i> $\lambda^-$ <i>relA spoT1 thi-1</i> )	Gautas iš dr. P. Regnier	Endoribonukleazės E poveikio antrinių skėlimų atsiradimo tyrimui
<i>E. coli</i> GW10	K12 kamienas ( <i>W3110 zce-726::Tn10</i> )	Gautas iš dr. M. Wachi	Endoribonukleazės G įtakos antrinių skėlimų atsiradimo tyrimams
<i>E. coli</i> GW11	K12 kamienas ( <i>GW10 rng::cat</i> )	Gautas iš dr. M. Wachi	Endoribonukleazės G įtakos antrinių skėlimų atsiradimo tyrimams
<i>E. coli</i> GW20	K12 kamienas ( <i>GW10 rne-1</i> )	Gautas iš dr. M. Wachi	Endoribonukleazių G ir E įtakos antrinių skėlimų atsiradimo tyrimams
<i>E. coli</i> GW21	K12 kamienas ( <i>GW10 rne-1 rng::cat</i> )	Gautas iš dr. M. Wachi	Endoribonukleazių G ir E įtakos antrinių skėlimų atsiradimo tyrimams
<i>E. coli</i> MH1	( <i>araD139</i> $\Delta$ <i>lacX74 galU galK hsdR rpsL</i> )	Gautas iš dr. K. N. Kreuzer	I/S sistemos kamienas fago T4 mutantų konstravimui
<i>E. coli</i> B <sup>E</sup> _B <sup>S</sup>	( <i>sup</i> <sup>0</sup> )	Gautas iš dr. K. N. Kreuzer	I/S sistemos kamienas fago T4 mutantų konstravimui
<i>E. coli</i> CR63	( <i>supD</i> , <i>ser</i> )	Gautas iš dr. K. N. Kreuzer	I/S sistemos kamienas fago T4 mutantų konstravimui
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>gyrA96</i> ( <i>Nal</i> <sup>r</sup> ) <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> ( <i>rK</i> <sup>-</sup> <i>mK</i> <sup>+</sup> ) <i>glnV44 deoR</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 [ $\Phi$ 80d $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15]	Įsigytas iš Pharmacia	Plazmidžių transformacijai ir padauginimui

Kamienas	Pagrindinės savybės	Šaltinis	Paskirtis
<i>E. coli</i> C41(DE3)	[F' <i>ampT hsdS<sub>8</sub> (rsmS)gal dcm</i> ] DE3	Įsigytas iš Avidis	RNR indukcijai ir skyrimui. Baltymų RnaG, ModA, ModB, Alt, EF-Tu ir PNK superprodukcijai

### Plazmidiniai vektoriai:

**3 lentelė. Darbe naudotos plazmidės ir plazmidiniai vektoriai.**

Plazmidė	Pagrindinės savybės	Šaltinis	Paskirtis
pET21(+)	IPTG indukuojamas ekspresijos vektorius. Ap <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , T7 promotorius, pMB1	Įsigytas iš Novagen	Rekombinantinių plazmidžių konstravimui, genų raiškos tyrimams
pACYC184	Tc <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , p15A	Gauta iš dr. V. Šikšnio laboratorijos	Naujo plazmidinio konstrukto konstravimui
pBSPL0+	turi <i>supF</i> geną,	Gauta iš dr. K. Kreuzer. (Selic ir kt., 1988)	T4 mutantų konstravimui
pET16b	IPTG indukuojamas ekspresijos vektorius. Ap <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , T7 promotorius, pMB1	Įsigytas iš Novagen	Rekombinantinių plazmidžių konstravimui, genų raiškos tyrimams ir baltymų superprodukcijai
pET16b-ModB	pET16b pagrindu sukonstruota rekombinantinė plazmidė, turinti fago T4 geną <i>modB</i> , įterptą į NdeI ir BamHI taikinius	Sukonstruota dr. L. Kalinienės (Tiemann ir kt., 2004)	Fago T4 geno <i>modB</i> įterpimui į kitą plazmidinį vektorių
pTKR1	rekombinantinė plazmidė, turinti fago T4 geną <i>alt</i>	Sukonstruota dr. A. Raudonikienės (Koch ir kt., 2005)	Fago T4 geno <i>alt</i> įterpimui į kitą plazmidinį vektorių
pLFT4regB	pET21(+) pagrindu sukonstruota rekombinantinė plazmidė, turinti fago T4 geną <i>regB</i> , įterptą į Ecl136II ir XhoI taikinius	Sukonstruota dr. L. Piešiniene (Piešiniene ir kt., 2004)	Genų įterpimui į kitą plazmidinį vektorių ir genų raiškos tyrimams

## Rekombinantinės plazmidės

**4 lentelė. Darbe sukonstruotų rekombinantinių plazmidžių klonavimo schemas.**

Rekombinantinė plazmidė	Plazmidinis vektorius į kurį įterpiamas fragmentas	Vektoriumi paruošti naudoti fermentai	Fragmento šaltinis	DNR matricos šaltinis	DNR fragmentui paruošti naudoti fermentai
pT4regB_T4g55.2'	pLP_T4regB	XhoI, Bpu1102I	PGR su pradmenimis 19 ir 20	Fagas T4 <sup>+</sup>	T4 PNK
pT4regB_T4nrdC.3'	pLP_T4regB	XhoI, Bpu1102I	PGR su pradmenimis 21 ir 22	Fagas T4 <sup>+</sup>	T4 PNK
pT4regB_T4modB'	pLP_T4regB	XhoI, Bpu1102I	PGR su pradmenimis 23 ir 24	Fagas T4 <sup>+</sup>	T4 PNK, XhoI
pET16b_rnag	pET16b	NdeI, BamHI	PGR su pradmenimis 36 ir 37	<i>E. coli</i>	NdeI, BamHI
pET16B_ef-tu	pET16b	NdeI, BamHI	PGR su pradmenimis 8 ir 9	<i>E. coli</i>	NdeI, BamHI
p128-21-1_modA	p128-21-1	HindIII, Ecl136II	PGR su pradmenimis 6 ir 7	Fagas T4 <sup>+</sup>	HindIII, T4 PNK
p128-16b_alt	p128-16b	BamHI, NdeI/T4 DNR polimerazė	Fragmentas buvo iškirptas iš rekombinantinės plazmidės pTKR1	Fagas T4 <sup>+</sup>	BamHI, KpnI/T4 DNR polimerazė
p128-16b_modB	p128-16b	NdeI, BamHI	Fragmentas buvo iškirptas iš rekombinantinės plazmidės pET16b-ModB	Fagas T4 <sup>+</sup>	NdeI, BamHI
pT4PNK	p128-21-1	Ecl136II, HindIII	PGR su pradmenimis 1 ir 2	Fagas T4 <sup>+</sup>	HindIII, T4 PNK
pT4K10PNK	p128-21-1	Ecl136II, HindIII	PGR su pradmenimis 1 ir 2	Fagas T4K10	HindIII, T4 PNK
pBSPLO_T4PNK	pBSPLO+	EcoRI/T4 DNR polimerazė, KpnI	PGR su pradmenimis 1 ir 3	Fagas T4 <sup>+</sup>	KpnI
pET16b_T4PNK	pET16b	NdeI, BamHI	PGR su pradmenimis 4 ir 5	Fagas T4 <sup>+</sup>	NdeI, BamHI
pET16b_T4K10PNK	pET16b	NdeI, BamHI	PGR su pradmenimis 4 ir 5	Fagas T4K10	NdeI, BamHI
p0_T4ΔpseT	pBSPLO+	EcoRI/T4 DNR polimerazė, KpnI	Buvo sulieti du fragmentai. PGR su pradmenimis 38 ir 39 bei 40 ir 41	Fagas T4 <sup>+</sup>	T4 PNK, KpnI
p0_T4K10ΔpseT	pBSPLO+	EcoRI/T4 DNR polimerazė, KpnI	Buvo sulieti du fragmentai. PGR su pradmenimis 38 ir 39 bei 40 ir 41	Fagas T4K10	T4 PNK, KpnI

Plazmidėse įterptų DNR sekos buvo nustatytos VU Biotechnologijos Instituto sekvenavimo centre.

## 2.1.2. Terpės ir buferiniai tirpalai

5 lentelė. Darbe naudotos terpės ir buferiniai tirpalai.

Pavadinimas	Sudėtis	Paskirtis
Agarizuota LB terpė	Bakto-triptonas 10 g, bakto-mielių ekstraktas 5 g, NaCl 10g, agaras 12g, vanduo – iki 1 litro	<i>E. coli</i> auginimui (Sambrook ir kt., 1989)
Minkštas agaras (0,6 %)	bakto-triptonas 0,75 g, bakto-mielių ekstraktas 0,37 g, NaCl 0,75 g, NaOH 1N 0,15 ml, agaras 0,45 g, vanduo – iki 75 ml	Fagų dauginimui ir titravimui
TAE (tris-acetatinis) buferis	40 mM tris-acetatas, 2 mM EDTA	DNR elektroforezei agaroziniame gelyje (Maniatis ir kt., 1982)
TBE (tris-boratinis) buferis	89 mM tris-boratas, 2 mM EDTA	DNR elektroforezei poliakrilamidiniame gelyje (Sambrook ir kt., 1989)
I tirpalas	50 mM gliukozė, 25 mM tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)	DNR skyrimui
II tirpalas	0,2 N NaOH, 10 % natrio dodecilsulfatas (SDS)	DNR skyrimui
III tirpalas	3 M natrio acetatas (pH 4,8)	DNR skyrimui
PB (praskiedimo buferis)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 7 g/l, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 3 g/l, NaCl 4 g/l, MgSO <sub>4</sub> 7×H <sub>2</sub> O - 0, 2 g/l	Bakteriofagų saugojimui (Clowes ir Hayes, 1970)
DNR mėginių dažas	0,25 % bromfenolio mėlynojo ir 40 % sacharozės vandeninis tirpalas (6×)	DNR mėginių analizei agaroziniame gelyje (Maniatis ir kt., 1982)
Galutinis baltymų pavyzdžio buferis FSB	0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % SDS, 1 % 2-merkaptoetanolio, 10 % glicerolis, 0,01 % bromfenolio mėlynasis tirpalas	Baltymų analizei poliakrilamidiniame gelyje
PNK buferis	0,2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM β-merkaptoetanolis	Buferis PNK gryninimui
RnaG buferis	20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM NaCl	Buferis RnaG gryninimui
10-5 % A/B sacharozės tirpalas	9,73 g akrilamido, 5,0 g sacharozės, 0,27 g bisakrilamido, vandens – iki 73 ml	Baltymų elektroforezei
17,5-20 % A/B sacharozės tirpalas	17,5 g akrilamido, 20 g sacharozės, 0,48 g bisakrilamido, vandens – iki 73 ml	Baltymų elektroforezei
PNK saugojimo buferis	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT ir 50 % (v/v) glicerolio	Išskirtų rekombinantinių PNK baltymų saugojimui
0,5 M Tris-HCl	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Baltymų elektroforezei
1,5 M Tris-HCl	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	Baltymų elektroforezei
Baltymų elektroforezės buferis	6,06g Tris, 28,84 g glicino, 2 g SDS, vandens – iki 2 L	Baltymų elektroforezei

Pavadinimas	Sudėtis	Paskirtis
Baltyminio dažo atplaunamasis tirpalas	50 ml metanolio, 70 ml acto rūgšties, vandens – iki 1 L	Baltymų elektroforezei
A/B tirpalas	30 g akrilamido, 0,8 g bisakrilamido, vandens – iki 100 ml	Baltymų elektroforezei
STOP tirpalas	95 % formamido, 0,1 % bromfenolio mėlynojo, 0,1 % ksileno cianolio, 20 mM EDTA (pH 8,0)	DNR/RNR mėginių analizei poliakrilamidiniame gelyje

### 2.1.3. Reagentai

Darbe naudoti reagentai: acto rūgštis, amonio persulfatas, agarozė, akrilamidas, ampicilinas, chloroformas, chloramfenikolis, etanolis, etidiumbromidas, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), fenolis, formamidas, izopropil-1-tio-β-D-galaktopiranozidas (IPTG), glicinas, glicerolis, karbamidas, kalio chloridas, N,N'-metilenbisakrilamidas, magnio sulfatas, merkaptoetanolis, metanolis, natrio acetatas, natrio chloridas, natrio dodecilsulfatas (SDS), rifampicinas, N,N,N',N' – tetrametilendiaminas (TEMED), sacharozė, tetraciklinas.

Naudotas radioaktyvus junginys - [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (PerkinElmer).

Naudoti baltymai ir fermentai (Thermo Scientific, Vilnius): jaučio serumo albuminas (BSA), *Taq* DNR polimerazė, Reader™ *Taq* DNR polimerazė, *pfu* DNR polimerazė, restrikcijos endonukleazės: HindIII, Ecl136II, EcoRI, KpnI, NdeI, BamHI, NotI, XhoI, Eco881, DraIII, PaeI, ScaI, PshAI, T4 polinukleotidkinazė, AMV atvirkštinė transkriptazė, T4 DNR ligazė, DNazėI.

Darbe naudoti rinkiniai:

- Thermo Scientific, Vilnius: DNR skyrimo iš agarozinio gelio rinkinys Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, baltymų dažymo rinkinys Page Blue Protein Staining Solution, baltymų koncentracijos įvertinimo rinkinys Protein Standart Sets.
- Zymo Research: plazmidžių skyrimo rinkinys ZR Plasmid Miniprep™ – Classic, baltymų skyrimo rinkinys His-Spin Protein Miniprep, RNR skyrimo rinkinys ZR RNA Mini Prep™.



- Bioline Reagents: kiekybinio tikro laiko PGR (kPGR) rinkinys  
Sensi Mix Probe One-Step.

**6 lentelė. Darbe naudoti sintetiniai DNR oligonukleotidai.**

Eilės nr.	Pradmuo	Oligonukleotidų seka
1.	T4_pseT.1_EcoRI_F	5'-GACCTACATGATTGAATTCAATCATTAG-3'
2.	T4_cd.5_HindIII_R1	5'-ACAATAGCCCAAGCTTTCATGGTG-3'
3.	T4_cd.4_KpnI_R1	5'-CTTCCGTCAACAATAGGTACCATAGAC-3'
4.	T4pseT_NdeI_F	5'-CAATCATTAGTTGAGAAAAACATATGAAAAAAG-3'
5.	T4pseT_BamHI_R	5'-GATTTTTAATGGCTTGGATCCATGAAACTTG-3'
6.	T4_modA_F1	5'-TTGAGGTAGTTGAATGAAATAC-3'
7.	T4_modA_HindIII_R1	5'-GGTATAATGAATCTAAGCTTCCATTATAG-3'
8.	EF_F	5'-GCGTCAAATGTTATCGGATCC-3'
9.	EF_R	5'-GCATTCAACAAAGTCGGGCATA-3'
10.	T4g39_eR2	5'-GCCACTACGCTTTTTGATATG-3'
11.	T4g39_kF1	5'-GCTGTTCTTTAAGGATTCAACTATTC-3'
12.	T4g39_kR1	5'-GAATACCTTCATCTACTCGAGTTATCG-3'
13.	motB_F	5'-CTTTTTAACAAGTGAGAGATAACTATG-3'
14.	motB_R	5'-AGACTTTCATCTTTAGGAATGATAC-3'
15.	nrdC.3_F	5'-ACCAAGTGAGAAGAACATGAAAACCTC-3'
16.	nrdC.3_R1	5'-ACCAAGAGAATGTGAATACGCATTTTG-3'
17.	g39_F	5'-TTCCCGAAACCAAACGAGGATAAG-3'
18.	g39_R	5'-AGCTTAACAAGACCAGGTACATACTG-3'
19.	55.2(D)	5'-CGCAATGATGTACGAAGGCT-3'
20.	55.2(R)	5'-GAGGAGTTACAATATCGCCTT-3'
21.	nrdC.3(D)	5'-CGTCTAGAACAAGCTTTGCAG-3'
22.	nrdC.3(R)	5'-GTCCTTTCTGATAATCACGATG-3'
23.	motB(XhoI)	5'-CTCTTGGGACTCGAGTATAATGGTC-3'
24.	motB(R1)	5'-GACCAATTTTCTGCTGCTTTAGAACG-3'
25.	ndd(R)	5'-GTTCTAAAACCATTCCACCACC-3'
26.	43(R)	5'-GATATTCTACTTCACGGGTACGTTCC-3'
27.	cef(R2)	5'-AATTGAACAGTGGAGCGATACG-3'
28.	39(R3)	5'-GAGCCAATGTACATGCCACTAC-3'
29.	T4segDR	5'-GTCAAGAGTAGCATGAGCTCCGATG-3'
30.	T4vs.4R	5'-GTCCTAAACGAACCTCAGCG-3'
31.	T7prom.	5'-AATACGACTCACTATAGG-3'
32.	T7 term.	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
33.	T4e.4R	5'-GGAAGGTATAGTGATGGCTTTGAC-3'
34.	T4rnhPeR	5'-GCAGCTGGAAATGACATCACG-3'
35.	T4dexA2R2	5'-GGAGCATTACTGCGTTTAACTTCTG-3'
36.	EcoG_NdeI_F	5'-CGTGAGAAAAGGGATACATATGACG-3'
37.	EcoG_BamHI_R	5'-GGATGGCGGATCCAGCATCTGTTTAC-3'
38.	T4pseT.1_F1	5'-TCATGGCATCAATTTGAACATC-3'
39.	T4pseTdR1	5'-GTAGGTCTTTAGATGCTTTAC-3'
40.	T4pseTdf1	5'-GCTTCGGGAGATTTTTAATGG-3'
41.	T4cd.4_Kpn_R1	5'-CTTCCGTCAATAGGTACCATAGAC-3'

**7 lentelė. Darbe naudoti sintetiniai oligonukleotidai kPGR.**

Oligonukleotidas	Oligonukleotidų seka
nrdC.3	5'-ACATCGTGATTATCAGAAAGGACATAGAGA-3'
motB	5'-TCTAAAGCAGCAGGAAAATTGGTCGAAGT-3'
g39	5'-AGCGATATTGAACATATCAAAAAGCGTAGTGGCA-3'

## **2.2. Metodai**

### **2.2.1. Bakteriofagų padauginimas**

Fagų padauginimas buvo atliekamas dvisluoksnio agarų metodu (Adams, 1951). Įmama 0,5 ml bakterijų ląstelių kultūros ( $OD_{600} = 0,8$ ) ir 0,1 ml fagų lizės zonos suspensijos sumaišomi su 2,5 ml išlydytos ( $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 0,6 % LB agarizuotos terpės, mišinys užpilamas ant 1,2 % agarizuotos terpės Petri lėkštelėje. Inkubuojama  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  per naktį. Fagų kolonijos išsiskiria skaidrių zonų pavidalu neskaidriame bakteriniame sluoksnyje. Viršutinis sluoksnis nuimamas ir suspenduojamas į praskiedimo buferį (PB). Vienos lėkštelės viršutinis sluoksnis suspenduojamas į 3 ml PB ir pridedama 1/10 dalis chloroformo. Suspensija laikoma  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 val. Po valandos centrifuguojama 5000 aps/min greičiu 20 min. Supernatantas nusiurbiamas, į jį dedama DNazės I (3 u) ir inkubuojama  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min. Centrifuguojama 14000 aps/min greičiu 1 val. Susidariusias nuosėdas užpilame 100  $\mu\text{l}$  PB ir laikome  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  per naktį. Tirpalas suspenduojamas ir yra nustatomas fagų titras.

### **2.2.2. Fagų titro nustatymas**

Titrui nustatyti, į 2,5 ml ( $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 0,6 % agarizuotos LB terpės fagams dedama 0,5 ml *E. coli* ( $OD_{600} = 0,8$ ) bakterijų kultūros LB terpėje, 0,2 ml skirtingų skiedimų fagų suspensijos ir gerai išmaišoma. Mišinys tolygiai paskleidžiamas ant 1,2 % agarizuotos LB terpės paviršiaus Petri lėkštelėje. Lėkštelės inkubuojamos 18 val.  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  arba  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Titrą, įvertinus praskiedimą, apskaičiuojamas pagal fagų kolonijų skaičių ant

bakterijų sluoksnio (Clowes ir Hayes, 1968).

### **2.2.3. DNR amplifikavimas *in vitro* PGR metodu**

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) atlikta pagal Saiki ir bendraautorių metodiką (1989), naudojant sintetinius oligodeoksiribonukleotidinius pradmenis ir *Taq* DNR polimerazę. Kaip DNR matrica buvo naudota plazmidinė arba genominė DNR. Reakcijos mišinys: fagų suspensija arba DNR suspensija (1µg), tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys (kiekvieno po 100 pmol), 10 µl buferinio tirpalo (10×) *Taq* DNR polimerazei, 10 µl 2 mM dNTP mišinio, 16 µl 0,25 mM MgCl<sub>2</sub>, vandens iki 100 µl. Į mišinį pridedama 0,5 µl (2,5 u) *Taq* DNR polimerazės. 30 reakcijos ciklą atliekama pagal standartinę schemą (30 s – 95 °C, 1 min – 45 °C, 2,5 min – 72 °C) arba reakcijos sąlygos modifikuojamos atsižvelgiant į pradmenų lydimosi temperatūrą ir amplifikuojamo fragmento ilgį. Pasibaigus reakcijai, mišinys yra atšaldomas, išvalomas fenolio-chloroformo mišiniu (1:1) ir išsodinamas pridedant 1/10 dalį 5 M NaCl ir 2 dalis 96 % etanolio.

PGR reakcijai atlikti taip pat buvo naudojama *Pfu* DNR polimerazė ir jai specifinis buferis (Thermo Scientific, Vilnius), naudojant pritaikytą metodiką pagal gamintojų rekomendacijas.

### **2.2.4. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje**

Elektroforezė agaroziniame gelyje yra skirta DNR fragmentams atskirti, nustatyti jų dydį, išgryninti ir įvertinti koncentraciją. Elektroforezei buvo naudojami 0,8-1,6 % agaroziniai geliai. Elektroforezė vykdyta TAE buferyje, turinčiame 0,5 µg/ml etidžio bromido, esant 80-130 V įtampai, naudojant horizontalų firmos "Pharmacia" gel-elektroforezės aparatą "GNA-100". Elektroforetiniai vaizdai buvo stebimi naudojant ultravioletinės šviesos transliuinatorių.

DNR fragmentai iš gelio buvo gryninami naudojant DNR išskyrimo

rinkinį (Thermo Scientific, Vilnius) pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

### **2.2.5. Bendrosios ląstelės RNR išskyrimas**

Bendroji ląstelių RNR buvo skiriama pagal modifikuotą Uzan ir bendraautorių metodiką (Uzan ir kt., 1988). *E. coli* B<sup>E</sup> (sup<sup>0</sup>) arba C41(DE3) ląstelių kultūra auginama LB terpėje 30 °C temperatūroje iki 2×10<sup>8</sup> ląst./ml. Kultūra užkrečiama atitinkamais bakteriofagais (MOI 10) arba pridedant IPTG (iki 1 mM) indukuojama klonuoto geno raiška. Reikiamu metu po infekcijos arba indukcijos, 3 ml kultūros sumaišomi su 3 ml lizės buferio (4 mM EDTA (pH 8,0), 2 % SDS). Kaitinama verdančiam vandenyje 5 min, kol tirpalas nuskaidrėja. Pridedama 6 ml fenolio, prisotinto 0,2 M natrio acetato tirpalu (pH 4,8), ir RNR ekstrahuojama 20 °C temperatūroje. Ekstrakcija 2 kartus pakartojama fenolio-chloroformo mišiniu (1:1), centrifuguojama 10 min (9000 aps/min). Iš vandeninės frakcijos RNR išsodinama 1/10 tūrio dalimi 5 M NaCl ir 2,5 tūrio 96 % etanolio, 2 val. laikoma – 20 °C temperatūroje. Centrifuguojama 20 min (14000 aps/min) 4 °C temperatūroje. Nuosėdos praplaunamos 70 % etanolio, ištirpinamos 400 µl dejonizuoto vandens ir išsodinimas pakartojamas mažesniame kiekyje. Nucentrifugavus RNR, nuosėdos suspenduojamos į 20 µl DEPC paveikto dejonizuoto vandens. RNR kiekis bei švarumas įvertinamas spektrofotometrijos būdu, matuojant absorbciją UV šviesoje, esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiams.

### **2.2.6. DNR pradmens žymėjimas**

Oligodeoksiribonukleotidinio pradmens 5' galinis nukleotidas buvo žymimas naudojant [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP ir T4 PNK, pagal gamintojų rekomendacijas. Po žymėjimo, reakcijos pradmuo išsodinamas pridedant 1/5 dalį 5 M amonio acetato ir 2,5 tūrio 96 % etanolio. Laikoma iki 24 val. -70 °C temperatūroje, po to centrifuguojama 14000 aps/min greičiu 30 min. 5 °C temperatūroje. Nuosėdos praplaunamos 70 % etanolio ir suspenduojamos iki 1 pmol/µl

koncentracijos DEPC paveiktame vandenyje.

### **2.2.7. DNR elektroforezė denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje**

Denatūruojantys poliakrilamidiniai geliai naudoti DNR fragmentų frakcionavimui. Elektroforezė vykdyta 6 % poliakrilamidiniame gelyje 8 M karbamido denatūruojančiomis sąlygomis. Darbe naudotas firmos "LKB" vertikalus aparatas. Elektroforezė vyko buferiniame tirpale TBE, pH 8,3, esant 1500-2500 V įtampai 4-6 val. Gelis ruošiamas stiklų sustūmimo metodu, suformuojant gelio storio gradientą: viršuje - 0,1-0,2 mm, apačioje - 0,4 mm. Gelio ilgis - 55 cm. Po elektroforezės viršutinis stiklas su geliu nuimamas ir gelis fiksuojamas 10 % acto rūgšties, 10 % metanolio tirpale 20 min., po to plaunamas 5 min, vandens srove ir išdžiovinamas 90-100 °C temperatūroje. Rezultatai vizualizuoti naudojant Fujifilm FLA5100 Phosphorimager įrangą.

### **2.2.8. mRNR nukleotidų sekos nustatymas**

mRNR nukleotidų seka buvo nustatoma dideoksiterminacijos metodu (Sanger ir kt., 1977), naudojant <sup>32</sup>P 5' gale žymėtus DNR pradmenis, AMV atvirkštinę transkriptazę (AMV AT) ir dNTP-ddNTP mišinius santykiu 5:1. Reakcijai imama 50-100 µg bendrosios ląstelinės RNR, kuri hibridizuojama su 2 pmol žymėto pradmens 10 µl tūryje AMV AT buferyje 60 °C temperatūroje 3-4 min, tada staigiai atšaldoma -70 °C temperatūros etanolyje. Lėtai atšildžius pridedama 1 µl (5u) atvirkštinės transkriptazės ir mišinys išdalinamas po 2,5 µl į 4 mėgintuvėlius su 2,5 µl dNTP-ddNTP mišinio AMV AT buferyje. Reakcija vykdoma 48 °C temperatūroje 20 min, po to pridedama 5 µl STOP tirpalo. Reakcijos mišinys frakcionuojamas 6 % poliakrilamidiniame gelyje 8 M karbamido denatūruojančiomis sąlygomis. Rezultatai vizualizuoti naudojant Fujifilm FLA5100 Phosphorimager įrangą.

### **2.2.9. mRNR 5' galinio nukleotido nustatymas**

mRNR 5' galinis nukleotidas buvo nustatomas žymėto pradmens ilginimo metodu pagal modifikuotą Uzan ir bendraautorių metodiką (Uzan ir kt., 1988). Reakcijai imama 10 µg bendrosios RNR, išskirtos iš ląstelių, turinčių rekombinantinę plazmidę, po indukcijos su IPTG arba po infekcijos atitinkamu bakteriofagu. RNR hibridizuojama su 1 pmol <sup>32</sup>P 5' gale pažymėto DNR pradmens, komplementaraus tam tikro geno mRNR, AMV AT buferyje. Hibridizacija vykdoma 60 °C temperatūroje 3-4 min ir staigiai atšaldoma -70 °C etanolyje. Lėtai atšildžius pridedami 5 µl visų dNTP mišinio. Reakcija vykdoma 48 °C temperatūroje 20 min, po to pridedama 5 µl STOP tirpalo. Reakcijos mišinys denatūruojamas 3 min 95 °C temperatūroje ir frakcionuojamas 6 % poliakrilamidiniame gelyje 8 M karbamido denatūruojančiomis sąlygomis TBE buferyje. Rezultatai vizualizuojami naudojant Fujifilm FLA5100 phosphorimager įrangą.

### **2.2.10. Plazmidinės DNR išskyrimas iš *E. coli* ląstelių**

Plazmidinė DNR skiriama šarminės lizės metodu (Maniatis ir kt., 1982). Plazmidinės DNR išskyrimui auginama 2-10 ml naktinės transformuotų *E. coli* ląstelių kultūros LB terpėje, kurioje yra reikiamas antibiotikas. Kitą dieną, 1,5 ml kultūros centrifuguojama mikrocentrifugoje 1 min 12000 aps/min greičiu. Nuosėdos suspenduojamos į 100 µl I tirpalo ir iš karto pridedama 200 µl II tirpalo. Po 2 min pridedama 150 µl III tirpalo (tirpalų sudėtys yra pateiktos medžiagų aprašyme skyrelis 2.1.2.), palaikoma lede dar 2 min ir lizatas 5 min centrifuguojamas mikrocentrifugoje. Supernatantas deproteinizuojamas vieną kartą fenolio-chloroformo (1:1) mišiniu. 5 min centrifuguojama mikrocentrifugoje. Supernatante esanti plazmidinė DNR išsodinama pridedant 2 tūrius etilo spirito. DNR surenkama centrifuguojant 10 min. Nuosėdos suspenduojamos vandenyje (iki 20 µl), pridedama 5 µg RNazės A ir laikoma 30 min 37 °C temperatūroje. Plazmidinė DNR išsodinama pridedant 2 tūrius etilo

spirito ir 0,1 tūrio 5 M NaCl. DNR surenkama centrifuguojant 10 min 12000 aps/min. Praplaunama 70 % etilo spiritu. Dar kartą nucentrifuguojama 1 min 1200 aps/min. Gauta nuosėda ištirpinama 10-20 µl vandens. Tokia DNR yra paruošta restrikcinei analizei, elektroforezei arba transformacijai.

Plazmidės, į kurias įterpti tiksliniai genai, DNR sekų nustatymui gryninamos naudojant plazmidžių išskyrimo rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas (Zymo Research).

### **2.2.11. DNR fragmentų hidrolizė restrikcijos endoribonukleazėmis ir DNR galų bukinimas**

DNR fragmentai buvo hidrolizuojami specifinėmis restrikcijos endonukleazėmis pagal gamintojų rekomendacijas. Parenkami specifiniai restrikcijos buferiai atsižvelgiant į naudojamą fermentą. Reakcija vykdoma 37 °C, praėjus 1 val. į reakcijos mišinį įdedamas papildomas kiekis restrikcijos nukleazės. Restrikcija vykdoma dar 1 val.

DNR galai buvo bukinami naudojant fago T4 DNR polimerazę. Mišinio sudėtis (20 µl): DNR ~1 µg, 2 mM dNTP – 1 µl, T4 DNR polimerazė –1 u 1× buferyje. Mišinys laikomas 5 min. kambario temperatūroje, tada reakcija stabdoma inkubuojant 20 min 75 °C.

### **2.2.12. DNR fragmentų ligavimas**

Ligavimo reakcija atliekama sumaišant atitinkamomis restriktazėmis paveiktus ir iš gelio išgrynintus plazmidinio vektoriaus ir įterpiamos DNR fragmentus (1:2) 1× ligazės buferyje ir pridedant 1-2 u fago T4 DNR ligazės į 10-20 µl mišinio. Reakcija vykdoma 1-2 val 22 °C temperatūroje. Po to ligavimo mišinys naudojamas *E. coli* ląstelių transformacijai.

### **2.2.13. *E. coli* ląstelių transformacija**

Imliosios *E. coli* ląstelės buvo ruošiamos naudojant 0,1 M CaCl<sub>2</sub> tirpalą pagal Maniatis ir bendraautorių metodiką (1982). Rekombinantiniams klonams su sukonstruotomis plazmidėmis gauti, į 100 µl kompetentinių ląstelių, pagamintų iš *E. coli* C41(DE3) arba DH5α kamieno, suspensijos įdedama 1 µl plazmidinės DNR arba 10-20 µl ligavimo mišinio, sumaišoma ir 20 min inkubuojama ledo vonelėje; po to atliekamas temperatūrinis šokas – transformacijos mišinys perkeliamas 2 min į 42 °C temperatūrą. Po to mišinys gražinamas 1-2 min į ledo vonelę ir išsėjamas paskleidžiant ant agarizuotos terpės, turinčios antibiotiko (priklausomai nuo plazmidiniuose vektoriuose koduojamo atsparumo konkrečiam antibiotikui). Lėkštelės inkubuojamos per naktį reikiamoje temperatūroje.

### **2.2.14. Rekombinantinių baltymų indukcija**

*E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelių kultūra su transformuotomis tikslinėmis plazmidėmis auginama skystoje LB terpėje su reikiamu antibiotiku esant 37 °C temperatūrai. Pasiekus OD<sub>600</sub> = 0,6 kultūra indukuojama 1 mM IPTG. Kultūros mėginiai imami kas valandą nuo indukcijos pradžios. Surinktos ląstelės suspenduojamos galutinio pavyzdžio buferiniame tirpale (FSB) ir mėginiai analizuojami natrio dodecilsulfato denatūruojančios poliakrilamidinio gelio elektroforezės (NDS-PAGE) metodu. Dažoma Page Blue Protein Staining Solution baltymų dažymo tirpalu pagal gamintojo rekomendacijas.

### **2.2.15. Rekombinantinių baltymų modifikavimo tyrimas**

*E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės, transformuotos tikslinėmis plazmidėmis, koduojančiomis su His inkaru sulietus baltymus, auginamos skystoje LB terpėje su reikiamu antibiotiku esant 37 °C temperatūrai. Pasiekus OD<sub>600</sub> = 0,3 kultūra indukuojama 1 mM IPTG. Po valandos pusė kultūros



infekuojama fagu T4 (MOI 10), o kita pusė paliekama neinfekuota. Kultūrų mėginiai surenkami po 10 min. Surinktos ląstelės suspenduojamos 1 ml His surišimo buferyje. Ląstelių ardymas ultragarsu vykdomas Bandelin Sonopuls HD 2070 aparatu: 30 % galingumas, 30 s pulsas, 30 s pauzė, 6-8 ciklai. Po ląstelių suardymo gauta suspensija centrifuguojama 20 min 14000 aps/min. Surinkta tirpi frakcija naudojama His inkarą turinčių baltymų išskyrimui. Baltymai skiriami naudojant His surišančias kolonėles (His-Spin Protein Miniprep, Zymo Research) pagal gamintojų rekomendacijas. Išskirti baltymai suspenduojami į galutinio pavyzdžio (FSB) buferinį tirpalą ir tiriama elektroforezės gradientiniame 10%/5% ir 17,5%/20% poliakrilamido-sacharozės gelyje būdu, denatūruojančiomis sąlygomis.

#### **2.2.16. Fago T4 *pseT* mutantų konstravimas**

Geno *pseT* mutacijų atstatymas fago genome bei delecinių *pseT* mutantų konstravimas buvo atliekamas naudojant I/S sistemą, pagal modifikuotą Kreuzer ir Selick metodiką (Selick ir kt., 1988; Selick ir Kreuzer, 1994). I/S sistemos plazmidėje pBSPLO+, turinčioje *supF* geną, sukonstruotos *pseT* geno delecijos arba *pseT* geno mutacijos buvo pervestos į specialaus įterpimo/pakeitimo sistemos fago - *amber* mutanto T4K10 genomą homologinės rekombinacijos būdu.

*E. coli* MH1 kamieno imliosios ląstelės buvo transformuotos gautomis rekombinantinėmis plazmidėmis. Plazmidės turinčios MH1 ląstelės buvo auginamos LB terpėje su ampicilinu (40 µg/ml) 37 °C aeruojant iki OD<sub>600</sub> = 0.8 ir infekuojamos fagu T4K10 (MOI 3). Kultūros po infekcijos inkubuojamos tomis pačiomis sąlygomis dar 2 val. ir lizuojamos 1/10 dalimi chloroformo. Palaikius lizatus 10-15 min lede, jie praskiedžiami LB terpėje 10<sup>5</sup> – 10<sup>8</sup> kartų ir po 100µl išsėjama dvisluoksnio agaru metodu ant supresuojančio CR63 arba nesupresuojančio B<sup>E</sup>\_B<sup>S</sup> *E. coli* kamienų. Petri lėkštelės inkubuojamos per naktį 37 °C temperatūroje. Fagai-integrantai, surenkami iš kelių lizės zonų ir naudojami supresuojančio CR63 kamieno ląstelių infekcijai. Infekuotos

kultūros auginamos 37 °C temperatūroje aeruojant 1-2 val. Lizavus kultūras 1/10 dalimi chloroformo ir praskiedus jas  $10^{-7}$  –  $10^{-8}$  kartų, mėginiai išsėjami ant supresuojančių kamienų. Po inkubacijos 37 °C temperatūroje, per naktį susiformavusios atskiros fagų lizės zonos suspenduojamos į 10 µl LB terpės ir po 5 µl suspensijų išlašinama tiek ant supresuojančių, tiek ir ant nesupresuojančių ląstelių ir lėkštelės vėl inkubuojamos 37°C temperatūroje per naktį. Reikiamos delecijos arba mutacijos buvimas patikrinamas atliekant PGR nuo fagų lizės zonų suspensijų naudojant atitinkamą geną supančioms T4 DNR sekoms specifinius pradmenis.

### **2.2.17. kPGR**

#### RNR skyrimas ir gryninimas

*E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės buvo auginamos LB terpėje 30 °C iki  $OD_{600} = 0,8$  ir infekuojamos bakteriofagais T4K10PNK arba T4K10ΔPNK (MOI 10). Pirmas mėginys – 500 µl kultūros – buvo paimtas 5 min po infekcijos (0 min pavyzdys), tada į terpę dedamas rifampicinas (12 µg/ml). Kiti mėginiai buvo imami 3, 5, 7, 10 ir 20 min po rifampicino įdėjimo. Toliau mėginiai buvo dedami į rinkinio lizės buferį ir bendroji ląstelės RNR buvo skiriama naudojant ZR RNA MiniPrep™ (Zymo Research) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Likusi genomine DNR iš RNR mėginių buvo pašalinta inkubuojant RNR mėginius su 0,1 u/µl DNaze I 10× reakcijos buferyje su 25 mM MgCl<sub>2</sub> 30 min 37 °C temperatūroje, po to reakcija buvo stabdoma 50 mM EDTA ir inkubuojama 10 min 75 °C. RNR koncentracija bei švarumas įvertinamas spektrofotometrijos būdu, matuojant absorbciją UV šviesoje, esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiams.

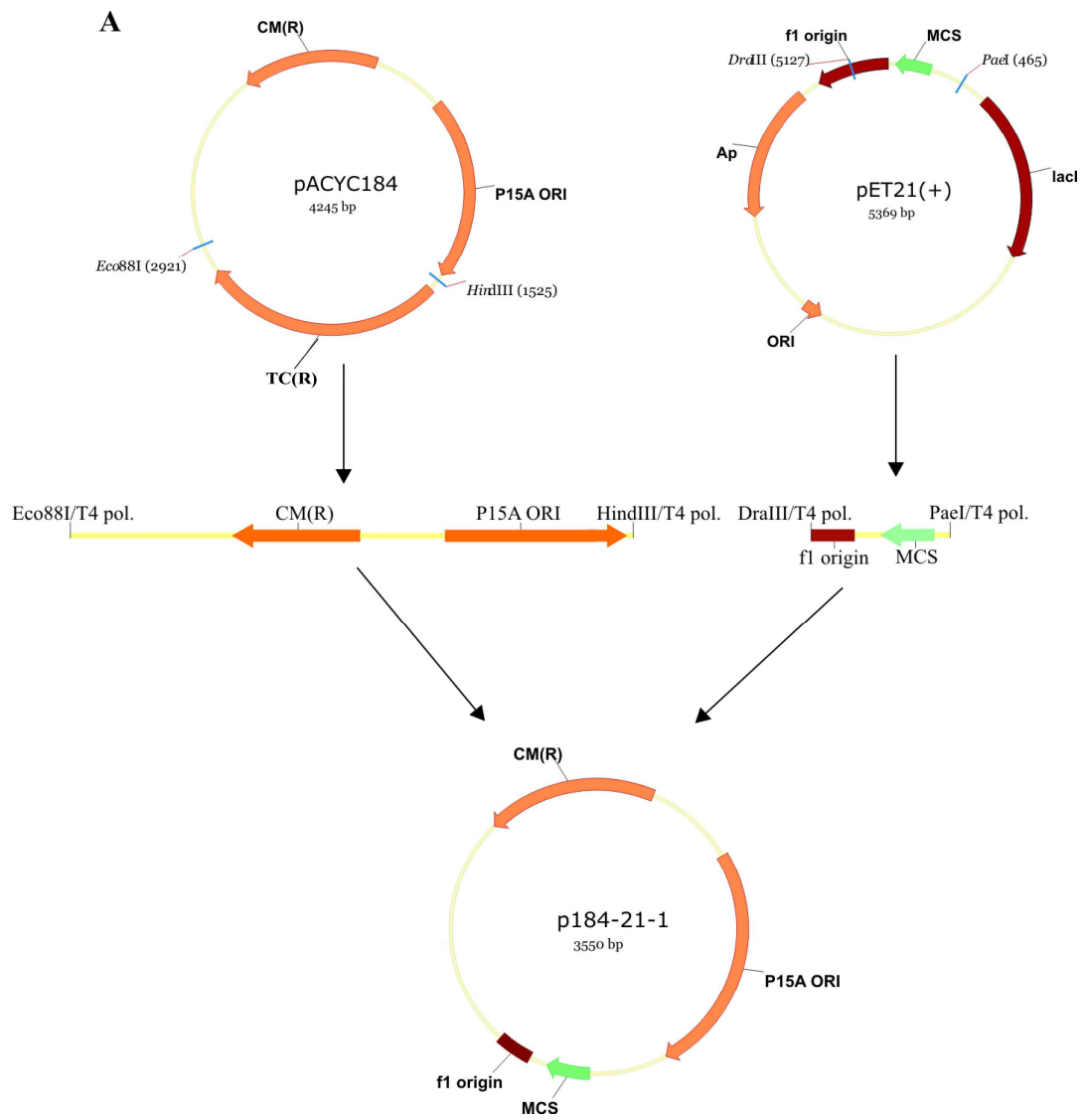
#### kPGR

Vieno žingsnio kPGR reakcija buvo vykdoma naudojant SensiMix Probe

One-Step rinkinį (Bioline Reagents) pagal gamintojų rekomendacijas, naudojant ciklerį Rotor-Gene 6000 5-plex HRM. Reakcijos mišinys: 2 µg RNR (2 µl), tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinys (1:1) (0,3 µg), SensiMix Probe One step (7,5 µl), 0,2 u/µl RNazės inhibitorius, DEPC H<sub>2</sub>O – iki 15 µl. AT žingsnis buvo atliekamas inkubuojant reakcijos mišinį 30 min 42 °C temperatūroje. PGR buvo vykdomas pagal schemą: pradinė denatūracija buvo vykdoma 95 °C 10 min, toliau 30 reakcijos ciklų atliekama 95 °C – 5 s ir 60 °C – 50 s. kPGR reakcija buvo atliekama keturis kartus (naudojant RNR išskirtą skirtingų keturių eksperimentų metu), esant trigubam pakartojimui. Kiekvienam transkriptui buvo parinkta neigiama kontrolė, turinti visus reakcijos komponentus išskyrus matricą. Gauti duomenys buvo analizuojami naudojant Rotor-Gene 1.7.87 programinę įrangą.

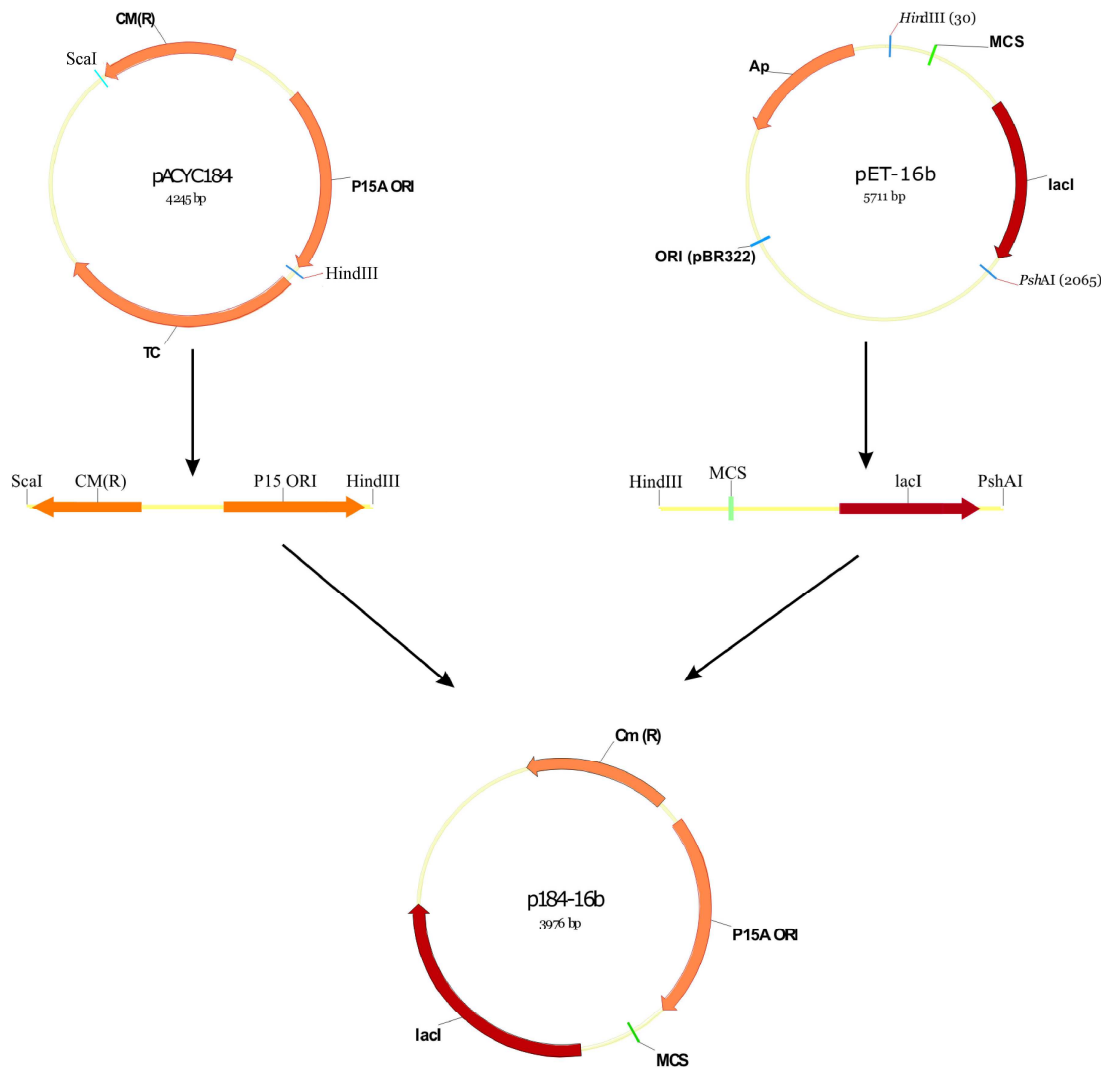
#### **2.2.18. Plazmidinių vektorių p184-21-1 ir p184-16b konstravimas**

Plazmidinis vektorius p184-21-1 buvo sukonstruotas plazmidžių pET21(+) ir pACYC184 pagrindu. Plazmidinis vektorius pACYC184 buvo kirptas restrikcijos endonukleazėmis Eco881 ir HindIII, bukintas T4 DNR polimeraze ir defosforilintas veršiukų žarnų šarmine fosfataze (CIAP). Plazmidinis vektorius pET21(+) buvo hidrolizuotas REazėmis DraIII ir PaeI ir bukintas T4 DNR polimeraze. Gauti fragmentai buvo gryninami iš agarozės gelio ir liguojami bukais galais (11 pav. A). Įterptų fragmentų įsiterpimo kryptis buvo tikrinama hidrolizuojant gautą konstruklą specifinėmis REazėmis bei PGR metodu (su specifiniais prie atitinkamos pET21(+) srities hibridizuojančiais pradmenimis).



**Plazmidinių vektorių A) p184-21-1 ir B) p184-16b konstravimo schemas**

Plazmidinis vektorius p184-16b buvo sukonstruotas plazmidžių pET16b ir pACYC184 pagrindu. Plazmidinis vektorius pACYC184 buvo kirptas REazėmis ScaI ir HindIII, o pET16b su HindIII ir PshAI. Gauti fragmentai buvo gryninami iš agarozės gelio ir liguojami (11 pav. B). Gauti konstruktai patikrinti PGR metodu.



11 pav. Plazmidinių vektorių A) p184-21-1 ir B) p184-16b konstravimo schemas

### 2.2.19. Genų koekspresija dviplazmidinėse sistemose

Koeskspresija buvo vykdoma nuo dviejų skirtingų rekombinantinių plazmidžių. Tiksliniai genai buvo įterpiami į ekspresijos vektorius pET21+ arba pET16b bei į su pET ekspresijos vektoriais suderinamas plazmidės p128-21-1 arba p128-16b, turinčias skirtingus replikonus. Rekombinantinės plazmidės buvo transformuojamos į *E. coli* C41(DE3) kamieno ląsteles ir išsėjamos paskleidžiant ant agarizuotos terpės su dviem skirtingais antibiotikais – ampicilinu ir chloramfenikoliu. Lėkštelės inkubuojamos per naktį reikiamoje temperatūroje. Atsirinktos *E. coli* C41(DE3) kamieno

kolonijos su tikslinėmis plazmidėmis buvo suspenduotos LB terpėje su antibiotikais ir auginamos esant 37 °C temperatūrai. Pasiekus  $OD_{600} = 0,6$  genų ekspresija indukuojama tuo pačiu induktoriu IPTG. Po indukcijos iš ląstelių buvo skiriami baltymai arba RNR.

#### **2.2.20. Rekombinantinių T4 ir T4K10 PNK baltymų indukcija ir gryninimas**

Bakteriofagų T4 ir T4K10 *pseT* geno DNR fragmentai buvo įterpti į plazmidinio ekspresijos vektoriaus pET16b NdeI ir BamHI taikinius, geno *pseT* koduojamą baltymą N-gale suliejant su 10 histidinų. Buvo gautos rekombinantinės plazmidės p16b\_T4PNK ir p16b\_T4K10PNK.

Rekombinantinės plazmidės p16b\_T4PNK ir p16b\_T4K10PNK buvo transformuotos į *E. coli* C41(DE3) kamieno ląsteles. Po vieną ampicilinui atsparią *E. coli* koloniją buvo suspenduota į 40 ml skystos LB terpės, kurioje buvo 0,05 mg/ml ampicilino. Kultūros buvo auginamos 37 °C iki  $OD_{600} = 0,3$ . Toliau temperatūra buvo laipsniškai mažinama iki 17 °C, tada kultūra indukuojama 1 mM IPTG ir auginama 16 val. Ląstelių kultūros buvo surinktos, suspenduotos į his binding buferį ir lede suardytos ultragarsu. Baltymai skiriami naudojant His surišančias kolonėles (His-Spin Protein Miniprep, Zymo Research) pagal gamintojų rekomendacijas. Išskirti rekombinantiniai PNK baltymai buvo dializuoti prieš PNK saugojimo buferį. Išgrynintų baltymų koncentracijos buvo nustatytos Bredfordo metodu, kaip standartą naudojant jaučio kraujo serumo albuminą.

#### **2.2.21. Rekombinantinių T4 ir T4K10 PNK *in vitro* aktyvumo tyrimas**

Reakcijos mišinys (10  $\mu$ l): 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,1 mM spermidino, 25  $\mu$ M [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]ATP, 10 pmol sintetinio 5'-OH DNR oligonukleotido d(GTGCTCGATCCAATGCCAGTCAGGACAAGATT GCGTAGCTTCTG) ir 100, 75, 50, 25, 10 arba 5 ng fago T4 arba T4K10

rekombinantinės PNK buvo inkubuojami 5 min 37 °C temperatūroje. Reakcija buvo sustabdyta įdėjus 6 µl STOP tirpalo. Reakcijos produktai buvo išskirstyti poliakrilamidiniame gelyje (6 % akrilamido, 8 M UREA, TBE) ir Image Viewer FLA-5100 fosfoimager programinės įrangos pagalba buvo įvertinta, kiek skiriasi fago T4 ir T4K10 PNK aktyvumai.

### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

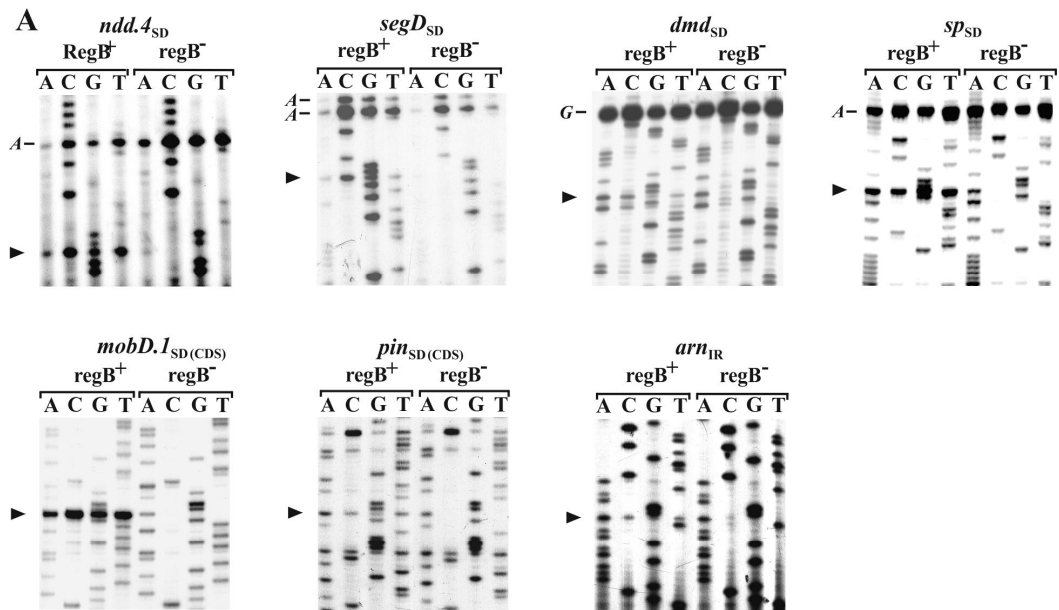
#### 3.1. Naujų RegB kirpimo taikinių paieška fago T4 transkriptuose

Bakteriofagui T4 infekavus *E. coli* ląstelę, fago koduojami produktai palaipsniui sustabdo visus joje vykstančius procesus, o ląstelės komponentus pajungia fago vystymuisi. Fagas T4 yra virulentinis virusas, kurio infekcinis ciklas, nuo patekimo į bakteriją-šeimininkę iki jos ląstelės lizės, optimaliomis sąlygomis trunka tik apie 30 min. Todėl jam yra svarbu greitai keisti genų raišką laike. Fago T4 transkripcijos reguliacija nuosekliai aktyvuojant ir išjungiant skirtingų klasių promotorius yra svarbi genų raiškai laike ir yra gana gerai ištirta. Tačiau ne mažiau svarbu yra laiku sintetinti ir reikalingus baltymus, o šiame procese svarbų vaidmenį vaidina jau nereikalingų mRNR degradacija. Manoma, kad fago T4 genų raiškos perjungimui iš ankstyvosios į viduriniąją stadiją yra svarbi jo koduojama endoribonukleazė RegB, kuri turi įtakos daugelio fago ankstyvųjų transkriptų stabilumui (Sanson ir kt., 2000). Tai reiškia, kad dauguma ankstyvųjų transkriptų turi šios nukleazės taikinius, o ties jais kirptų transkriptų degradaciją turėtų vykdyti kitos, greičiausiai *E. coli* nukleazės.

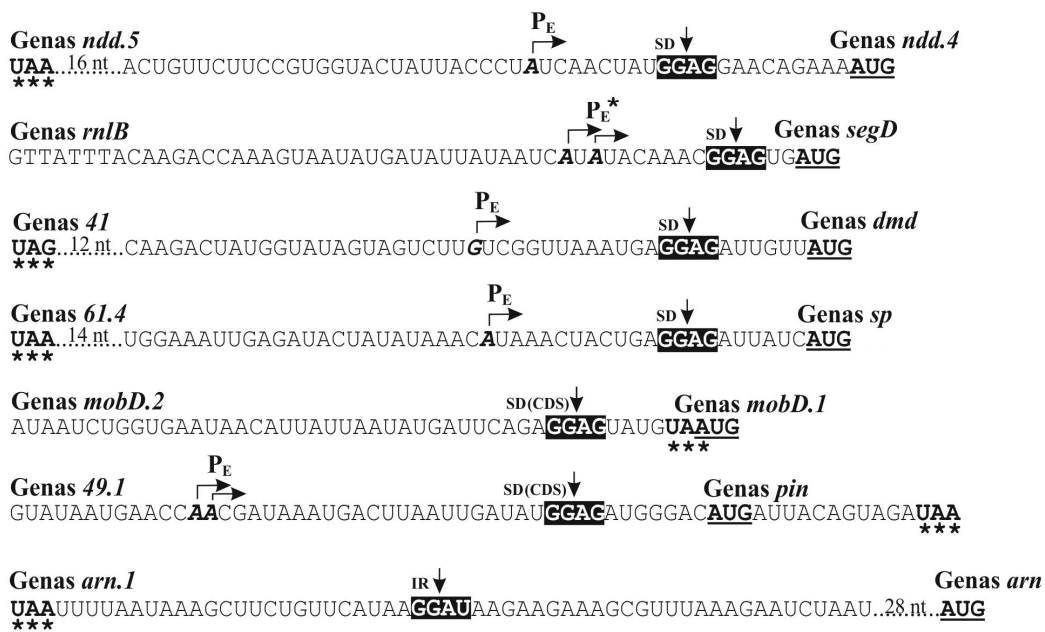
Siekiant geriau iširti šį genų raiškos reguliacijos etapą, pirmiausia buvo siekiama nustatyti naujus RegB taikinius ir bandyti išsiaiškinti mechanizmus, kaip RegB kirptos mRNR degraduojamos toliau. Tam tikslui buvo atlikta priešreplikacinių genomo sričių analizė ir numatyti potencialūs taikiniai, kuriuos galėtų hidrolizuoti endoribonukleazė RegB. Taikiniai patikrinti naudojant bendrąją ląstelės RNR, išskirtą iš *E. coli* B<sup>E</sup> kamieno ląstelių infekuotų bakteriofagais T4<sup>+</sup> arba T4regB<sup>-</sup> (T4regBL52). RNR buvo analizuojama nustatant jos sekas dideksiterminacijos metodu, naudojant komplementarius numatytoms mRNR sekoms P<sup>32</sup>-žymėtus pradmenis.

Tyrimų eigoje buvo nustatyti 7 nauji RegB taikiniai, kuriuos endoribonukleazė RegB hidrolizavo nevienodu efektyvumu (12 pav.).





## B



**12 pav. Naujų endoribonukleazės RegB taikinių nustatymas genų *ndd.4*, *segD*, *dmd*, *sp*, *mobD.1* ir *pin* transkriptų SD sekose bei tarpinėje srityje prieš geną *arn*. A) *E. coli* B<sup>E</sup> kamieno ląstelės buvo auginamos 30 °C, infekuojamos bakteriofagu T4<sup>+</sup> arba T4regB<sup>-</sup> ir po 4 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama bendroji ląstelės RNR. Paveiksle yra pažymėti genų *ndd.4*, *segD*, *dmd* ir *sp* transkriptų pradžios nukleotidai bei viršuje pateikti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai. Kairėje esantis juodas trikampis žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus. B) Po nuotrauka pateiktos genomo sričių prieš genus *ndd.4*, *segD*, *dmd*, *sp*, *mobD.1*, *pin* ir *arn* nukleotidų sekos. GGAG ir GGAU motyvai yra pateikti juodame fone, iniciacijos kodonai yra paryškinti ir pabraukti, terminacijos kodonai esantys prieš genus yra paryškinti ir pažymėti žvaigždutėmis. Vertikalios juodos strėlės rodo RegB skėlimų vietas. Ankstyvųjų transkriptų iniciacijos nukleotidai yra pateikti kursyvu bei paryškinti. P<sub>E</sub> žymi ankstyvųjų transkriptų pradžios nukleotidus. P<sub>E</sub><sup>\*</sup> rodo vėliau šiame darbe nustatyto ankstyvojo promotoriaus indukuotų transkriptų pradžios nukleotidus.**

Genų *ndd.4*, *mobD* ir *sp* transkriptai buvo efektyviai skeliami SD sekoje, tuo tarpu genų *segD*, *pin* ir *dmd* transkriptai buvo hidrolizuojami neefektyviai. Be to, buvo nustatyta, kad RegB silpnai hidrolizuoja genomo srityje prieš geną *arn* esantį GGAU motyvą.

Genas *segD* buvo aprašytas kaip vėlyvasis genas (Luke ir kt., 2002). Nustčius jame RegB taikinį, kilo klausimas, ar tai galėtų būti išimtis, nes vėlyvųjų ir viduriniųjų transkriptų RNazė RegB paprastai nehidrolizuoja (Sanson ir kt., 2000). Be to, tiriant fago T4 geno *segD* transkriptą buvo matomi transkripto 5' galiniai nukleotidai, esantys tarpgeninėje srityje prieš geno pradžia. Išanalizavus šios srities nukleotidų prieš pat šį geną seką buvo numatytas potencialus ankstyvasis promotorius, todėl buvo nuspręsta patikrinti jo aktyvumą *in vivo*.

### **3.2. Bakteriofago T4 potencialaus ankstyvojo promotoriaus aktyvumo patikrinimas**

Nemodifikuota *E. coli* RNR polimerazė atpažįsta tiek bakterijos-šeimininkės, tiek fago ankstyvuosius promotorius. Tačiau jau pačioje infekcijos pradžioje vykstanti aktyvi fago genų transkripcija rodo, kad fago promotoriai yra žymiai pranašesni už *E. coli* promotorius. Esminį vaidmenį šioje stadijoje vaidina promotorių stiprumas, kurį lemia jų struktūra. Efektyvų P<sub>E</sub> atpažinimą lemia faginės DNR savybės ir daugiau jokie fago koduojami veiksniai nereikalingi ankstyvosios transkripcijos metu (Miller ir kt., 2003). Bakteriofago T4 ankstyvųjų promotorių sekos yra žymiai konservatyvesnės už *E. coli* promotorių atitinkamas sekas (Lisser ir Margalit, 1993). Stiprūs fago promotoriai paprastai atitinka tipinę P<sub>E</sub> seką (Wilkens ir Rüger, 1994).

Palyginus tipinę ankstyvųjų fago T4 promotorių seką su potencialaus promotoriaus P<sub>E</sub> seka buvo nustatyta, kad spėjamo promotoriaus –10 srities seka ir tarpiklio sritis atitinka tipines sekas. Tuo tarpu jo –35 srities seka ATTTACA skyrėsi nuo tipinės, dažniausiai labai konservatyvios, 7 nukleotidų sekos GTTTACA pirmoje padėtyje (G→A). Pirmo ir trečio nukleotido



Analizuojant, išskirtus be chloramfenikolio sintetinamus transkriptus, buvo matomi transkripcijos pradžios nukleotidai bei RegB skėlimo vietos, tuo tarpu terpėje esant chloramfenikolio, matomi tik transkripcijos pradžios nukleotidai (13 pav.). Tai rodo, jog tiriamasis potencialus promotorius yra ankstyvasis ir kad jis yra aktyvus *in vivo*.

Analizuojant *segD* transkriptų kaupimosi ląstelėje kinetiką buvo parodyta, kad nuo šio promotoriaus inicijuojami transkriptai atsiranda iškart po infekcijos (matomi jau 1 min) ir jų kiekis didėja iki 4 min po infekcijos, o po to ima mažėti (13 pav.). Tokia kinetika yra būdinga ankstyvųjų mRNR sintezei, todėl tai yra papildomas įrodymas, kad promotorius yra ankstyvasis. Šis promotorius buvo pavadintas P<sub>EsegD</sub>.

### **3.3. RNazės RegB kirptus transkriptus hidrolizuojančių endoribonukleazių nustatymas**

#### **3.3.1. Naujų antrinių kirpimo taikinių nustatymas**

Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad kai kurie endoribonukleazės RegB hidrolizuoti transkriptai, tuoj už RegB kirpimo vietos turintys AU turtingų sričių yra toliau kerpami nenustatytų nukleazių (Sanson ir Uzan, 1993, 1995). Šios AU turtingos sritys buvo pavadintos antriniais endoribonukleazių skėlimo taikiniai. Iki šiol buvo nustatyti keturi, genų *cef*, *g39*, *g43* ir *motB* transkriptai, turintys aiškiai matomus kirpimus, išsidėsčiusius 6-8 nt už RegB kirpimo vietos (Hsu ir Karam, 1990; Sanson ir Uzan, 1993, 1995). Endoribonukleazės, atsakingos už antrinius skėlimus iki šiol nustatytos nebuvo, tačiau buvo parodyta, kad visais atvejais jie atsiranda tik po RegB skėlimo. Buvo iškelta prielaida, kad antriniai skėlimo taikiniai gali būti hidrolizuojami veikiant fago RegB ir *E. coli* endoribonukleazėms kartu.

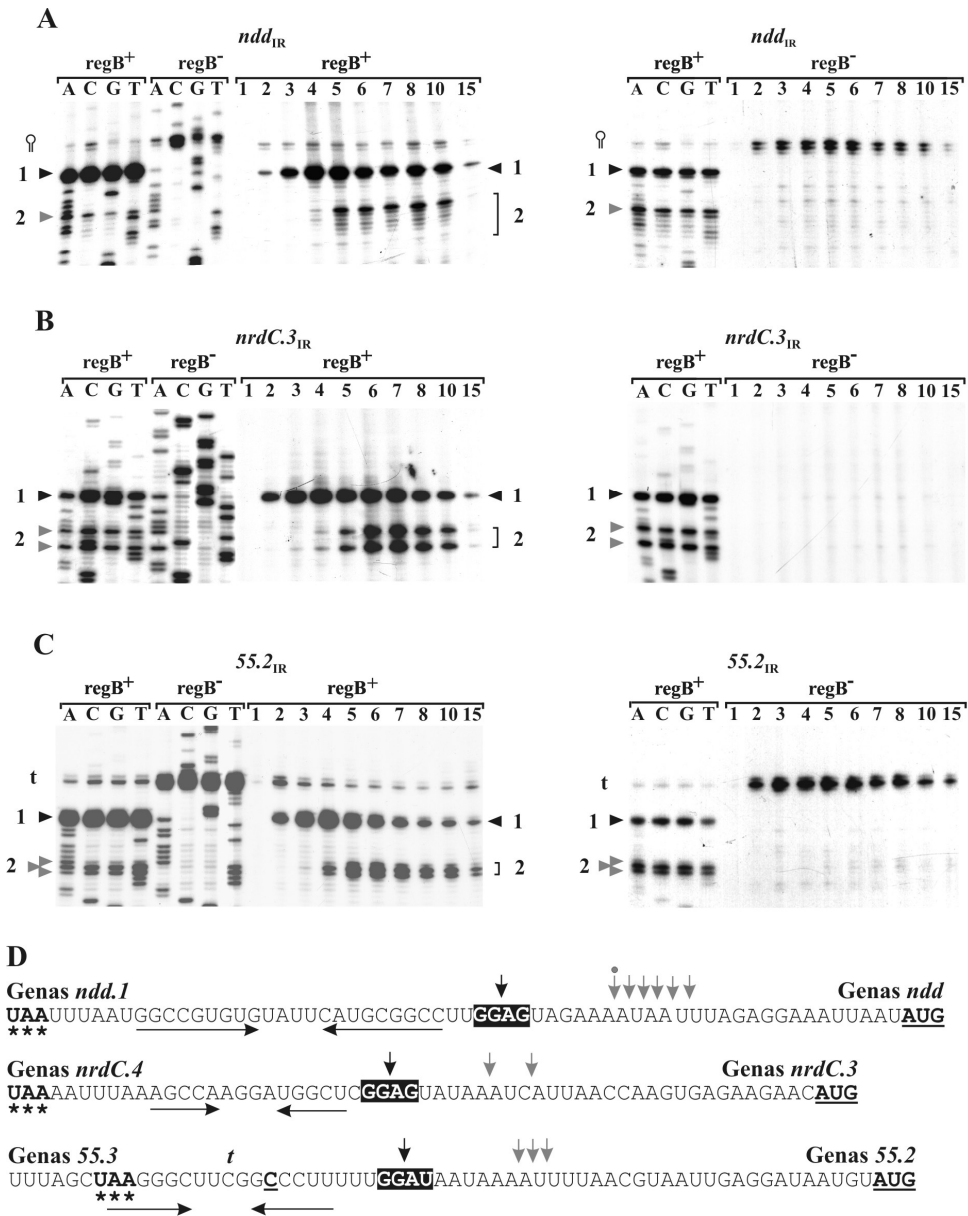
Tęsiant RegB taikinių paiešką, tarpgerininėse transkriptų srityse prieš genus *ndd*, *nrdC.3* ir *55.2* mes taip pat aptikome ne tik pirminius taikinius, kuriuos hidrolizuoja RNazė RegB, bet ir antrinius skėlimo taikinius.

Pastebėtieji antriniai transkriptų taikiniai buvo AU turtingose tarpgeninėse srityse 5-8 nt už pirminio skėlimo vietas. Analizuojant po T4<sup>+</sup> arba T4regB<sup>-</sup> infekcijos išskirtą RNR buvo nustatyta, jog antriniai skėlimai fago T4 tarpgeninėse srityse atsiranda tik tada, kai bakterija-šeimininkė būna infekuota bakteriofagu T4<sup>+</sup>. *E. coli* ląsteles infekavus fagu T4regB<sup>-</sup>, nei pirminiai, nei antriniai skėlimai nėra matomi (14 pav.).

Toliau vykdant tyrimus buvo svarbu patvirtinti, kad RNazė RegB skelia transkriptą, ir tik po to vyksta antrinis transkripto kirpimas. Šiam tikslui pasiekti buvo tiriama transkriptų kaupimosi kinetika. Išanalizavus gautus rezultatus buvo nustatyta, kad AMV AT sustojimai tarpgeninėje srityje prieš geną *ndd* atsiranda dėl RegB nukleazės skėlimo prieš GGAG motyvo A nukleotidą, ir už šešių nukleotidų nuo GGAG motyvo. Pirmieji nustatyti 5' galiniai nukleotidai, susidarę dėl papildomo transkripto hidrolizavimo, atsiranda po 4 min nuo infekcijos pradžios, t.y. po 2 min nuo to laiko, kai transkripto GGAG seką hidrolizuoja RNazė RegB (14 pav. A). Kontrolinis eksperimentas (transkriptų kinetika, esant infekcijai fagu T4regB<sup>-</sup>) dar kartą patvirtino, kad antrinių skėlimų atsiradimas priklauso nuo pirminio kirpimo, kurį vykdo RegB.

Tiriant geno *nrnC.3* transkriptą, buvo nustatyta, kad *E. coli* nukleazės kerpa mRNR už 5 ir 8 nt nuo GGAG sekos, ir antriniai skėlimai matomi jau 3 min po infekcijos pradžios, maksimumą pasiekdami 6-7 min. Antriniai skėlimai atsiranda su vienos minutės trukmės vėlavimu lyginant su pirminio kirpimo atsiradimu, o kontroliniame eksperimente skėlimai nėra matomi (14 pav. B).

Analizuojant geno 55.2 transkripto kaupimosi ląstelėje kinetiką, parodyta, kad antriniai skėlimai atsiranda už 6-8 nt nuo RegB hidrolizuojamo GGAU motyvo. Antriniai skėlimai pasiekia piką 5-7 min ir taip pat yra priklausomi nuo pirminių skėlimų atsiradimo (14 pav. C).



**14 pav. Fago T4 *ndd* (A), *nrdC.3* (B) ir *55.2* (C) transkriptų analizė žymėto pradmens ilginimo metodu.** *E. coli* B<sup>E</sup> kamieno ląstelės buvo auginamos 30 °C, infekuojamos bakteriofagu T4<sup>+</sup> arba T4regB<sup>-</sup> ir po 4 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama bendroji ląstelės RNR. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai. Tiriant transkriptų kinetiką, *E. coli* ląstelės buvo infekuojamos bakteriofagu T4<sup>+</sup> arba T4regB<sup>-</sup>. Bendroji ląstelės RNR buvo skiriama 1-8, 10 ir 15 min nuo infekcijos pradžios. Viršuje pažymėtas RNR skyrimo laikas (min) po infekcijos fagais. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus. Stiebo-kilpos struktūra *ndd* geno atveju žymi AT sustojimus ties mRNR segtuko struktūra. Geno *55.2* atveju raidė t žymi AT sustojimą ties rho-priklausomu terminatoriumi (Miller ir kt., 2003). (D) Po nuotrauka pateiktos genomo srities prieš genus *ndd*, *nrdC.3* ir *55.2* nukleotidų sekos. GGAG ir GGAU motyvai yra pateikti juodame fone, iniciacijos kodonai yra paryškinti ir pabraukti, terminacijos kodonai esantys prieš genus yra paryškinti ir pažymėti žvaigždutėmis. Vieną į kitą rodančios rodyklės žymi palindrominių sekų invertuotus pakartojimus. Vertikalios juodos strėlės rodo RegB skėlimų vietas, o vertikalios pilkos strėlės žymi antrinių skėlimų vietas, efektyviausiai skeliamos vietas pažymėtos tašku.

Šie rezultatai rodo, kad tarpgeninėse srityse prieš genus *ndd*, *nrdC.3* ir 55.2 RegB, hidrolizuojami transkriptai tampa tinkamais substratais kitoms nukleazėms tik po pradinio kirpimo, kurį vykdo endoribonukleazė RegB. Kaip ir anksčiau nustatytais atvejais (Sanson ir Uzan, 1993, 1995), antriniai taikiniai yra išsidėstę AU turtingose srityse už RegB taikinių, kurie yra tarpgeninėse, bet ne SD, srityse. Be to, prieš skėlimo taikinius yra invertuotos sekos, šis bruožas taip pat būdingas visiems iki šiol nustatytiems antriniam skėlimo taikiniams. Kartu su šiame darbe pateiktais naujais RegB skėlimo taikinais, bakteriofago T4 genome yra nustatyti 74 endoribonukleazės RegB taikiniai, iš jų 38 yra koduojančiose sekose, 26 – SD sekose ir 10 – tarpgeninėse srityse (Sanson ir kt., 2000; Durand ir kt., 2006; Zajančauskaitė ir kt., 2008; šis darbas). Reikia pažymėti, kad visi iki šiol nustatyti taikiniai yra nuo P<sub>E</sub> indukuotuose transkriptuose.

### **3.3.2. *E. coli* endoribonukleazių E ir G poveikio RegB kirptiems transkriptams tyrimas**

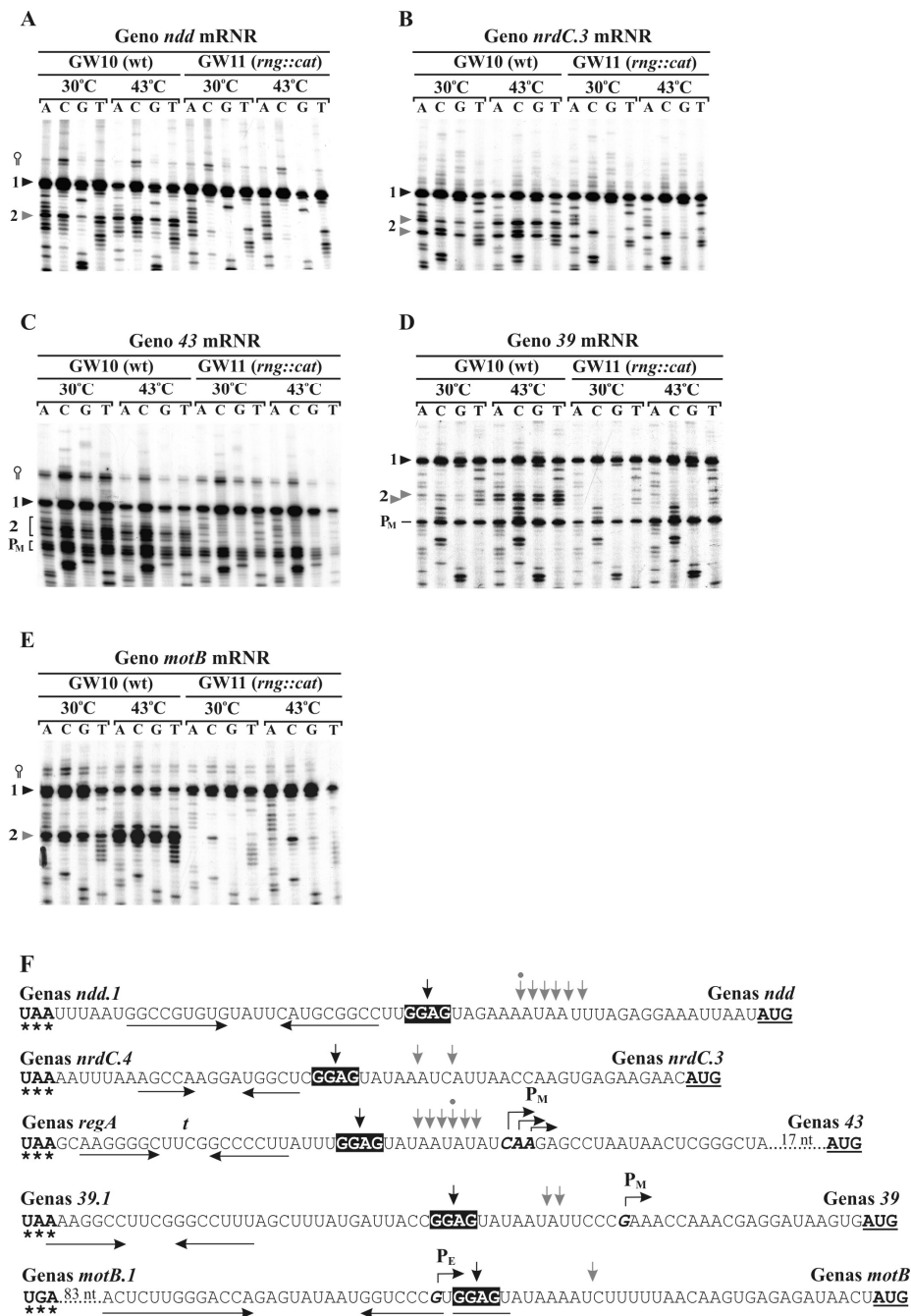
Dar 1993 metais buvo nustatyta, kad antriniai skėlimai atsiranda transkriptuose, turinčiuose AU turtingų sričių, kurie prieš tai buvo kirpti endoribonukleazės RegB (Sanson ir Uzan, 1993, 1995). Buvo tikrinamos *E. coli* koduojamos endoribonukleazės, kurios galėtų būti atsakingos už antrinių skėlimų atsiradimą. Tačiau bakterijos koduojamų endoribonukleazių poveikis faginių transkriptų hidrolizavimui įrodytas nebuvo. Kadangi RNazė E kerpa viengrandes AU turtingas sekas ir yra pagrindinė bei gausiausia *E. coli* endoribonukleazė (Ehretsmann ir kt., 1992; Lin-Chao ir kt., 1994), pirmiausiai nusprendėme patikrinti šios RNazės poveikį RegB hidrolizuotiems transkriptams.

RNazės E poveikio patikrinimui bendroji ląstelės RNR buvo skiriama iš *E. coli* laukinio tipo [N3433] bei jam izogeninio *rne3071* [N3431] (temperatūrai jautrus kamienas, kurio RNazė E žemesnėje (~30 °C) temperatūroje yra aktyvi, o perkėlus į aukštesnę (~42 °C) temperatūrą tampa

neaktyvi) kamienų po infekcijos fagu T4<sup>+</sup>, esant 30 °C ir 43 °C temperatūroms. Atlikus transkriptų analizę, antriniai kirpimai buvo stebimi abiem atvejais, tai rodė, kad RNazė E arba visiškai nedalyvauja T4 *ndd*, *nrdC.3* ir *55.2* transkriptų antrinio skėlimo procese, arba šios nukleazės aktyvumas yra maskuojamas kitos nukleazės, turinčios panašų specifiškumą (duomenys nepateikti).

Buvo nuspręsta patikrinti RNazės G, kuri yra struktūrinė RNazės E homologė bei kaip ir ši, skelia viengrandes RNR AU turtingose srityse, galimą poveikį minėtiems bakteriofago T4 transkriptams. Norėdami sužinoti, ar sutrumpėjusios dėl skėlimo antriniuose taikiniuose mRNR yra *E. coli* RNazės G veiklos produktai, bendroji ląstelės RNR po infekcijos fagu T4<sup>+</sup>, buvo skiriama iš *E. coli* laukinio tipo kamieno GW10 bei jam izogeninio GW11 kamieno, turinčio defektyvią RNazę G (*rng::cat*). Išskirtoji mRNR buvo analizuojama naudojant P<sup>32</sup>-žymėtus pradmenis, komplementarius genų *ndd*, *nrdC.3*, *55.2* mRNR, bei pradmenis, komplementarius genams *43*, *motB*, *cef* ir *39*, kurių transkriptai, taip pat turi nuo RegB priklausomus antrinius skėlimo taikinius (Hsu ir Karam, 1990; Sanson ir Uzan, 1993, 1995). Analizuojant transkriptus, išskirtus iš laukinio tipo kamieno GW10 buvo aptikti trumpesni transkriptai, susidarę tiek dėl RegB, tiek ir dėl antrinių skėlimų (15 ir 16 pav.). Tuo tarpu iš defektyvią RNazę G turinčio kamieno GW11 išskirtų transkriptų antriniai AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimai tarpgeninėje srityje prieš genus *ndd*, *nrdC.3*, *43*, *motB* ir *39* aptikti nebuvo (15 pav.).





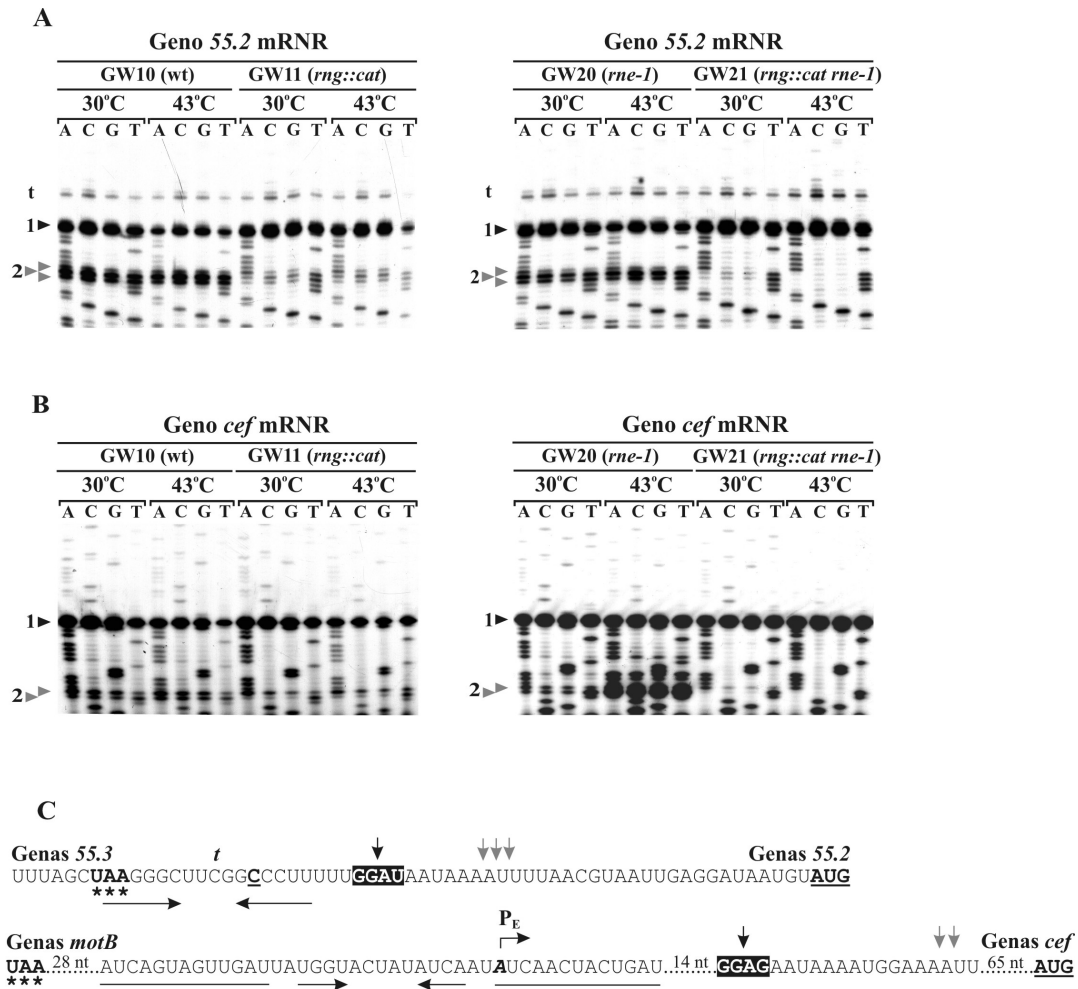
15 pav. Endoribonukleazės G įtakos antrinių skėlimų atsiradimui prieš genus *ndd* (A), *nrdC.3* (B), *43* (C), *39* (D) ir *motB* (E) tyrimas. Pradmens ilginimo reakcijai buvo panaudota bendroji ląstelės RNR, išskirta iš *E. coli* GW10 (wt) ir GW11 (*rng::cat*) kamienų 6 min (30 °C) ir 4 min (43 °C) po infekcijos bakteriofagu T4<sup>+</sup>. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimo taikinių 5'-galinius nukleotidus. Stiebo kilpos struktūros genų *ndd*, *43* ir *motB* atvejais žymi AT sustojimus ties segtukų struktūromis. P<sub>M</sub> simboliu pažymėti vidurinėsios transkripcijos pradžios nukleotidai. (F) Po nuotraukomis pateiktos genomo srities prieš genus *ndd*, *nrdC.3*, *g43*, *g39* ir *motB* nukleotidų sekos. GGAG motyvai yra pateikti juodame fone, iniciacijos kodonai yra paryškinti ir pabraukti, terminacijos kodonai esantys prieš genus yra paryškinti ir pažymėti žvaigždutėmis. Vieną į kitą rodančios rodyklės žymi palindrominių sekų invertuotus pakartojimus. Vertikalios juodos strėlės rodo RegB skėlimų vietas, o vertikalios pilkos strėlės žymi antrinių skėlimų vietas, efektyviausiai skeliamos vietas pažymėtos tašku. P<sub>E</sub> žymi ankstyvųjų, o P<sub>M</sub> – viduriniųjų transkriptų pradžios nukleotidus.

Šis faktas rodo, kad šias RegB kirptas mRNR skelia ląstelės-šeimininkės koduojama RNazė G. Tuo tarpu mRNR, išskirtoje iš GW11 kamieno, antriniai AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimai tarpgeninėse srityse prieš genus 55.2 ir *cef* vis tiek buvo stebimi, nors ir mažiau ryškūs (ypač geno 55.2 atveju) nei transkriptų, išskirtų iš laukinio tipo kamieno atvejais (16 pav.). Šis rezultatas parodė, kad šių dviejų genų mRNR skaldo ne tik RNazė G, bet ir kita nukleazė.

Norėdami įsitikinti, ar ribonukleazės E ir G gali kirpti tuos pačius taikinius, buvo analizuota bendroji ląstelės RNR, išskirta iš *E. coli* GW21 (GW10, *rne-1 rng::cat*) kamieno, infekuojamas fagu T4<sup>+</sup> 30 °C ir 43 °C temperatūrose. Kamienas GW21 turi tiek defektyvią RNazę G, tiek ir temperatūrai jautrią RNazę E. Dvigubo mutanto atveju (*rne-1 rng::cat*), esant 30 °C temperatūrai, buvo matomi labai neryškūs AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimai tarpgeninėje srityje prieš geną 55.2 (16 pav. A). Tuo tarpu 43 °C temperatūroje, buvo matomi tik pirminiai RegB skėlimai.

Šis tyrimas patvirtino, kad ląstelėje nesant RNazės G, ribonukleazė E skelia tą patį 55.2 transkripto taikinį. Taigi, 55.2 transkriptą ties antriniais taikiniai skelia abi *E. coli* RNazės – E ir G. Analogiškas *cef* transkripto tyrimas taip pat parodė, kad visos trys endoribonukleazės (RegB, RNazė E ir RNazėG) hidrolizuoja ir jo priešgeninę sritį (16 pav. B). Svarbu paminėti, kad visais tirtais atvejais endoribonukleazė RegB išliko aktyvi, nepriklausomai nuo to, kuri *E. coli* koduojama RNazė, E, G arba abi kartu, buvo inaktyvuotos.

Apibendrinant šio tyrimo rezultatus galima teigti, kad RNazė G yra atsakinga už antrinių skėlimų atsiradimą AU turtingose sekose prieš bakteriofago T4 genus *ndd*, *nrdC.3*, *43*, *motB* ir *39*, tuo tarpu RNazės E ir G abi kartu gali atpažinti tuos pačius taikinius, esančius mRNR prieš genus 55.2 ir *cef*. Tačiau sprendžiant pagal AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimo vietų blankumą, panašu, kad RNazės E vaidmuo antriniame šių transkriptų skaidyme yra nedidelis, ir kad RNazė G yra pagrindinė nukleazė, skelianti antrinius taikinius visuose iki šiol tirtuose transkriptuose.



**16 pav. Endoribonukleazių G ir E įtaka antrinių skėlimų atsiradimui genomo srityje prieš genus 55.2 (A) ir *cef* (B).** Pradmens ilginimo reakcijai buvo panaudota bendroji ląstelės RNR, išskirta iš *E. coli* GW10 (wt), GW11 (*rng::cat*), GW20 (*rne-1*) ir GW21 (*rng::cat rne-1*) kamienų 6 min (30°C) ir 4 min (43°C) po infekcijos bakteriofagu T4<sup>+</sup>. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus. Geno 55.2 atveju raidė *t* žymi AT sustojimą ties rho-priklausomu terminatoriumi (Miller ir kt., 2003). (C) Po nuotraukomis pateiktos genomo sritys prieš genus *g55.2* ir *cef* nukleotidų sekos. GGAG ir GGAU motyvai yra pateikti juodame fone, iniciacijos kodonai yra paryškinti ir pabraukti, terminacijos kodonai esantys prieš genus yra paryškinti ir pažymėti žvaigždutėmis. Vieną į kitą rodančios rodyklės žymi palindrominių sekų invertuotus pakartojimus. Vertikalios juodos strėlės rodo RegB skėlimų vietas, o vertikalios pilkos strėlės žymi antrinių skėlimų vietas, efektyviausiai skeliamos vietas pažymėtos tašku. *P<sub>E</sub>* žymi ankstyvųjų transkriptų pradžios nukleotidus.

Iki šiol RNazės G poveikis fago T4 transkriptams buvo tirtas minimaliai. Ueno ir Yonesaki nustatė, kad fago infekcijos metu padidėja pačios *E. coli* mRNR jautrumas RNazei G (Ueno ir Yonesaki, 2004). Tai rodo, kad ji dalyvauja *E. coli* mRNR degradacijoje fago infekcijos metu, tačiau T4 transkriptuose jos taikinių iki šiol nustatyta nebuvo, todėl mūsų nustatyti

taikiniai yra pirmieji fago T4 transkriptuose nustatyti RNazės G taikiniai.

### **3.4. Plazmidėje koduojamų fago T4 transkriptų jautrumo *E. coli* endoribonukleazėms tyrimas**

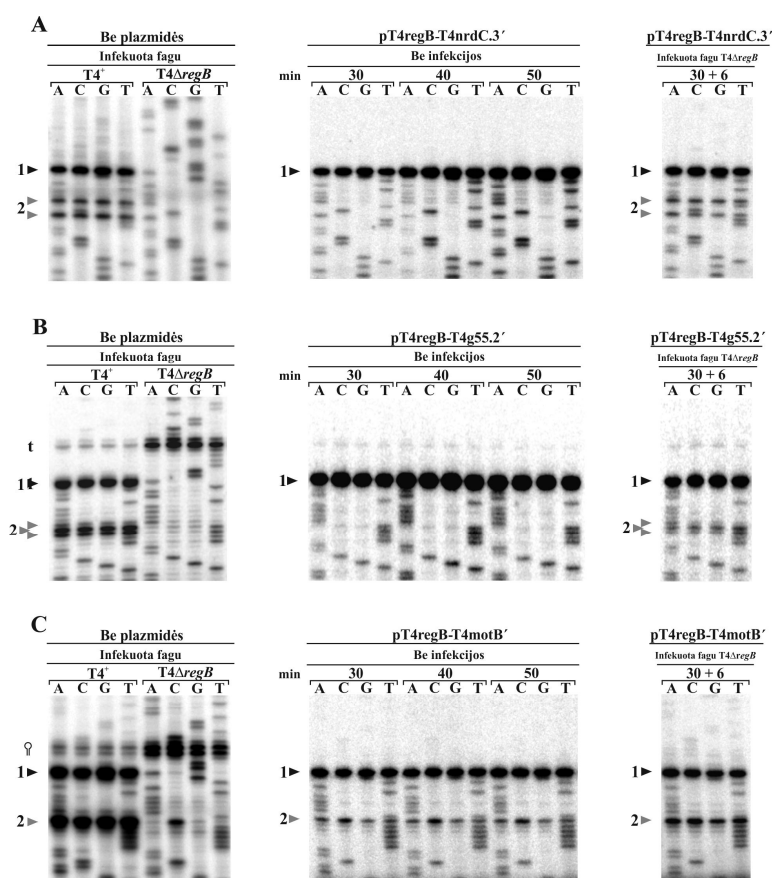
Ankstesnių tyrimų metu parodėme, jog nuo RNazių E/G priklausantys skėlimai fago T4 tarpgeninėse srityse atsiranda tik po to, kai juos jau būna skėlus RNazė RegB. Tačiau yra žinoma, kad RegB palieka -OH grupę transkripto 5' gale, o ją turinti mRNR nėra tinkamas substratas RNazėms E/G. RNazės E ir G teikia pirmenybę tiems RNR substratams, kurie 5' gale turi monofosfinę grupę. Tuo tarpu, substratai, 5' gale turintys hidroksilo arba trifosfinę grupę, yra hidrolizuojami lėtai ir labai neefektyviai (Jiang ir kt., 2000; Jiang ir Belasco, 2004). Todėl buvo iškelta hipotezė, kad tam tikri fago T4 baltymai infekcijos metu gali turėti įtakos RNazių E/G aktyvumui arba specifiškumui. Šiems tyrimams toliau buvo naudojamos plazmidžių-fagų sistemos.

#### **3.4.1. Plazmidėse koduojamų genų *nrdC.3*, *motB* ir *55.2* transkriptų jautrumo *E. coli* endoribonukleazėms tyrimas plazmidžių-fagų sistemose**

Norėdami nustatyti, ar faginė infekcija turi įtakos RNazių E ir G aktyvumui, buvo nuspręsta sukonstruoti rekombinantines plazmides, kuriose būtų fago T4 *regB* genas bei genų *nrdC.3*, *motB* ir *55.2* pradžios kartu su 5' sritimis, kuriose yra pirminiai ir antriniai endoribonukleazių skėlimo taikiniai. Rekombinantinės plazmidės buvo konstruojamos įterpiant nuo fago T4<sup>+</sup> PGR metodu amplifikuotus DNR fragmentus į plazmidę p<sub>LP</sub>T4*regB* (4 lentelė, psl. 50).

Sukonstruotos rekombinantinės plazmidės pT4*regB*-T4g55.2', pT4*regB*-T4*nrdC.3*' ir pT4*regB*-T4*motB*' buvo transformuotos į *E. coli* C41(DE3) kamieno ląsteles. Indukavus genų raišką plazmidinėje sistemoje induktoriumi IPTG (1 mM), kultūra padalinta į dvi dalis, viena dalis ląstelių kultūros buvo

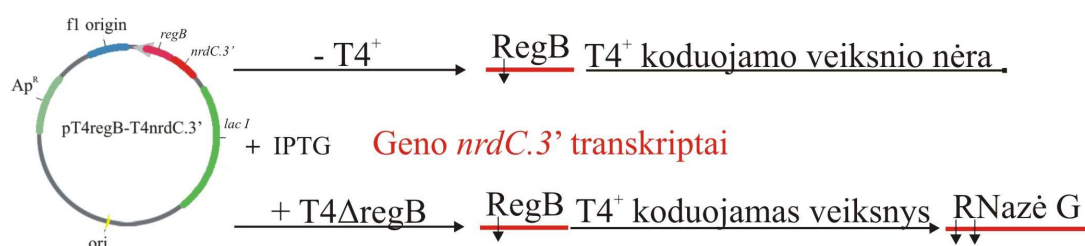
infekuota bakteriofagu T4 $\Delta$ regB ir po 6 min išskirta bendroji ląstelės RNR. Kita ląstelių kultūros dalis nebuvo infekuota ir RNR buvo skiriama praėjus 30, 40 arba 50 min nuo indukcijos pradžios. Išskirtos RNR buvo analizuojamos mRNR sekoskaitos metodu su P<sup>32</sup> žymėtais *nrdC.3*, *motB* ir 55.2 transkriptams komplementariais pradmenimis. Palyginimui buvo analizuojama RNR išskirta iš C41(DE3) kamieno ląstelių po infekcijos bakteriofagais T4<sup>+</sup> ir T4 $\Delta$ regB (17 pav.).



**17 pav. RegB skeltų fago T4 *nrdC.3* (A), 55.2 (B) ir *motB* (C) transkriptų jautrumo *E. coli* endoribonukleazėms tyrimas plazmidžių-fagų sistemoje.** Pradmens ilginimo reakcijai buvo panaudota bendroji ląstelės RNR, išskirta iš *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelių, turinčių plazmidės pT4regB-T4nrdC.3', pT4regB-T4g55.2' arba pT4regB-T4motB' be faginės infekcijos arba 6 min (30 °C) po infekcijos bakteriofagu T4 $\Delta$ regB. Transkriptai nuo atitinkamų rekombinantinių plazmidžių buvo indukuoti įnešant 1 mM IPTG 30 min prieš infekciją fagu. Neinfekuotų ląstelių mėginiai buvo imti 30, 40 ir 50 min po indukcijos IPTG. Kontroliniams eksperimentams buvo panaudoti faginiai transkriptai išskirti iš *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelių 6 min (30 °C) po infekcijos bakteriofagu T4<sup>+</sup> arba T4 $\Delta$ regB. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai, laikas (min) po indukcijos IPTG arba infekcijos fagu. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlinių 5'-galinius nukleotidus. Geno 55.2 atveju raidė t žymi AT sustojimą ties rho-priklausomu terminatoriumi (Miller ir kt., 2003). Stiebo kilpos struktūros geno *motB* atveju žymi AT sustojimus ties mRNR segtuko struktūra.

Analizuojant genų *nrdC.3*, *55.2* ir *motB* transkriptus, išskirtus iš neinfekuotų kultūrų, buvo nustatyta, kad visi jie yra efektyviai hidrolizuojami pirminių (RegB) taikinių vietose. Tačiau genų *nrdC.3* ir *55.2* atvejais antriniai AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimai, net ir praėjus 50 min po plazmidžių indukcijos, aptikti nebuvo (17 pav. A ir B). Papildomai infekavus fagu T4ΔregB *E. coli* ląsteles, turinčias rekombinantines plazmides, išskirtuose tiriamųjų genų transkriptuose buvo nustatyti 5' galiniai nukleotidai, susidarę tiek dėl RegB, tiek ir dėl antrinių skėlimų (17 pav.). AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimai yra matomi tose pačiose vietose, kaip ir transkriptuose išskirtuose bakterijų kultūrą infekavus fagu T4<sup>+</sup>.

Plazmidėje koduojamų *nrdC.3* transkriptų hidrolizė yra pavaizduota schema (18 pav.).



18 pav. Rekombinantinėje plazmidėje pT4regB-T4nrdC.3' koduojamų *nrdC.3'* transkriptų hidrolizavimo schema.

Tiriant geno *motB* transkriptus, buvo matomi aiškūs AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimai tiek pirminių, tiek ir antrinių skėlimų srityse, įrodantys, kad nuo plazmidės indukuotas transkriptas yra skeliamas šiose vietose tiek vykstant, tiek ir nevykstant fago infekcijai (17 pav. C). Tačiau esant infekcijai fagu, skėlimai antriniuose taikiniuose yra ryškesni, nei plazmidiniuose transkriptuose, išskirtuose be infekcijos. Taigi atlikti tyrimai plazmidžių-fagų sistemose parėmė anksčiau iškeltą idėją, kad fago infekcijos metu yra sintetinami tam tikri fago T4 baltymai, kurie turi įtakos antrinių skėlimo taikinių atsiradimui RegB kirptuose transkriptuose.

### **3.5. Bakteriofago T4 koduojamų veiksmių, turinčių įtakos *E. coli* ribonukleazių E ir G aktyvumui, nustatymas**

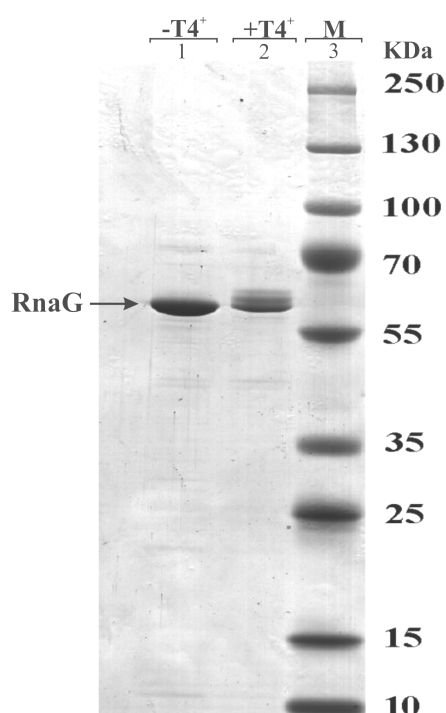
Ankstesniuose darbo etapuose nustatėme, kad fagas T4 savo ankstyvųjų transkriptų brendimui panaudoja *E. coli* endoribonukleazės E ir G, be to stimuliuoja jų aktyvumą RegB kirptų transkriptų atžvilgiu. Siekiant išsiaiškinti, kokie fago koduojami veiksniai turi įtakos RNazių aktyvumui, buvo iškeltos dvi hipotezės: RNazės fago infekcijos metu yra modifikuojamos ir gali atpažinti transkripto 5' OH grupę arba kiti fago T4 baltymai infekcijos metu keičia jų funkciją. Todėl toliau tyrimai buvo vykdomi dviem kryptimis: RNazių galimo modifikavimo tyrimas ir įvairių fago T4 delecinių mutantų transkriptų tyrimas, siekiant rasti tokius mutantus, kuriuose antrinė RegB kirptų transkriptų hidrolizė nebūtų stebima.

#### **3.5.1. RNazės G modifikavimo galimybės tyrimas plazmidžių-fagų sistemose**

Ankstyvajame bakteriofago vystymosi ciklo etape yra sintetinama daug nedidelės molekulinės masės peptidų, kurie modifikuoja bakterijos-šeimininkės baltymus, tačiau dar daugiau jų galėtų dalyvauti pertvarkant bakterijos-šeimininkės metabolizmą. Potransliacinių modifikacijų buvimas gali keisti baltymo vietą ląstelėje, stabilumą ir funkcijas. Žinoma, kad kai kurie fagai modifikuoja ribonukleazes, tačiau fago T4 infekcijos metu šis reiškinys nėra ištirtas. Šiame darbe, RNazių modifikavimo tyrimams pasirinkome RNazę G, nes anksčiau nustatėme, kad ji yra pagrindinė už RegB kirptų ankstyvųjų transkriptų brendimą atsakinga nukleazė ir fago T4 infekcija keičia jos aktyvumą *in vivo*.

Siekiant išsiaiškinti, ar RNazė G yra modifikuojama faginės infekcijos metu, buvo sukonstruota rekombinantinė plazmidė pET16b\_rnag (4 lentelė, psl. 50), turinti *E. coli rnag* geną koduojantį baltymą sulietą N-gale su 10

histidinu. Plazmidė pET16b\_rnag buvo transformuota į *E. coli* C41(DE3) kamieno ląsteles, auginama iki  $A_{600} = 0,3$ . *rnag* geno raiška indukuota IPTG (1 mM) ir po valandos, pusė kultūros buvo infekuota bakteriofagu T4<sup>+</sup>, o likusi kultūros dalis neinfekuota. Po 10 min, kultūrų ląstelės buvo surinktos, suardytos ultragarsu, ir panaudojant histidinus surišančias kolonėles buvo gryninamas baltymas RnaG. Išgryninti baltymai buvo tiriami denatūruojančios baltymų elektroforezės gradientiniame poliakrilamidiniame gelyje būdu (19 pav.).



**19 pav. Rekombinantinės RNazės G elektroforetinio judrumo tyrimas denatūruojančios baltymų elektroforezės būdu.** Pirmame takelyje pažymėtas RnaG baltymas išskirtas po indukcijos IPTG, 2 - RnaG baltymas išskirtas po indukcijos IPTG ir infekcijos fagu T4<sup>+</sup>, 3 - pažymėtas baltymų molekulinės masės standartas – PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

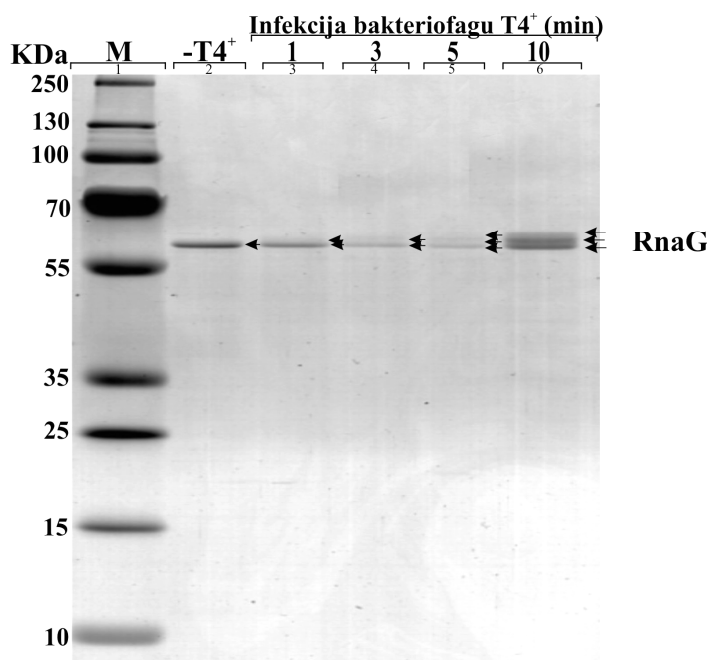
Nustatyta, jog rekombinantinį baltymą turinčias *E. coli* ląsteles infekavus fagu T4, keičiasi išgryninto RnaG baltymo elektroforetinis judrumas. Po infekcijos baltymas RnaG tampa nevienalytis, juda elektroforetiniame lauke kaip trys atskiri, šiek tiek didesnės molekulinės masės baltymai. Baltymo RnaG molekulinė masė galėtų pakisti dėl tam tikrų papildomų funkcinių grupių prijungimo kovalentiniu ryšiu. Baltymų modifikacijos gali turėti įtakos



baltymo fizikinių savybių pokyčiams – ne tik keisti baltymo molekulinę masę, bet ir krūvį, elektroforetinį judrumą, sąveikas su kitomis molekulėmis (Farley ir Link, 2009).

Nustačius, kad endoribonukleazė G gali būti modifikuojama, buvo bandoma nustatyti modifikacijų prigimtį. Šiuo metu yra žinoma labai daug potransliacinių modifikacijų atmainų. Pagrindinės iš jų yra fosforilinimas, acetilinimas, glikozilinimas, ADP-ribozilinimas ir ubikvitilinimas. Bakteriofago T4 atveju yra žinomas tik vienas fago vykdomas baltymų kovalentinio modifikavimo būdas – ADP-ribozilinimas (Miller ir kt., 2003). Šis fagas koduoja 3 riboziltransferazes: Alt, ModA ir ModB, kurios ribozilina įvairius *E. coli* baltymus. Fagui T4 infekavus ląstelę-šeimininkę riboziltransferazės veikia ankstyvajame infekcinio ciklo periode (Depping ir kt., 2005), todėl buvo nuspręsta patikrinti, kuriame fago T4 infekcinio ciklo etape RNazė G gali būti modifikuojama.

Tikrinant iškeltą prielaidą, kad RNazės G modifikacija vyksta ankstyvojoje faginės infekcijos fazėje, *E. coli* ląstelėse nuo plazmidės indukavome *rnaG* geno raišką ir infekavome jas fagu T4. Mėginiai buvo imti praėjus 1, 3, 5 ir 10 min nuo infekcijos pradžios. Taip pat buvo paimtas ir neinfekuotos kultūros kontrolinis mėginys. Rekombinantiniai baltymai buvo skiriami analogišku metodu ankstesniems tyrimams, panaudojant histidino liekanas surišančių kolonėlių rinkinį. Išgryninti baltymai buvo tiriami denatūruojančios baltymų elektroforezės būdu (20 pav.).



**20 pav. Rekombinantinės RNazės G modifikavimo kinetika fago T4 infekcijos metu.** Pirmame takelyje pažymėtas baltymų molekulinės masės standartas – PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, 2 - RnaG baltymas išskirtas po indukcijos IPTG, 3-6 takeliuose RnaG baltymas išskirtas po indukcijos ir infekcijos fagu T4 po 1, 3, 5 ir 10 min. Juodos rodyklės žymi atsiradusius baltymo masės pokyčius po infekcijos.

Buvo nustatyta, kad, praėjus tik vienai minutei nuo infekcijos pradžios, RNazės G elektroforetinis judrumas pakinta, baltymas elektroforetiniame lauke juda tarsi du skirtingos molekulinės masės baltymai. Praėjus penkioms minutėms nuo infekcijos pradžios, RNazės G elektroforetinis judrumas daugiau nebekinta, ir baltymas juda elektroforetiniame lauke trimis atskiromis juostelėmis. Taigi galima teigti, jog ribonukleazės G modifikavimas prasideda ankstyvuojų infekcijos periodu, todėl buvo nuspręsta iširti atskirų riboziltransferazių įtaką RNazės G modifikavimui.

Norėdami patikrinti iškeltą prielaidą, jog modifikavimą vykdo riboziltransferazės, *E. coli* ląstelėse indukavome *rnaG* geno raišką ir infekavome jas T4 giminingais bakteriofagais, kurie neturėjo vieno iš riboziltransferazės koduojančių genų. Buvo nustatyta, kad infekavus bakterinę kultūrą T4 giminingais bakteriofagais RB49 ir RB42, RNazės G elektroforetinis judrumas išlieka toks pats, kaip be infekcijos (rezultatai nepateikti). Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad fagas RB49 neturi geno

*modA*, o RB42 neturi geno *alt*. Kita vertus, abu bakteriofagai priklauso labiau nuo fago T4 nutolusiai pseudo T-lyginių bakteriofagų grupei, todėl jų RNR hidrolizėje gali nedalyvauti RNazė G. Norint patikrinti RNazės G ribozilinimo galimybę, buvo nuspręsta prielaidą patikrinti dviplazmidinėse koekspresijos sistemose.

### 3.5.2. RnaG modifikavimo tyrimai dviplazmidinėse sistemose.

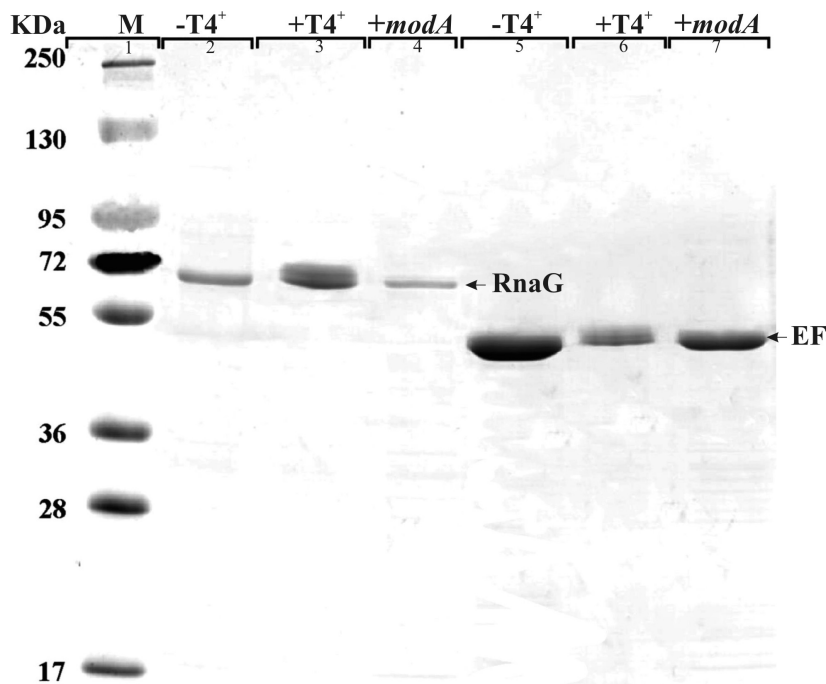
#### 3.5.2.1. Fago T4 riboziltransferazės geno *modA* koekspresija su *rnag* ir *ef-tu*

Mono-ADP-riboziltransferazės katalizuoja ADP-ribozės pernašą nuo substrato ADP-ribozil-nikotinamido (NAD<sup>+</sup>) ant arginino arba histidino liekanų modifikuojamame baltyme (Rohrer ir kt., 1975; Bell ir Eisenberg, 1996). Vienos ADP-ribozės prijungimas gali padidinti baltymo masę maždaug 540 Da, be to pakinta jos modifikuojamo baltymo savybės (Laing ir kt., 2011).

Atskirų riboziltransferazių įtakos RNazės G aktyvumui nustatymui pasirinkome įterptų genų koekspresijos metodą, kai ląstelėje nuo vienos plazmidės indukuojama RNazė G, o nuo kitos – viena iš riboziltransferazių. Tam tikslui pirmiausia sukonstravome su pET ekspresijos vektoriais suderinamą plazmidę p128-21-1, turinčią p15A replikoną ir indukuojamą tuo pačiu induktoriumi – IPTG. Ši plazmidė buvo sukonstruota iš plazmidinių vektorių pACYC184 ir pET21+ (2.2.18 sk., 63-65 psl., 11 pav. A). RnaG indukcijai naudojome tą pačią anksčiau sukonstruotą plazmidę – pET16b\_rnag, o bakteriofago T4 genas *modA* buvo įterptas į rekombinantinę koekspresijos plazmidę p128-21-1. Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad *E. coli* elongacijos faktorius EF-Tu faginės infekcijos metu yra ribozilinamas (Ravel ir kt., 1969). Įrodyta, kad tai vykdo fago koduojamos riboziltransferazės Alt ir ModB (Depping ir kt., 2005), tačiau neatmetama galimybė, kad gali ribozilinti ir ModA. Dėl šių priežasčių, įterpėme *E. coli* geną *ef-tu* kontroliniam eksperimentui. Baltymas EF-Tu yra bakterijos elongacijos faktorius (Ravel ir

kt., 1969), tačiau taip pat ir nuo ATP nepriklausomas šaperonas, dalyvaujantis bakteriofago replikaciniame cikle (fago galvutės konstravime) (Ang ir kt., 2000; Snyder ir kt., 2003).

Siekiant išsiaiškinti, ar RNazė G yra ribozilinama baltymo ModA, rekombinantinės plazmidės pET16b\_rnag ir p128\_21\_1\_modA (4 lentelė, psl. 50) buvo transformuotos į *E. coli* C41(DE3) kamieno ląsteles, genų raiška buvo indukuota IPTG (1 mM). Po indukcijos, koekspresija buvo vykdoma 2 val. Po to ląstelių kultūros buvo surinktos, suardytos ultragarsu, ir panaudojant histidinus surišančių kolonelių rinkinį buvo gryninamas rekombinantinis baltymas RnaG. Tuo pačiu metu buvo vykdomas ir kontrolinis tyrimas: *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės buvo transformuotos plazmidėmis pET-16b\_ef-tu ir p128-21-1\_modA (4 lentelė, psl. 50), ir tomis pačiomis sąlygomis vykdoma koekspresija. Be to, buvo siekiama patikrinti kaip keičiasi baltymo EF-Tu elektroforetinis judrumas po infekcijos bakteriofagu T4. Dėl to, *E. coli* ląstelės turinčios rekombinantinę plazmidę pET-16b\_ef-tu, buvo infekuotos fagu T4<sup>+</sup> po indukcijos ir buvo išskirtas rekombinantinis baltymas EF-Tu. Išgryninti rekombinantiniai RnaG ir EF-Tu baltymai buvo tiriami denatūruojančios baltymų elektroforezės būdu (21 pav.).



**21 pav. Rekombinantinių baltymų RnaG bei EF-Tu elektroforetinio judrumo tyrimas po koekspresijos su ModA.** Pirmame takelyje pažymėtas baltymų molekulinės masės standartas – PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 2 - RnaG baltymas, išskirtas po indukcijos IPTG, 3 - RnaG baltymas išskirtas po indukcijos ir T4 infekcijos, 4 - RnaG baltymas išskirtas po koekspresijos su baltymu ModA, 5 - EF-Tu baltymas išskirtas po indukcijos IPTG, 6 - EF-Tu baltymas išskirtas po indukcijos ir T4 infekcijos, 7 - EF-Tu baltymas išskirtas po koekspresijos su baltymu ModA.

Išanalizavus baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis rezultatus buvo nustatyta, kad, po infekcijos bakteriofagu T4, keičiasi tiek RNazės G, tiek EF-Tu elektroforetinis judrumas – jie juda elektroforetiniame lauke trimis juostelėmis. Tuo tarpu, baltymo ModA poveikis koekspresijos metu nei ribonukleazės G, nei baltymo EF-Tu elektroforetiniam judrumui nebuvo stebimas. Šie duomenys rodo, kad riboziltransferazė ModA greičiausiai nevykdo minėtų baltymų modifikavimo.

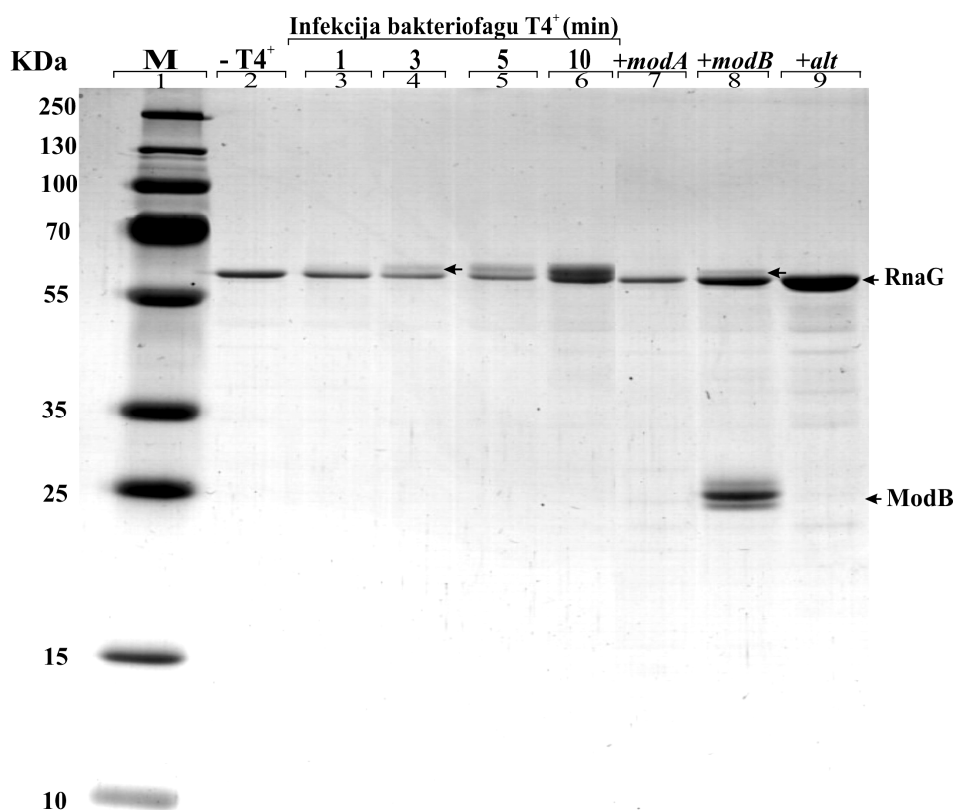
### **3.5.2.2. Fago T4 riboziltransferazių genų *alt* ir *modB* koekspresija su *rnag* bei *ef-tu***

Kadangi buvo nustatyta, jog rekombinantinių RNazės G ir EF-Tu elektroforetinis judrumas po infekcijos bakteriofagu T4 pakinta labai panašiai,

ir ModA buvo atmestas kaip nevykdantis modifikavimo, toliau buvo tikrinamos kitos dvi fago koduojamos riboziltransferazės: Alt ir ModB, kurios, kaip minėta anksčiau, vykdo EF-Tu ribozilinimą *in vivo*. Yra nustatyta, kad baltymas Alt turi plačiausią modifikuojamų baltymų spektrą iš trijų fago koduojamų riboziltransferazių (Depping ir kt., 2005).

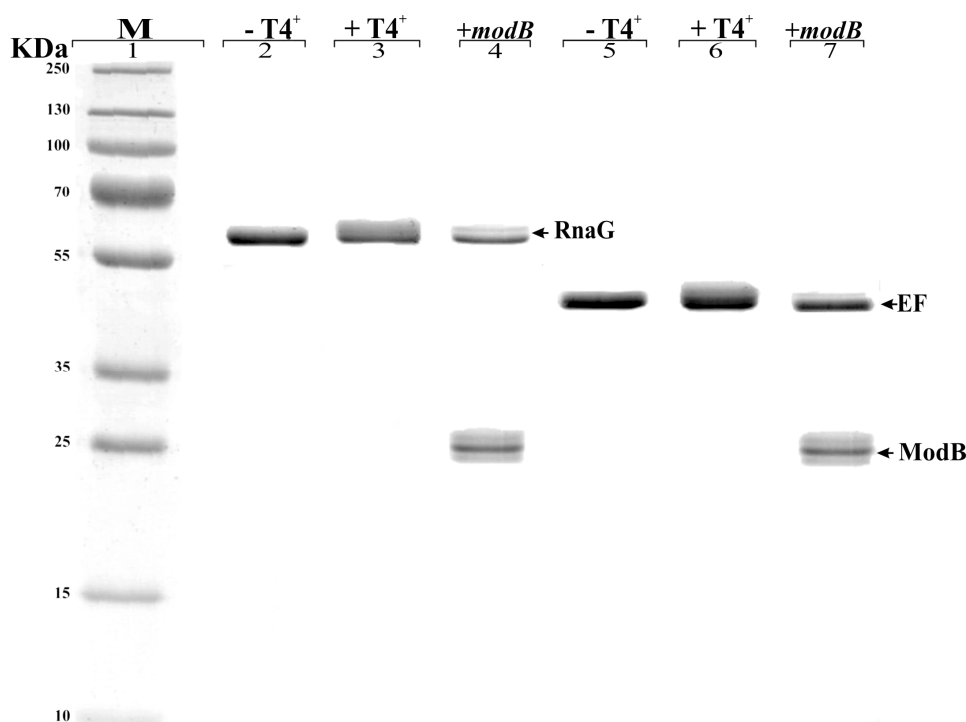
Genai *alt* ir *modB* buvo įterpti į rekombinantinę koekspresijos plazmidę p128-16b (4 lentelė, psl. 50). Ši plazmidė buvo sukonstruota iš plazmidinių vektorių pACYC184 ir pET16b (2.2.18 sk., 63-65 psl., 11 pav. B).

Sukonstruotos rekombinantinės plazmidės buvo transformuojamos į *E. coli* C41(DE3) ląsteles ir vykdoma koekspresija su įterptu *rnaG* genu tomis pačiomis sąlygomis, kaip aprašyta anksčiau. Išgryninti RnaG baltymai buvo analizuojami denatūruojančios baltymų elektroforezės būdu (22 pav.).



**22 pav. Rekombinantinės RNazės G elektroforetinio judrumo tyrimas po koekspresijos su riboziltransferazėmis ModA, ModB ir Alt.** Pirmame takelyje pažymėtas baltymų masės standartas – PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 2 - RnaG baltymas išskirtas po indukcijos IPTG, 3-6 takeliuose RnaG baltymas išskirtas po indukcijos ir ir T4 infekcijos po 1, 3, 5 ir 10 min. 7-9 takeliuose RnaG koekspresija su riboziltransferazėmis. Juoda rodyklė žymi atsiradusius analogiškus baltymo masės pokyčius po infekcijos praėjus 3 min ir po koekspresijos su baltymu ModB.

Buvo nustatyta, kad po koekspresijos su genu *alt* RNazės G elektroforetinio judrumo pokytis nestebimas, tuo tarpu riboziltransferazė ModB keičia šią savybę. Tačiau po dviejų koekspresijos valandų, baltymas elektroforezės lauke juda tik dviem juostelėmis (22 pav.). Todėl buvo nuspręsta prailginti koekspresijos laiką ir patikrinti ar koekspresavus *rnag* su *modB* ilgiau, baltymo judrumo pobūdis pasikeis. Analogiškas kontrolinis tyrimas buvo atliktas su *E. coli* elongacijos faktoriumi EF-Tu. Klonuoti *rnag* ir *ef-tu* genai buvo koekspresuoti su riboziltransferazės *modB* genu 5 val 37 °C temperatūroje, išgryninti naudojant standartinį metodą ir analizuojami denatūruojančios baltymų elektroforezės būdu (23 pav.).



**23 pav. Rekombinantinių baltymų RnaG bei EF-Tu elektroforetinio judrumo tyrimas po koekspresijos su riboziltransferaze ModB.** Pirmame takelyje pažymėtas baltymų molekulinės masės standartas – PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 2 – RnaG baltymas išskirtas po indukcijos IPTG, 3 – RnaG baltymas išskirtas po indukcijos ir T4 infekcijos, 4 – RnaG koekspresija su riboziltransferaze ModB, 5 – EF-Tu baltymas išskirtas po indukcijos IPTG, 6 – EF-Tu baltymas išskirtas po indukcijos ir T4 infekcijos, 7 – EF-Tu koekspresija su riboziltransferaze ModB.

Išanalizavus gautus duomenis buvo nustatyta, kad po koekspresijos su *modB*, tiek RNazės G, tiek EF-Tu atvejais atsiranda panašūs pakitimai. Tačiau,

net ir pailginus koekspresijos laiką, ModB keičia jų elektroforetinį judrumą mažiau nei po infekcijos fagu T4. Apibendrinus gautus rezultatus, galima daryti prielaidą, kad ir RNazė G faginės infekcijos metu gali būti ribozilinama baltymo ModB, tačiau taip pat panašu, kad abu baltymai gali būti ne tik ribozilinami, bet ir gali patirti ne vieno tipo modifikaciją. Iki šiol buvo parodyta, kad riboziltransferazė ModB ribozilina susijusius arba dalyvaujančius transliacijoje baltymus (baltymai taikiniai: trigerinis veiksnys, baltymas S1, EF-Tu) (Depping ir kt., 2005). Tačiau šio reiškinio detalūs mechanizmai ir modifikavimo biologinė reikšmė nėra ištirti. Tyrimus apsunkina tai, kad modifikacijų tyrimai yra sudėtingi ir gana brangūs (baltymų/peptidų masių spektrometrinė analizė). Šiame darbe taikomas metodas leidžia greitai ir nebrangiai atlikti pradinius modifikavimo tyrimus ir sužinoti, ar baltymas apskritai yra kovalentiškai modifikuojamas faginės infekcijos metu.

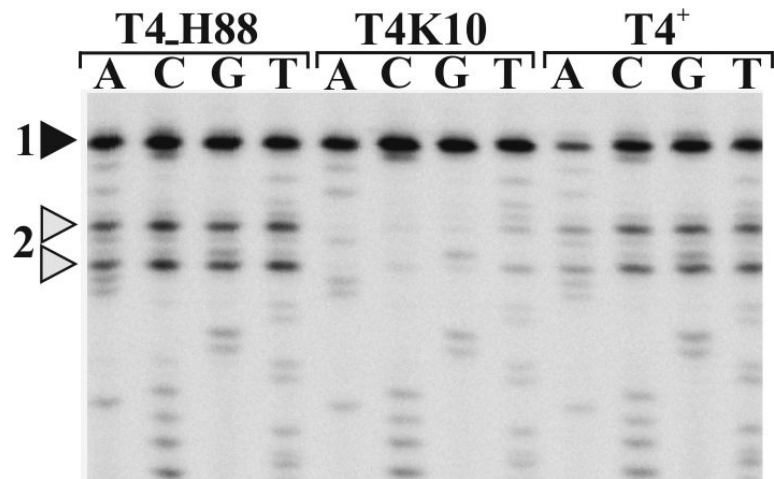
Rekombinantiniai baltymai RnaG ir EF-Tu, indukuoti kartu su riboziltransferaze ModB, net po 5 val. pakinta nežymiai, lyginant su tais pakitimais, kurie fago infekcijos metu atsiranda per 5-10 min. Tai rodo, kad ir kiti kol kas nenustatyti fago baltymai gali turėti įtakos tiek ribonukleazių modifikavimui, tiek ir transkriptų metabolizmui faginės infekcijos metu. Todėl, lygiagrečiai su baltymų modifikavimo tyrimais, buvo tiriami įvairių fago T4 delecinių mutantų transkriptai. Tyrimams pasirinkti tokie mutantai, kurie turėjo delecijas nežinomos funkcijos genų srityse. Tokiu būdu tikėjomės rasti mutantą, kurio RegB kirpti transkriptai nebūtų hidrolizuojami antrinių skėlimo taikinių vietose.

### **3.5.3. Bakteriofago T4 delecinių mutantų transkriptų tyrimas**

Siekiant nustatyti, koks fago T4 koduojamas veiksnys gali turėti įtakos RegB kirptų ankstyvųjų transkriptų antriniam skėlimams, buvo nuspręsta infekuoti *E. coli* ląsteles laboratorijoje esančiais įvairiais fago T4 deleciniais mutantais, o esant poreikiui sukurti ir daugiau mutantų bei atlikti jų ankstyvųjų



mRNR tyrimus. Tyrimų modeliu pasirinkome *nrdC.3* transkriptus, kurių antriniai kirpimai būna gana ryškūs ir priklausomi tik nuo RNazės G. Tyrimai buvo vykdomi *nrdC.3* mRNR sekoskaitos metodu. Įvairių fago T4 mutantų transkriptų tyrimo eigoje buvo pastebėta, kad užkrėtus ląsteles mutantiniu fagu T4K10, RegB kirptų transkriptų antriniai skėlimai neatsiranda (24 pav.). Mutantinis fagas T4K10 buvo gautas iš vieno I/S sistemos autorių – dr. K. N. Kreuzer. I/S sistema buvo sukurta tikslingam mutacijų įvedimui į fago genomą (Selic ir kt., 1988). Yra žinoma, jog šio fago genome yra būtinųjų genų 38 ir 51 *amber* mutacijos, genuose *denA* ir *denB* yra juos inaktyvuojančios taškinės mutacijos bei delecija  $\Delta rIIP8$ , dėl kurios fago genome nėra dvylikos genų, kurių daugumos funkcijos nežinomos. Buvo padaryta prielaida, kad vienas iš pašalintųjų genų galėtų koduoti veiksnį, darantį įtaką RNazių aktyvumui. Mūsų laboratorinėje kolekcijoje yra keletas T4 mutantinių fagų, iš kurių genomo buvo pašalinti kai kurie  $\Delta rIIP8$  srities genai. Vienas iš tokių fagų - delecinis mutantas T4\_H88, neturintis *rIIB* geno. *E. coli* B<sub>E</sub> kamieno ląstelės buvo infekuotos bakteriofagais T4, T4K10 arba T4\_H88. Išskirta bendroji RNR buvo analizuojama su specifiniu genui *nrdC.3* pradmeniu. Buvo nustatyta, kad genas *rIIB* nedaro įtakos RNazių aktyvumui faginių transkriptų atžvilgiu (24 pav.). Klonuojant ir atliekant komplementacijos tyrimus, taip pat buvo patikrinti ir kiti šios srities genai, tačiau rezultatai irgi buvo neigiami (rezultatai nepateikti).



**24 pav. Fago T4 ir jo mutantų *nrdC.3* transkriptų analizė.** Pradmens ilginimo reakcijai buvo panaudota bendroji ląstelės RNR, išskirta iš *E. coli* C41(DE3) kamieno 5 min (30 °C) po infekcijos bakteriofagais T4\_H88, T4K10 arba T4<sup>+</sup>. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideoksinukleotidų takeliai. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus.

Iš literatūros duomenų buvo žinoma, jog T4K10 mutantas buvo sukonstruotas kryžminant atskirų genų mutantus, gautus cheminės ar UV mutagenezės būdu (Selick ir kiti, 1988). Dėl to jis gali turėti ir daugiau nenustatytų mutacijų kituose genuose. Vienas iš kandidatų, galinčių turėti įtakos antrinių kirpimų atsiradimui galėtų būti fago T4 geno *pseT* koduojamas fermentas polinukleotidkinazė (PNK), kuri geba fosforilinti tRNR<sup>Lys</sup> antikodono 5' OH grupę, paliktą po nukleazės PrrC skėlimo (Amitsur ir kt., 1987). Tai buvo vienintelė iki šiol žinoma biologinė T4 PNK funkcija.

Fago T4 ankstyvojo geno *pseT* koduojamas baltymas PNK (Sirotkin ir kt., 1978) katalizuoja  $\gamma$ -fosfatinės grupės pernašą nuo adozintrifosfato (ATP) arba nuo kitų nukleozidtrifosfatų (Novogrodsky ir kt., 1966) ant polinukleotidų 5'-hidroksilo grupės (Richardson, 1965). Be to, PNK turi 3'-fosfatazės aktyvumą, kuris yra nepriklausomas nuo ATP (Cameron ir Uhlenbeck, 1977; Sirotkin ir kt., 1978) ir gali hidrolizuoti 2',3'-ciklines fosfodiesterines jungtis.

Buvo iškelta hipotezė, kad PNK gali fosforilinti ir informacinių RNR 5'-OH grupę taip, kad monofosfatus turintys transkriptai taptų tinkamais substratais RNazėms E ir G. Tokiu atveju, fago T4K10 PNK turėtų būti defektyvi. Todėl pirmiausiai nusprendėme nustatyti fago T4K10 geno *pseT*

seką ir patikrinti, ar jis neturi mutacijų. Nustačius geno *pseT* nukleotidinę seką, buvo rastos dvi taškinės mutacijos, keičiančios aminorūgštis: glicinas keičiasi į asparto rūgštį (G14D) bei argininas į histidiną (R229H). Pirmoji pakaita yra įvykusi konservatyvioje padėtyje, o antroji – nekonservatyvioje (25 pav.).

T4	MKKIILITIGCPGSGKSTWAREFIAKNPG-FYNINRDDYRQSIMAHE-ERDEYKYTKKKEG	58
T4K10	MKKIILITIGCPGSDKSTWAREFIAKNPG-FYNINRDDYRQSIMAHE-ERDEYKYTKKKEG	58
RB69	MKKIILITVGCPSGKSTWAREFIAKNPG-FFNINRDDYRQSIMGHE-ERDEYKYTKKKEG	58
AeH1	MPYIELTVGVSSSGKSTYARSEVKKSRGLLVEVNRDNTRKSLFAIG-GWGEYKFNNDREN	59
RB43	-MNLIIITVGVPGSGKTTWAKEKAREMGN-TLTVSRDDIRRTLYCAGGDLTYRFTTEKEN	58
	: :*: * ..*.*:*:*: . : . : .*: * : : : * : : : : : *	
T4	IVTGMQFDTAKSILYGGDSVKGVIIISDTNLPERRLAWETFAKEYGWKVEHKVFDVDPWTE	118
T4K10	IVTGMQFDTAKSILYGGDSVKGVIIISDTNLPERRLAWETFAKEYGWKVEHKVFDVDPWTE	118
RB69	IVTYMQHDAAHMILCQ-DGTKGVIIISDTNLPERRLGWEKYANQWGHVVYQVFDVDPWTE	117
AeH1	LVS---AANEAMIVAAAINAKKNI I IISDTNLPVYRKQWQELAAVEGEYRELFWNVELDE	116
RB43	LVT---KLQADIVLNLALASGKNVIVHNTHLKKGDHVVYKELAKYTKVDFHIEWMDADIVE	115
	: *: : : : : : : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
T4	LVKRNSKRGTKAVPIDVLRSMYKSMREYLG-----LPVYNGTPGKPKAVIF	164
T4K10	LVKRNSKRGTKAVPIDVLRSMYKSMREYLG-----LPVYNGTPGKPKAVIF	164
RB69	LVKRNAKRGTKTVPIDVPRSMYSRMREYKG-----LPVYKGTGPKPKAVIF	163
AeH1	LLARNKTRGPWKLDPERVKSMHERFVEQFNPEVHTSYVPDFAAETELYEPSTALPTAVMF	176
RB43	LLKRNHKRGVNLVPSRLWEMFEQYRKLRG-----WVPAMQFADPSKPKCVIF	163
	* : * * . * * : . . * . . : . : . . * . . * : *	
T4	DVDGTLAKMNGRGPYDLEKCDTDVINPMVVVELSKMYALMGYQIVVVSGRESGTEKDPTKY	224
T4K10	DVDGTLAKMNGRGPYDLEKCDTDVINPMVVVELSKMYALMGYQIVVVSGRESGTEKDPTKY	224
RB69	DLDGTLALHVARGPYELDKLSTDAPNPMVVEYVKMLHQAGYTIITVSGRESGTEKEDSMCY	223
AeH1	DTDGTTAHMHNRRGPFWEVDKVGQDLPKYVINHAKDLKARGVTIINLSGRDGCCKEATAEW	236
RB43	DVDGTLTKVQQRSPYDFTKVIDDPANPVQELFRMYKAAGYACVVVSGREGTEQCAHDTK	223
	* * * * : * . * : : * * : * : : * : : * : : * * : : * * : *	
T4	YRMTKRWVEDIAGVPLVMQCQREQDTRKDDVVKEEIFWKHIAPHFDVKLAIDDRTQVVE	284
T4K10	YRMTKRWVEDIAGVPLVMQCQREQDTRKDDVVKEEIFWKHIAPHFDVKLAIDDRTQVVE	284
RB69	YEATKRWMSDFS-IPWEMHIQRNQDTRKDDVVKEELFWNCIAPYYDVKLAVDDRNVVE	282
AeH1	YKKVG-----MPCDFHFQREAGDQRDDVIKKEIFFRDIAPKFNVLAVDDRKKVVD	288
RB43	ASLTAAYDVD-----LSDGIFMREEGDRHDFYVKEQILVEKILDKYYPVLAVDDRTPVG	278
	. : * * * * : * : : : . * : * : * * * *	
T4	MWRRIGVECWQVASGDF	301
T4K10	MWRRIGVECWQVASGDF	301
RB69	MWRRIGLECWQVNHGDF	299
AeH1	MWRSLGLECWVQDSNF	305
RB43	MWRMNGI PCFQVDYGDF	295
	* * * * : * : * * : * : *	

**25 pav. Bakteriofago T4 natyvaus geno *pseT* koduojamų aminorūgščių palyginimas su mutantinio fago T4K10 bei kitų T4 giminingų bakteriofagų koduojamų PNK sekomis.** Juodame fone pažymėtos T4K10 PNK aminorūgščių pakaitos. Sekos apačioje pateikiamas amino rūgščių palyginimas programa ClustalW, kurią galima rasti internete adresu [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/). Žvaigždute (\*) žymimos identiškos aminorūgštys, dvitaškiu (:) funkciškai panašios amino rūgštys, tašku (.) mažiau panašios aminorūgštys.

Būtiniosios aminorūgštys, formuojančios kinazės domeno aktyvųjį centrą yra K15, S16, D35, R38, D85 ir R126 (Wang ir Shuman, 2002). G14D pakaita yra vadinamojoje A dėžutėje, kurios motyvas GXXGXGKS (pažymėta ar. fago

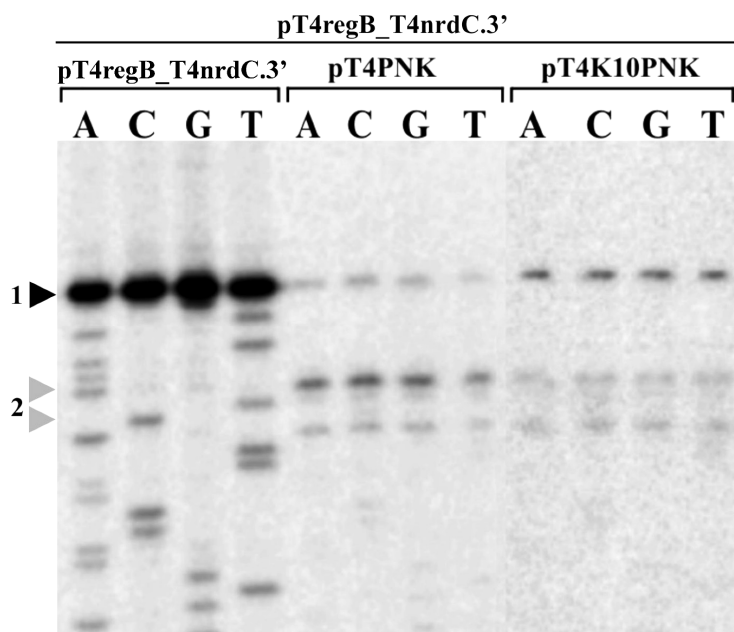
T4K10 atveju yra pakitusi), o ši glicino aminorūgštis yra itin konservatyvi net tarp labai nutolusių organizmų koduojamose nuo NTP-priklausomose fosfohidrolazėse ir fosfotransferazėse (Wang ir Shuman, 2002), todėl tikėtina, kad jos pakaita G14D gali pažeisti PNK kinazės aktyvumą. Antroji mutacija R229H gali būti nereikšminga, nes ji yra įvykusi toli nuo fermento aktyviųjų centrų ir nėra konservatyvi net tarp giminingų T4 bakteriofagų (25 pav.).

### **3.5.4. Fago T4 PNK įtakos RegB kirptų transkriptų degradacijai tyrimas**

#### **3.5.4.1. Tyrimas dviplazmidinėse sistemose**

Ankstesnių tyrimų metu buvo parodyta, kad nuo plazmidės pT4regB-T4nrdC.3' indukuoti *nrdC.3* transkriptai yra efektyviai hidrolizuojami pirminių taikinių vietose, tačiau antriniai skėlimo taikiniai aptikti nebuvo. Jie atsirasdavo tik plazmidinę sistemą turinčias ląsteles infekavus fagu T4. Siekiant nustatyti, ar tikrai PNK yra atsakinga už RegB kirptų transkriptų 5' OH grupės fosforilinimą ir ar nustatytos mutacijos turi įtakos jos aktyvumui, įterpėme fago T4<sup>+</sup> bei mutanto T4K10 *pseT* genus į plazmidinius ekspresijos vektorius p184-21-1 (4 lentelė, psl. 50).

Gautos rekombinantinės plazmidės pT4PNK arba pT4K10PNK buvo transformuotos į *E. coli* C41(DE3) kamieno ląsteles kartu su pT4regB-T4nrdC.3' ir vykdoma koekspresija. Indukavus genų raišką dviplazmidinėse sistemose, buvo išskirta bendroji ląstelės RNR ir nustatomos *nrdC.3* transkriptų sekos dideksiterminacijos metodu, naudojant P<sup>32</sup>-žymėtą pradmenį, komplementarų *nrdC.3* transkriptui (26 pav.).



**26 pav. Fago T4 arba T4K10 PNK įtakos antrinių skėlimų atsiradimui tyrimas dviplazmidinėse sistemose.** Pradmens ilginimo reakcijai buvo panaudota bendroji ląstelės RNR, išskirta iš *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelių, turinčių plazmidės pT4regB-T4nrdC.3' arba pT4regB-T4nrdC.3' ir pT4PNK, arba pT4regB-T4nrdC.3' ir pT4K10PNK. Transkriptai nuo atitinkamų rekombinantinių plazmidžių buvo indukuoti įnešant 1 mM IPTG. Ląstelių mėginiai buvo imti 30 min po indukcijos IPTG. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideoksinukleotidų takeliai. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus.

Nustatyta, kad sistemoje esant rekombinantinėms plazmidėms pT4PNK ir pT4regB-T4nrdC.3', AMV atvirkštinės transkriptazės sustojimai yra matomi tose pačiose vietose kaip ir transkriptuose, išskirtuose bakterijų kultūrą infekavus fagu T4<sup>+</sup> (26 pav.). Dviplazmidinėje sistemoje esant plazmidėms pT4K10PNK ir pT4regB-T4nrdC.3' antriniai skėlimai taip pat atsiranda, tačiau ne tokie ryškūs kaip esant infekcijai fagu T4 arba koekspresijai su pT4PNK (26 pav.). Taigi, panašu, kad išlieka dalinis T4K10 PNK aktyvumas, kurio esant baltymo pertekliui užtenka funkcijai atlikti.

Apibendrinus gautus rezultatus galima teigti, kad PNK yra fago T4 koduojamas veiksnys, lemiantis antrinių skėlimo taikinių atsiradimą. Net ir be faginės infekcijos, tik plazmidinėje sistemoje sintetinės PNK užtenka, kad geno *nrdC.3* transkriptai būtų fosforilinami ir dėl to atpažįstami bakterijos koduojamų endoribonukleazių bei hidrolizuojami antrinių taikinių vietose. Šie tyrimai taip pat įrodė, kad RNazės G modifikavimas fago T4 infekcijos metu

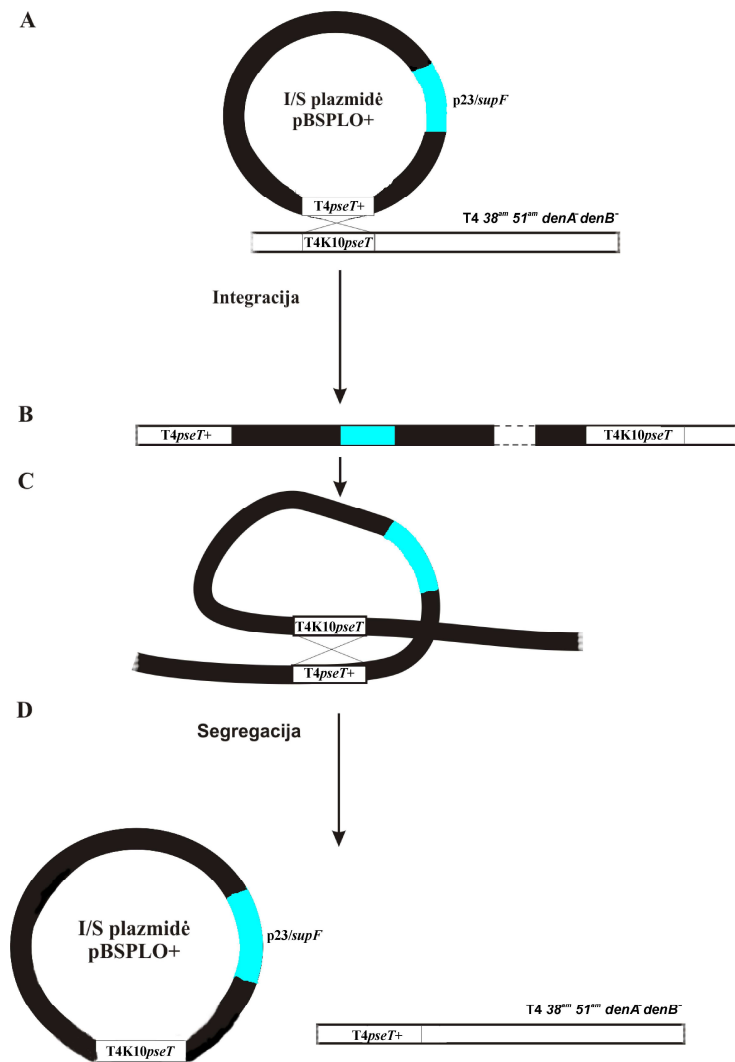
neturi įtakos antriniams kirpimams, nes plazmidinėje sistemoje ji buvo nemodifikuota, bet kirpo RegB hidrolizuotų transkriptų antrinius taikinius.

#### **3.5.4.2. Fago T4K10 *pseT* geno mutacijų atstatymas genome**

Iš atliktų tyrimų nebuvo aišku, kuri iš mutacijų lemia dalinį fago T4K10 polinukleotidkinazės funkcijos netekimą, dėl to buvo nuspręsta sukurti viengubus fago T4K10 *pseT* mutantus, kurių PNK turėtų ar. pakaitą vien 14 arba 229 padėtyje, o taip pat gauti T4K10 fagą su pilnai atstatytu natyviu *pseT* genu.

Norint pakeisti mutacijas turintį fago T4K10 *pseT* geną nemutuotu fago T4 *pseT* variantu, buvo naudojama įterpimo/pakeitimo (I/S) sistema (Selick ir kt., 1988). I/S sistemą sudaro specialus plazmidinis vektorius pBSPLO+ bei fagas T4K10. Įterpimo/pakeitimo sistemos vektorius – plazmidė pBSPLO+ yra 2638 bp vektorius, turintis pBR322 ori, atsparumo ampicilinui geną, daugybinio klonavimo regioną bei sulietą p23/*supF* geną, reikalingą fago *amber* mutacijų supresijai. Fago T4K10 genome esančios būtinųjų genų 38 ir 51 *amber* mutacijos reikalingos fagų, į kurių genomą įsiterpė pBSPLO+ plazmidė su *supF* genu, atrankai *E. coli* nesupresuojančiuose kamienuose. T4K10 genome esančios nukleazių *denA* ir *denB* mutacijos apsaugo nemodifikuotą DNR (t.y. ir plazmidinę DNR) nuo degradacijos šio fago infekcijos metu (Selick ir kt., 1988; Selick ir Kreuzer, 1994).

Į plazmidinį vektorių pBSPLO+ įterpus natyvų fago T4 geną *pseT* su aplinkinėmis sekomis (4 lentelė, psl. 50), gauta rekombinantinė plazmidė pBSPLO\_T4PNK, kuri buvo transformuota į *E. coli* MH1 kamieno ląsteles bei infekuota fagu T4K10. Homologinės rekombinacijos būdu tarp plazmidėje esančio fago T4 geno *pseT* DNR sekų ir fago T4K10 genome esančio geno *pseT* DNR sekų (27 pav.), pavyko atskirti *pseT* gene esančias mutacijas, t.y. buvo gauti T4K10 fagai, kurių PNK turėjo tik po vieną ar. pakaitą arba 14 (fagas T4K10M14), arba 229 (fagas T4K10M229) padėtyje.

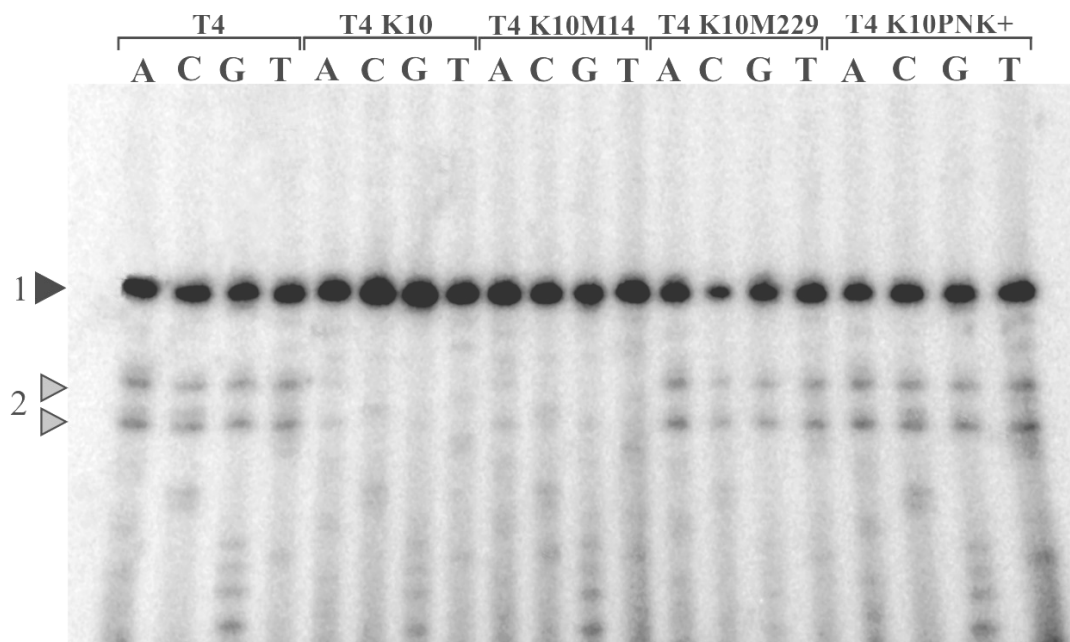


**27 pav. Fago T4 genų įterpimo/pakeitimo (I/S) sistemos panaudojimo schema. A)** Į pBSPLO+ plazmidę klonuojamas natyvus fago T4 *pseT* genas. Bakterijos ląstelės, turinčios rekombinantinę plazmidę yra infekuojamos bakteriofagu T4K10. **B)** Vykstant homologinei rekombinacijai tarp plazmidėje esančio fago T4 geno DNR sekų ir fago T4K10 genome esančio geno DNR sekų plazmidė integruojasi į fago genomą. Kadangi fago T4 būtinųjų genų *amber* mutacijos yra supresuojamos plazmidėje esančio SupF, integrantai gali būti atrinkti pagal jų gebėjimą vystytis nesupresuojančiuose *E. coli* kamienuose. Neturintys įsiintegravusios plazmidės fagai vystytis negali. **C-D)** Fagams integrantams vystantis supresuojančiame *E. coli* kamiene plazmidinis vektorius su geno DNR seka tarpmolekulinės rekombinacijos dėka segreguoja iš fago geno, kuriame lieka arba buvusi, arba nauja geno kopija (Selick ir kt., 1988).

Naudojant I/S sistemą natyvaus *pseT* geno atstatyti nepavyko, dėl to buvo nuspręsta naudoti fagų kryžminimo metodiką. *E. coli* MH1 kamieno ląstelės buvo infekuotos fagais T4K10M14 ir T4K10M229 (MOI 3) ir kultūra buvo auginama 2 val. Infekcijos metu homologinė rekombinacija vyko tarp mutuotų *pseT* DNR, kurios metu atsistatė laukinio tipo geno *pseT* seka. Gautas mutantinis fagas buvo pavadintas T4K10PNK+.

### 3.5.4.3. Viengubų T4K10 *pseT* geno mutantų *nrdC.3* transkriptų analizė

Norint nustatyti, kuri mutacija yra atsakinga už PNK funkcijos susilpnėjimą, buvo tiriami sukonstruotų viengubų *pseT* geno mutantų *nrdC.3* transkriptai. *E. coli* ląstelės buvo infekuojamos bakteriofagais T4<sup>+</sup> (kontrolė), T4K10 (kontrolė), T4K10M14, T4K10M229 ir T4K10PNK<sup>+</sup>, ir po 6 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama RNR, kuri po to buvo analizuojama nustatant jos sekas dideoksiterminacijos metodu, naudojant P<sup>32</sup>-žymėtą genui *nrdC.3* specifinį pradmenį. Buvo nustatyta, jog antriniai skėlimai *nrdC.3* transkripto priešgeninėje srityje atsiranda tik tada, kai bakterija-šeimininkė būna infekuota bakteriofagais T4<sup>+</sup>, T4K10M229 ir T4K10 PNK<sup>+</sup>. *E. coli* ląsteles infekavus fagais T4K10 bei T4K10M14 antriniai skėlimai nėra matomi (28 pav.).



**28 pav. Fago T4 ir jo *pseT* geno mutantų *nrdC.3* transkriptų tyrimas.** Pradmens ilginimo reakcijai buvo panaudota bendroji ląstelės RNR, išskirta iš *E. coli* C41(DE3) kamieno 6 min (30 °C) po infekcijos bakteriofagais T4<sup>+</sup>, T4K10, T4K10M14, T4K10M229, T4K10PNK<sup>+</sup>. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideoksinukleotidų takeliai. Dešinėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus.



Gauti duomenys rodo, kad G14D mutaciją turinti PNK nestimuliuoja RNazės G aktyvumo. Ši mutacija yra PNK 5'-kinazės domene, todėl greičiausiai yra pažeista 5' kinazės funkcija.

Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad PNK esanti ATP prisijungimo kišenė formuojama elektrostatiinių sąveikų pagalba. Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad mutacija G14A įtakos kinaziniam aktyvumui neturi (Wang ir Shuman, 2002), tuo tarpu aminorūgščių K15A, S16A ir R126A pakaitos veikia PNK aktyvumą, nes suardo ATP prisijungimo vietą (Galburt ir kt., 2002). Tačiau T4K10 PNK esanti pakaita G14D turi įtakos PNK aktyvumui. Taip gali būti dėl to, kad tiek glicinas, tiek alaninas yra nepolinės neutralios ar., tuo tarpu asparto rūgštis yra polinė ar., turinti neigiamą krūvį ir didesnę šoninę grandinę. Be to, šalia esantis K15 (lizinas) yra polinė teigiamą krūvį turinti aminorūgštis, o elektrostatiniai ryšiai susidaro ir tarp įkrautų šoninių ar. grupių. Taigi susidariusi elektrostatinė sąveika tarp asparto rūgšties bei lizino ar. liekanų gali suardyti ATP prisijungimo vietą ir taip paveikti fago T4K10 PNK 5' kinazės aktyvumą, nes net labai maži baltymo konformacijos pasikeitimai gali sukelti fermento funkcijos pokyčius. Tuo tarpu, R229H pakaita yra įvykusi PNK 3'-fosfatazės nekonservatyvioje padėtyje, todėl greičiausiai nesutrikdė šios funkcijos arba ji yra nesvarbi RNazės G stimuliavimui.

Ankstesni tyrimai rodė, kad fago T4K10 PNK funkcijos netekimas yra dalinis, ir esant baltymo pertekliui, PNK gali atlikti savo funkciją, todėl buvo nuspręsta gauti rekombinantinius T4 ir T4K10 PNK baltymus ir iširti jų 5' kinazinį aktyvumą *in vitro*.

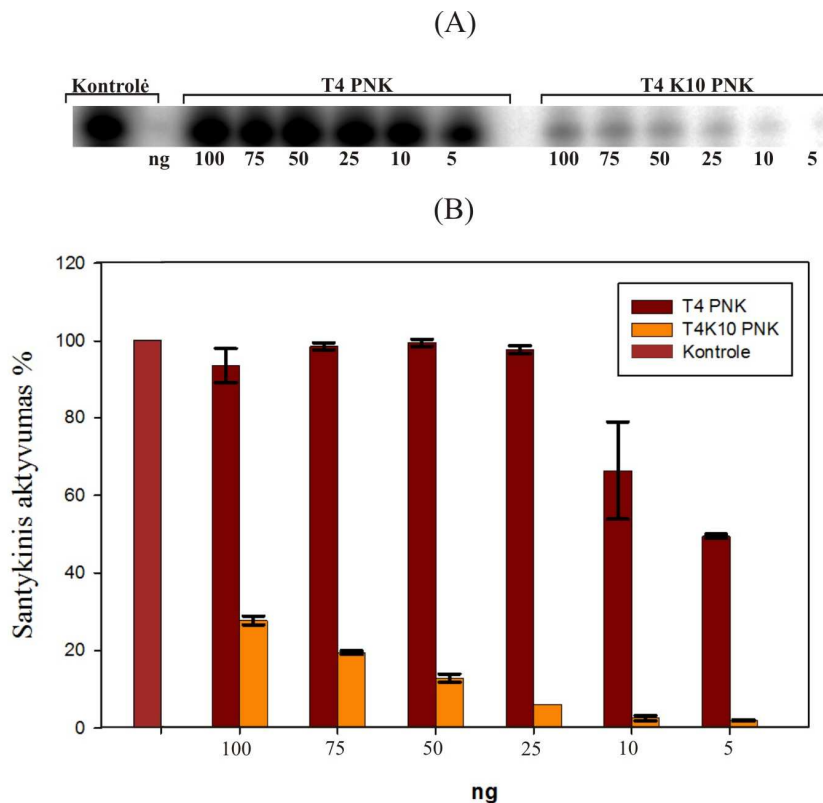
#### **3.5.4.4. Rekombinantinių T4 PNK ir T4K10 PNK *in vitro* aktyvumo tyrimai**

Siekiant įsitikinti, kad tikrai yra pažeista T4K10 PNK 5' kinazės funkcija, nusprendėme išgryninti rekombinantinius T4<sup>+</sup> ir T4K10 PNK baltymus ir patikrinti jų 5' kinazinį aktyvumą *in vitro*. Tam tikslui fagų T4 ir T4K10 *pseT* geną įterpėme į plazmidinį ekspresijos vektorių pET16b, N-gale suliedami jo

koduojamą baltymą su 10 histidinių (4 lentelė, psl. 50), nes pagal literatūros duomenis His inkaras neturi įtakos PNK struktūrai bei funkcijoms (Wang ir Shuman, 2002).

Rekombinantinės plazmidės pET16b\_T4PNK ir pET16b\_T4K10PNK buvo transformuotos į *E. coli* C41(DE3) kamieną, atlikta įterptų genų produktų indukcija, ląstelių kultūros surinktos, suardytos ultragarsu, ir išgryninti N-galinėse dalyse 10 His turintys baltymai. Rekombinantinių T4 bei T4K10 PNK baltymų koncentracija buvo įvertinta Bredfordo metodu.

Rekombinantinių baltymų 5'-polinukleotidkinazės aktyvumas buvo tikrinamas atliekant oligonukleotido, turinčio 5' gale OH grupę, *in vitro* fosforilavimo reakciją. Fosfato donoru buvo naudojamas  $\gamma$ -P<sup>32</sup>-žymėtas ATP. Kontrole buvo pasirinktas fago T4 PNK įsigytas iš Thermo Scientific. Fermentinės oligonukleotido žymėjimo [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]ATP reakcijos atliktos naudojant kelias išskirtų rekombinantinių baltymų koncentracijas, siekiant išvengti baltymo pertekliaus, kuris maskuotų rezultatus. Reakcijos produktai buvo išfrakcionuoti poliakrilamidiniame gelyje ir įvertinta, kiek skiriasi fago T4 ir T4K10 PNK aktyvumai (29 pav.).



**29 pav. Bakteriofagų T4 ir T4K10 PNK 5' kinazinio aktyvumo palyginimas.** A) T4 ir T4K10 PNK aktyvumo tyrimas atlikus pradmens žymėjimo  $P^{32}$  reakciją. B) Fago T4 ir T4K10 PNK 5' kinazinio aktyvumo įvertinimo grafinė išraiška.

Atlikus tyrimą, buvo nustatyta, kad nesant baltymo pertekliaus, mutuota fago T4K10 PNK turi liekamąjį 5' kinazės aktyvumą, tačiau jis siekia tik apie 5 % natyvios T4 PNK aktyvumo. Tai padėjo suprasti, kodėl į *E. coli* transformavus plazmides pT4K10PNK ir pT4regB-T4nrdC.3' ir vykdant koekspresiją, antriniai kirpimai taip pat atsiranda, nors ir žymiai silpnesni nei infekuojant bakteriofagu T4 arba sistemoje esant plazmidei T4PNK (žr. 3.5.4.1. sk. 98 psl. 26 pav.). Indukavus genų raišką nuo plazmidės, susidaro perteklinis PNK kiekis, dėl to užtenka ir liekamojo T4K10 PNK aktyvumo, kad turinti mutacijų polinukleotidkinazė galėtų fosforilinti transkriptų 5' OH grupę ir taip stimuliuoti RNazės G funkciją.

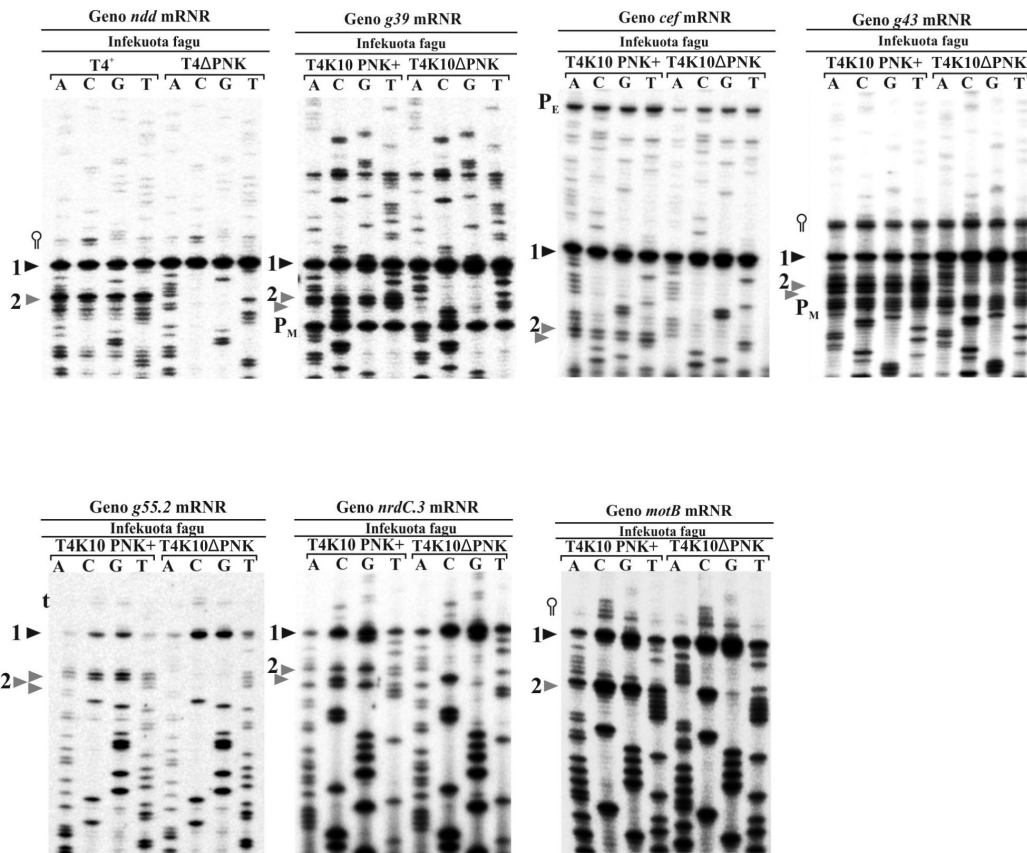
### 3.5.4.5. Fago T4 *pseT* delecinių mutantų konstravimas ir PNK įtakos RegB kirptiems transkriptams tyrimas

Ankstesnių tyrimų metu nustatėme, kad septynių fago T4 genų, *ndd*, *nrdC.3*, *55.2*, *cef*, *motB*, *g43* ir *g39*, transkriptai yra hidrolizuojami veikiant fago RegB ir *E. coli* RNazėms E ir G kartu. Be to, RNazės G aktyvumą RegB kirptų *nrdC.3* transkriptų atžvilgiu lemia T4 PNK 5' kinazinis aktyvumas. Norint nustatyti, ar polinukleotidkinazė turi įtakos visų minėtų transkriptų kirpimui RNazių E/G pagalba, buvo sukurti deleciniai fago T4<sup>+</sup> ir T4K10 PNK mutantai (T4ΔPNK ir T4K10ΔPNK), ir atlikti šių fagų minėtų ankstyvųjų transkriptų tyrimai.

Delecinių mutantų konstravimui buvo naudota įterpimo/pakeitimo (I/S) sistema (Selick et al., 1988). Delecijos buvo konstruojamos sujungiant pBSPL0+ plazmidėje PGR būdu gautus T4 genomo fragmentus, supančius norimą panaikinti geną *pseT*. Šios fago T4 DNR sekos reikalingos homologinei rekombinacijai tarp plazmidės ir fago genomo. Gautos plazmidės (4 lentelė, psl. 50) buvo naudotos delecijai įvesti į genomą homologinės rekombinacijos tarp plazmidėje esančių T4 DNR sekų ir fago T4K10 genomo būdu. Taip buvo gautas fagas T4K10ΔPNK, kurį kryžminant su T4<sup>+</sup> kelis kartus, buvo prarastos T4K10 mutacijos ir atsirinktas fagas T4ΔPNK.

Tikrinant, ar PNK turi įtakos antrinių skėlimų atsiradimui minėtuose septyniuose transkriptuose, *E. coli* C41(DE3) ląstelės buvo infekuojamos bakteriofagu T4K10PNK<sup>+</sup> ir T4K10ΔPNK, o tiriant geno *ndd* transkriptą – fagu T4<sup>+</sup> ir T4ΔPNK (nes T4K10 ΔrIIPT delecija apima ir *ndd* geną), ir po 6 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama bendroji ląstelės RNR, kuri po to buvo analizuojama nustatant jos sekas dideoksiterminacijos metodu, naudojant P<sup>32</sup> žymėtus *ndd*, *nrdC.3*, *55.2*, *cef*, *motB*, *g43* ir *g39* transkriptams komplementarius pradmenis. Buvo nustatyta, jog antriniai skėlimai šių transkriptų priešgeninėse srityse atsiranda tik tada, kai bakterija-šeimininkė būna infekuota fagu, turinčiu veiklų *pseT* geną. *E. coli* ląsteles infekavus fagais

T4K10 $\Delta$ PNK bei T4 $\Delta$ PNK, antriniai skėlimai nematomi (30 pav.).



**30 pav. T4 $pseT^+$  ir T4 $\Delta pseT$  fagų transkriptų *ndd*, *39*, *cef*, *43*, *55.2*, *nrdC.3* ir *motB* tyrimas žymėto pradmens ilginimo metodu.** *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės buvo auginamos 30 °C, infekuojamos bakteriofagu T4K10PNK+ arba T4K10 $\Delta$ PNK ir po 6 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama bendroji ląstelės RNR. Geno *ndd* atveju bendroji ląstelės RNR buvo išskirta po infekcijos fagu T4 $^+$  arba T4 $\Delta$ PNK. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus. Geno *55.2* atveju raidė t žymi RT sustojimą ties rho-priklausomu terminatoriumi (Miller ir kt., 2003). Stiebo kilpos struktūros genų *ndd*, *43*, ir *motB* atveju žymi AT sustojimus ties segtuko struktūra. P<sub>E</sub> simboliu pažymėti ankstyvųjų transkriptų pradžios nukleotidai, o P<sub>M</sub> simboliu pažymėti viduriniųjų transkriptų pradžios nukleotidai.

Tiriant geno *motB* transkriptus, antriniai kirpimai buvo pastebimi ir esant infekcijai fagu T4K10 $\Delta$ PNK. Tačiau esant infekcijai fagu T4K10PNK+, skėlimai antriniuose taikiniuose yra žymiai ryškesni, nei transkriptuose, išskirtuose iš fagu T4K10 $\Delta$ PNK infekuotų ląstelių. Tai rodo, kad fago T4 geno *motB* transkriptas gali būti hidrolizuojamas ir kitokiu, nepriklausomu nuo PNK būdu. Geresnį prieinamumą RNazei G gali lemti šio taikinio bei visos jo mRNR struktūra ar silpnesnės sąveikos su kitais baltymais.

Apibendrinant gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad fago koduojama PNK turi įtakos visų tirtų transkriptų hidrolizei ties antrinais skėlimo taikiniai. Ji fosforilina visų tirtų fago ankstyvųjų genų transkriptų 5' OH galines grupes, likusias po endoribonukleazės RegB kirpimo, ir taip sukuria substratus *E. coli* koduojamoms RNazėms G/E, kurios toliau hidrolizuoja monofosforilintus transkriptus.

#### **3.5.4.6. PNK įtakos ankstyvųjų fago T4 transkriptų degradavimui tyrimas**

Bakteriofagų koduojamų mRNR apykaita yra labai greita, dėl to fagai gali efektyviai keisti genų raiškos pobūdį skirtingų infekcinio ciklo stadijų metu. Priklausomai nuo struktūros, mRNR pasižymi skirtingu stabilumu. Jos degradacijos greitis priklauso nuo ribonukleazių koncentracijos, mRNR struktūroje apspręstų atpažinimo vietų bei veiksnių, galinčių daryti įtaką RNazių ir mRNR sąveikoms.

Norint nustatyti, kaip fago koduojama PNK daro įtaką ankstyvųjų transkriptų degradacijai, buvo tiriama jų kaupimosi ląstelėje kinetika. Analizei buvo pasirinktos *nrdC.3*, *motB* ir *g39* mRNR. *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės buvo infekuojamos bakteriofagais T4<sup>+</sup>, T4K10PNK<sup>+</sup> arba T4K10ΔPNK, ir buvo skiriama bendroji ląstelės RNR. RNR buvo skiriama 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15 ir 20 min nuo infekcijos pradžios, po to pasirinkti transkriptai buvo analizuojami P<sup>32</sup> žymėto pradmens ilginimo metodu. Kaip kontrolė buvo naudotos 6 min po fago T4<sup>+</sup> infekcijos išskirtos mRNR.

Pagal elektroforezės duomenis buvo nustatyta, kad skėlus mRNR endoribonukleazei RegB (1-3 min nuo infekcijos pradžios), ties antrinais taikiniai kirpti transkriptai pastebimi nuo 5 min (po infekcijos pradžios), piką pasiekdami 7-10 min (po infekcijos pradžios) (32, 33, 34 pav. A). Be to, elektroforezės duomenys rodo, kad fago T4K10ΔPNK infekcijos eigoje RegB kirpti transkriptai yra stabilesni. Tačiau šis tyrimas buvo netikslus ir atskleidė tik patį degradacijos pobūdį, todėl buvo nuspręsta transkriptų degradaciją laike

tirti kiekybinio tikro laiko PGR metodu (kPGR).

Kiekybinis PGR metodas yra labai jautrus ir tikslus, dėl to galima tirti net labai nežymius genų raiškos pokyčius. Iki šiol yra labai mažai duomenų apie kPGR panaudojimą tiriant bakteriofagų genų raišką. Taip yra dėl kelių priežasčių. Viena svarbiausių yra tinkamos vidinės kontrolės arba vidinio standarto nebuvimas. Kontrolinei RNR keliami reikalavimai yra šie:

- a) ji turi turėti tokį pat kopijų skaičių visose ląstelėse;
- b) ji turi būti ekspresuojama visose ląstelėse.

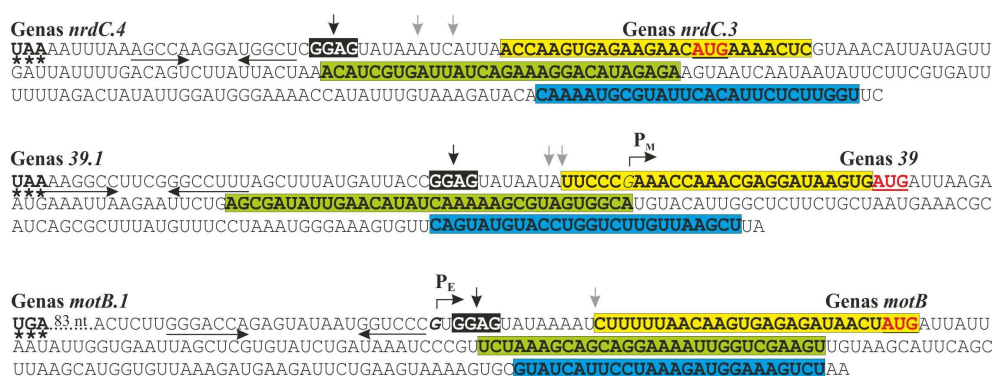
Bakteriofagų genome nėra tokio geno, kuris būtų ekspresuojamas viso infekcinio ciklo metu. Tiriant bakteriofagų genų raišką, vidine kontrole dažniausiai renkamasi 16S rRNR, tačiau jos transkriptų yra žymiai daugiau nei bet kurių kitų tiriamų bakteriofago arba bakterijos-šeimininkės genų transkriptų (Clokic, 2009). Daugybės tyrimų duomenys parodė, kad net „namų ūkio“ (hous-keeping) genai yra reguliuojami ir varijuoja eksperimentinių sąlygų metu (Bhatia ir kt., 1994; Bereta ir kt., 1995; Chang ir kt., 1998; Thelin ir kt., 1999). Kadangi mūsų tikslas buvo ne nustatyti tikslų transkriptų kopijų skaičių, o palyginti kaip kinta transkriptų kiekiai laike esant skirtingoms sąlygoms, t.y. esant PNK veiksniai arba jam nesant, buvo nuspręsta kaip kontrolę panaudoti mRNR, išskirtą iš bakteriofagų, turinčių veiklą *pseT* geną (T4K10PNK+), tuo tarpu tiriamieji transkriptai yra išskirti iš bakteriofagų neturinčių *pseT* geno (T4K10ΔPNK).

Yra du kiekybinės analizės būdai: absoliuti kiekybinė analizė ir santykinė kiekybinė analizė. Šiame tyrime transkriptų kiekiai buvo įvertinti santykinės kiekybinės analizės metodu, kai vertinamas pokytis tarp geno raiškos skirtingomis sąlygomis (pvz. esant PNK baltymui (standartas) ir nesant PNK (tiriamasis)). Santykinė kiekybinė analizė parodo, kaip pasikeitė tiriamojo geno raiška lyginant su kontrolinio varianto raiška. Be to, santykinė kiekybinė analizė nereikalauja žinomų koncentracijų standartų ir kontrole gali būti bet kuris transkriptas, jei tik jo nukleotidų seka yra žinoma.

Naudojant kPGR metodą itin svarbu tiksliai išskirti analizuojamą RNR, kadangi ji yra labai nestabili. *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės, buvo

auginamos 30 °C iki OD<sub>600</sub> = 0,8, tada buvo užkrečiamos bakteriofagais T4K10PNK+ arba T4K10ΔPNK (MOI 10). Pirmieji pavyzdžiai buvo imami praėjus 5 min po infekcijos pradžios (0 minutės pavyzdys), po to į terpę dedamas rifampicinas (12 μg/ml). Rifampicinas stabdo naujų transkriptų sintezę prisijungdamas prie RNR polimerazės β subvieneto (Calvori ir kt., 1965; Campbell, 2001). Naujų transkriptų sintezė buvo stabdoma tam, kad būtų galima stebėti transkriptų degradaciją laike, nemaskuojant rezultatų kitiems naujai sintetiniams transkriptams. Kiti pavyzdžiai buvo imami praėjus 3, 5, 7, 10 ir 20 min po transkriptų sintezės sustabdymo rifampicinu. Surinktos ląstelės buvo suardomos ir bendroji ląstelių RNR buvo skiriama naudojant ZR RNA MiniPrep™ rinkinį pagal gamintojų rekomendacijas. Likusi genomine DNR iš tiriamųjų mėginių buvo pašalinta inkubuojant mėginius su DNaze I. RNR koncentracija bei švarumas buvo įvertinamas spektrofotometrijos būdu, matuojant absorbciją UV šviesoje, esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiams.

kPGR amplifikacijos signalui nustatyti buvo nuspręsta naudoti dviejų pradmenų ir zondo sistemą, nes toks metodas yra specifiškesnis, nei naudojant du pradmenis ir įsijungiantį dažą. Pradmenų ir zondų kūrimo schema pateikta 31 pav. Pradmenys buvo patikrinti naudojant standartinį PGR metodą.



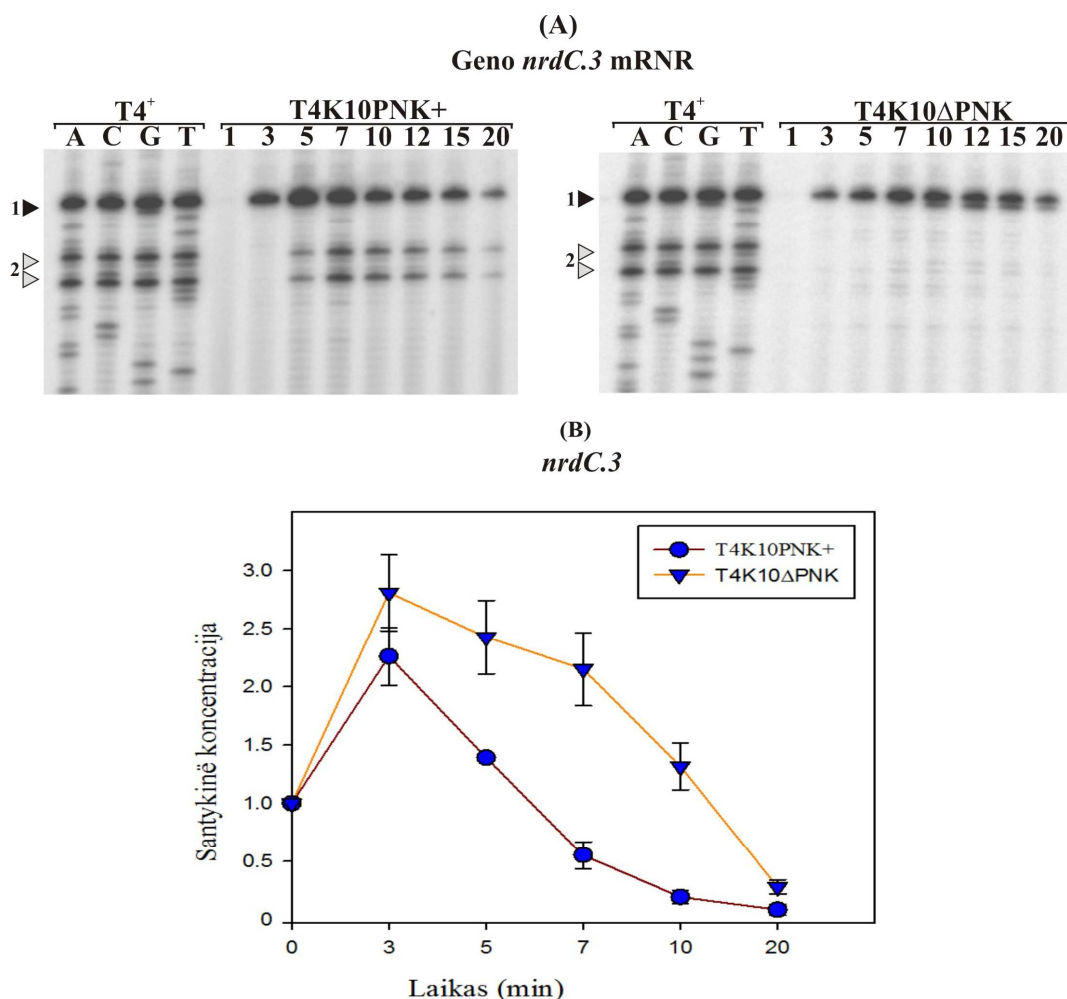
**31 pav. kPGR naudotų pradmenų ir zondų kūrimo schema.** Paveiksle pateiktos sričių prieš genus *nrdC.3*, *g39* ir *motB* nukleotidų sekos. GGAG motyvai yra pateikti juodame fone, iniciacijos kodonai yra pažymėti raudonai ir pabraukti, terminacijos kodonai esantys prieš genus yra paryškinti ir pažymėti žvaigždutėmis. Vieną į kitą rodančios rodyklės žymi palindrominių sekų invertuotus pakartojimus. Vertikalios juodos strėlės rodo RegB skėlimų vietas, o vertikalios pilkos strėlės žymi antrinių skėlimų vietas. P<sub>E</sub> simboliu pažymėti ankstyvosios transkripcijos iniciacijos nukleotidai, o P<sub>M</sub> simboliu pažymėti vidurinėsios transkripcijos iniciacijos nukleotidai. Geltonai pažymėtas tiesioginis, o mėlynai atvirkštinis pradmenys. Žaliai pažymėtas zondas.



kPGR reakcija buvo atliekama keturis kartus (naudojant RNR, išskirtą skirtingų keturių eksperimentų metu), esant trigubam pakartojimui. Gauti duomenys buvo analizuojami Rotor-Gene 1.7.87 programine įranga.

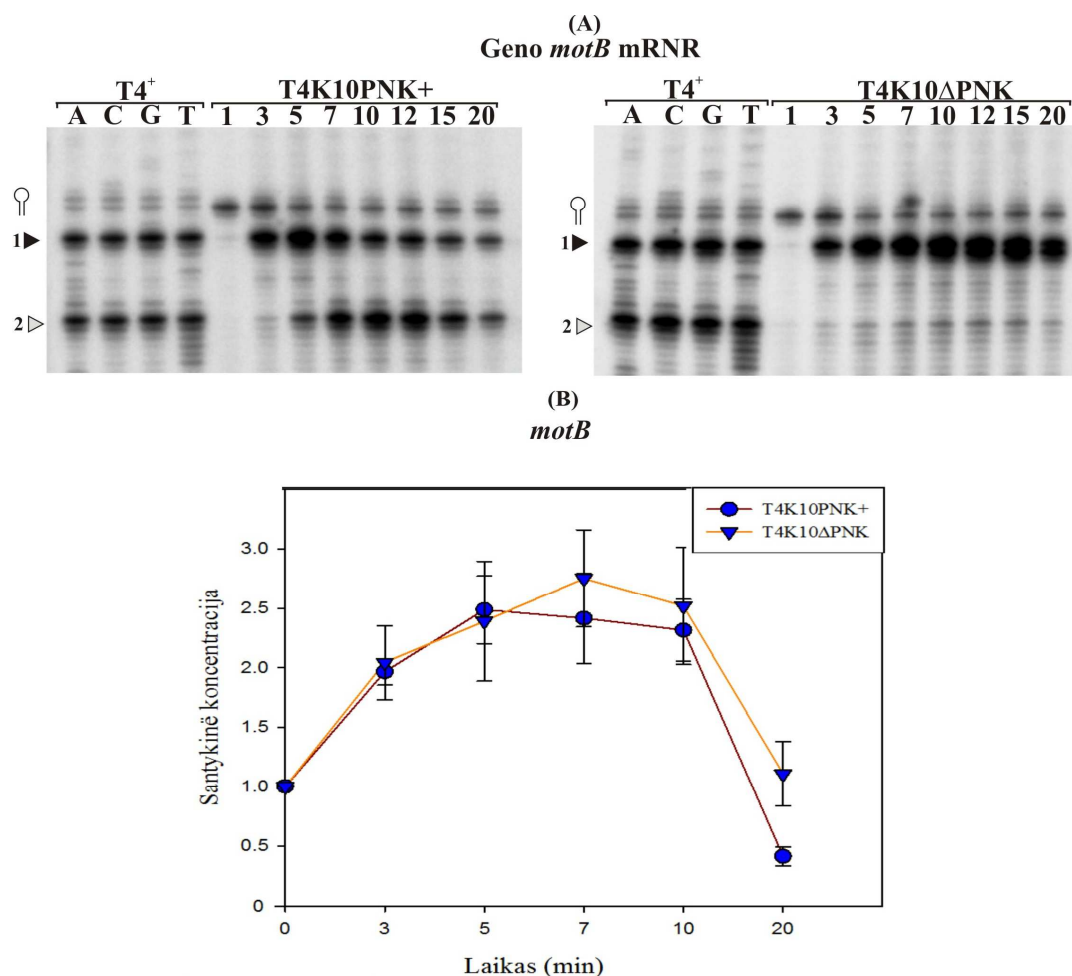
Pirmiausia buvo nustatytas PNK poveikis *nrdC.3* geno transkriptams. Kaip jau buvo minėta, 5 min po infekcijos bakteriofagu T4K10PNK+ arba T4K10ΔPNK, į terpę buvo įdėta rifampicino. RNR polimerazė elongacijos metu susijungusi su DNR ir RNR yra atspari rifampicino prisijungimui. Kai RNR polimerazė baigia transkripciją ir atsijungia nuo DNR ir RNR, prie jos gali prisijungti rifampicinas, kuris trukdo naujų atvirų transkripcijos kompleksų susiformavimui (Herring ir kt., 2005). Dėl šios priežasties, nuo 0 iki 3 min dar yra stebimas transkriptų kiekio padidėjimas (32 pav. B). Tuo metu vis dar sintetinami nauji transkriptai, tačiau kartu prasideda ir RNR degradacija. Transkriptų degradacija, esant veikliai PNK yra greitesnė dėl to skiriasi transkriptų, išskirtų iš T4K10PNK+ ir T4K10ΔPNK, kiekiai.

Išanalizavus *nrdC.3* transkripto kPGR duomenys (32 pav. B) buvo nustatyta, kad transkriptai, išskirti iš ląstelių turinčių T4K10PNK+, degradoja greičiau nei transkriptai, skirti iš T4K10ΔPNK infekuotų ląstelių. Taigi, nesant PNK *nrdC.3* transkriptai tampa stabilesni. Šie rezultatai rodo, kad *nrdC.3* transkripto degradacija yra priklausoma nuo PNK, tačiau ilgainiui jie gali būti degradojami ir nuo PNK nepriklausomu būdu.



**32 pav. PNK įtakos geno *nrdC.3* transkripto degradacijai nustatymas. A) Žymėto pradmens ilginimo metodas.** *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės buvo auginamos 30 °C iki  $OD_{600} = 0,8$ , infekuojamos bakteriofagu T4<sup>+</sup> (MOI 10) ir po 6 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama bendroji ląstelės RNR, kuri panaudota sekoskaitai. Tiriant transkriptų kinetiką, *E. coli* ląstelės buvo infekuojamos bakteriofagais T4K10PNK<sup>+</sup> arba T4K10ΔPNK. Bendroji ląstelės RNR buvo skiriama 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15 ir 20 min nuo infekcijos pradžios, po to ji buvo analizuojama P<sup>32</sup> žymėto pradmens ilginimo metodu. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai ir RNR skyrimo laikas (min) po infekcijos fagais. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus. B) kPGR metodas. *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės, buvo auginamos 30 °C iki  $OD_{600} = 0,8$ , tada buvo užkrečiamos bakteriofagais T4K10PNK<sup>+</sup> arba T4K10ΔPNK (MOI 10). Bendroji ląstelės RNR buvo skiriama 0, 3, 5, 7, 10, ir 20 min, paveikiama DNaze I ir naudojama kPGR. Gauti duomenys buvo analizuoti Rotor-Gene 1.7.87 programine įranga.

Geno *motB* mRNR degradavimo tyrimui pasirinkome dėl to, kad jos degradacija skiriasi nuo kitų tirtųjų transkriptų, jos hidrolizė gali vykti tiek dalyvaujant PNK, tiek ir be jos (33 pav. A).



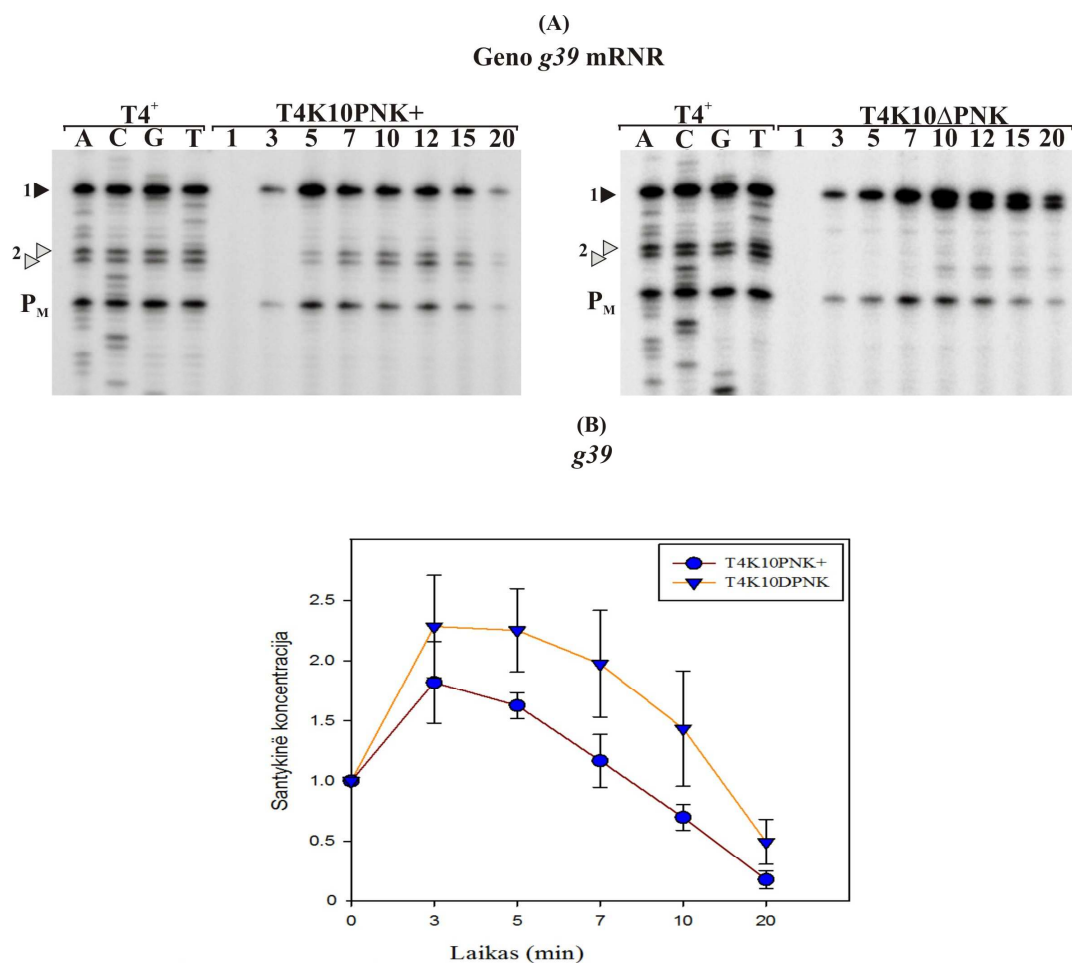
**33 pav. PNK įtakos geno *motB* transkripto degradacijai nustatymas:** A) Žymėto pradmens ilginimo metodas. *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės buvo auginamos 30 °C iki OD<sub>600</sub> = 0,8, infekuojamos bakteriofagu T4<sup>+</sup> (MOI 10) ir po 6 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama bendroji ląstelės RNR, kuri panaudota sekoskaitai. Tiriant transkriptų kinetiką, *E. coli* ląstelės buvo infekuojamos bakteriofagais T4K10PNK+ arba T4K10ΔPNK. Bendroji ląstelės RNR buvo skiriama 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15 ir 20 min nuo infekcijos pradžios, po to ji buvo analizuojama P<sup>32</sup> žymėto pradmens ilginimo metodu. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideksinukleotidų takeliai ir RNR skyrimo laikas (min) po infekcijos fagais. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus. B) kPGR metodas. *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės, buvo auginamos 30 °C iki OD<sub>600</sub> = 0,8, tada buvo užkrečiamos bakteriofagais T4K10PNK+ arba T4K10ΔPNK (MOI 10). Bendroji ląstelės RNR buvo skiriama 0, 3, 5, 7, 10, ir 20 min, paveikiama DNaze I ir naudojama kPGR. Gauti duomenys buvo analizuoti Rotor-Gene 1.7.87 programine įranga.

Gauti rezultatai rodo, kad geno *motB* transkriptų, išskirtų iš T4K10PNK+, degradacija vyksta tik šiek tiek greičiau nei transkriptų, išskirtų iš T4K10ΔPNK infekuotų ląstelių (33 pav. B), tačiau skirtumai yra labai nedideli. Apibendrinus visus šiame darbe atliktus tyrimus su *motB* transkriptu, galima teigti, kad *motB* transkriptas degraduojamas tiek nuo PNK priklausomu, tiek

nuo PNK nepriklausomu keliu, galbūt veikiant ir kitiems fago arba bakterijos koduojamiems veiksniams.

Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad genas *39* yra nurašomas tiek nuo ankstyvojo promotoriaus į ilgus policistroninius transkriptus, tiek nuo viduriniojo promotoriaus į monocistroninius transkriptus (Stitt ir Hinton, 1994). Abu transkriptai baigiasi stipriu terminatoriumi. Policistroninį transkriptą tarpgeninėje srityje kerpa endoribonukleazė RegB, tuo tarpu monocistroninis transkriptas yra atsparus jos poveikiui. Dėl to buvo tikslinga ištirti, kaip tai atsispindės kPGR rezultatuose. Taigi, buvo nuspręsta ištirti *g39* transkripto degradacijos priklausomybę nuo PNK veiksnio (34 pav. A ir B).

Gauti rezultatai rodo, kad *g39* transkriptai išskirti iš T4K10PNK+ yra degraduojami greičiau nei skirti iš T4K10ΔPNK, tačiau skirtumas tarp jų kiekio bėgant laikui yra panašus (34 pav. B). Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad šio transkripto degradacijos kreivė yra suminė policistroninių ir monocistroninių transkriptų degradavimo išraiška. Galima daryti prielaidą, kad policistroniniai transkriptai yra degraduojami greičiau (nuo RegB ir PNK priklausomu būdu), tuo tarpu monocistroniniai transkriptai kurį laiką išlieka stabilūs ir yra degraduojami nuo RegB ir PNK suderinto veikimo nepriklausomu būdu.



**34 pav. PNK įtakos geno 39 transkripto degradacijai nustatymas:** A) Žymėto pradmens ilginimo metodus. *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės buvo auginamos 30 °C iki  $OD_{600} = 0,8$ , infekuojamos bakteriofagu T4<sup>+</sup> (MOI 10) ir po 6 min nuo infekcijos pradžios buvo išskiriama bendroji ląstelės RNR, kuri panaudota sekoskaitai. Tiriant transkriptų kinetiką, *E. coli* ląstelės buvo infekuojamos bakteriofagais T4K10PNK+ arba T4K10ΔPNK. Bendroji ląstelės RNR buvo skiriama 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15 ir 20 min nuo infekcijos pradžios, po to ji buvo analizuojama P<sup>32</sup> žymėto pradmens ilginimo metodu. Viršuje pažymėti reakcijose naudotų dideoksinukleotidų takeliai ir RNR skyrimo laikas (min) po infekcijos fagais. Kairėje esantis juodas trikampis (1) žymi RegB nukleazės hidrolizuojamų transkriptų 5'-galinius nukleotidus, pilkas trikampis (2) rodo antrinių skėlimų 5'-galinius nukleotidus. B) kPGR metodus. *E. coli* C41(DE3) kamieno ląstelės, buvo auginamos 30 °C iki  $OD_{600} = 0,8$ , tada buvo užkrečiamos bakteriofagais T4K10PNK+ arba T4K10ΔPNK (MOI 10). Bendroji ląstelės RNR buvo skiriama 0, 3, 5, 7, 10, ir 20 min, paveikiama DNaze I ir naudojama kPGR. Gauti duomenys buvo analizuoti Rotor-Gene 1.7.87 programine įranga.

Šiame darbo etape atlikti tyrimai patvirtino fago T4 PNK įtaką RegB kirptų transkriptų degradacijai. Taigi galima daryti išvadą, kad tiek T4 RNazės RegB, tiek ir PNK sąlygotas *E. coli* RNazių E ir G veikimas yra skirtas ankstyvųjų transkriptų degradacijai pagreitinti.

## Rezultatų apibendrinimas

Šio darbo tikslas buvo ištirti bakteriofago T4 ankstyvųjų transkriptų degradacijos mechanizmus, nustatyti šiame procese dalyvaujančius fermentus ir jų tarpusavio veikimo priklausomybę. Iki šiol buvo žinoma, kad *E. coli* RNazė E dalyvauja fago mRNR degradacijos procese viso infekcinio ciklo metu (Mudd ir kt., 1990), o fago koduojama RNazė RegB yra atsakinga už daugelio ankstyvųjų transkriptų degradaciją. RegB nukleazės taikiniai, kurių esminis motyvas yra GGAG, buvo nustatyti išimtinai ankstyvuosiuose transkriptuose, efektyviausi – SD sekose (Uzan ir kt., 1988; Ruckman ir kt., 1989; Sanson ir Uzan, 1993, 1995). Kirpdama šias sekas, RegB išjungia jų transliaciją ir pagreitina degradaciją, taip užtikrindama sklandų genų raiškos perjungimą iš ankstyvosios į viduriniąją fazę (Sanson ir kt., 2000).

Akivaizdu, kad RegB taikinius greičiausiai turi dauguma ankstyvųjų transkriptų, tačiau buvo sričių su nepatikrintais galimais taikiniai. Be to buvo neaišku, kaip RegB hidrolizuoti transkriptai degradoja toliau ir kaip šiame procese galėtų dalyvauti RNazė E, kurios taikiniai buvo nustatyti tik pavieniuose fago transkriptuose. Todėl pirmas šio darbo uždavinys buvo nustatyti naujus endoribonukleazės RegB skėlimo taikinius ankstyvuosiuose fago transkriptuose bei patikrinti kai kuriuos galimus taikinius, išsidėsčiusius viduriniųjų ar vėlyvųjų genų srityse. Šiame darbo etape pavyko patvirtinti šešis naujus RegB hidrolizuojamus taikinius, esančius genų *ndd.4*, *segD*, *dmd*, *sp*, *mobD.1* ir *pin* SD srityse, ir vieną taikinį, esantį prieš geną *arn*. Analizuojant *segD* transkriptus, kurie buvo laikomi vėlyvaisiais (Luke ir kt., 2002), buvo aptiktas iki šiol nenustatytas *in vivo* aktyvus ankstyvasis promotorius P<sub>EsegD</sub>, kurio –10 srities seka ir tarpiklio sritis atitiko tipines fago T4 P<sub>E</sub> promotoriaus sekas, o –35 srities seka (ATTTACA) buvo netipinė. Darbo metu patvirtinta, kad šis promotorius yra aktyvus ir pakankamai stiprus *in vivo*, taigi RegB hidrolizuojami *segD* transkriptai yra ankstyvieji.

Toliau ieškant naujų endoribonukleazės RegB taikinių, buvo aptikti 3 transkriptai (*ndd*, *nrdC.3* ir *55.2*), kurie turėjo antrinius skėlimo taikinius AU

turingose sekose, esančiose už RegB taikinių. Šių taikinių ypatybė buvo ta, kad jie buvo išsidėstę už 5-8 nt nuo RegB skeliamų GGAG motyvų, esančių tarpgeininėse, bet ne SD sekose. Panašių taikinių (prieš *cef*, *g39*, *motB* ir *g43* genus) buvo aptikta ir anksčiau (Hsu ir Karam, 1990, Sanson ir Uzan, 1993, 1995), tačiau endoribonukleazės, atsakingos už antrinius skėlimus nustatytos nebuvo. Šiame darbe patvirtinome, kad visi iki šiol nustatyti antrinius taikinius turintys transkriptai tampa tinkamais substratais kitoms nukleazėms tik po pradinio kirpimo, kurį vykdo endoribonukleazė RegB. Šie transkriptai buvo pasirinkti kaip modelis RegB kirptų transkriptų degradacijos tyrimams.

Analizuojant mRNR, išskirtą iš RNazės E ts jautrių *E. coli* kamienų, nustatėme, kad RNazė E arba visiškai nedalyvauja genų *ndd*, *nrdC.3* ir *55.2* transkriptų degradavime, arba nukleazės aktyvumas maskuojamas kitos nukleazės, turinčios panašų specifiškumą. Todėl buvo patikrintas panašius taikinius atpažįstančios RNazės G galimas poveikis fago T4 RegB kirptiems transkriptams. Iki šiol RNazės G poveikis fago T4 transkriptams buvo tirtas minimaliai. Ueno ir Yonesaki nustatė, kad fago infekcijos metu padidėja pačios *E. coli* mRNR jautrumas RNazei G, be to, ji dalyvauja *E. coli* mRNR degradacijoje faginės infekcijos metu (Ueno ir Yonesaki, 2004), tačiau jos taikiniai nustatyti nebuvo. Šio darbo metu, naudojant RNazės G mutantinius kamienus, nustatyta, kad RNazė G yra atsakinga už antrinių skėlimų atsiradimą AU turingose sekose prieš bakteriofago T4 genus *ndd*, *nrdC.3*, *43*, *motB* ir *39*. Tuo tarpu RNazės E ir G kartu gali atpažinti tuos pačius antrinius taikinius, esančius mRNR prieš genus *55.2* ir *cef*. Apibendrinus tyrimų rezultatus galima teigti, kad RNazės E vaidmuo antriniame tirtų transkriptų skaldyme yra nedidelis, ir RNazė G yra pagrindinė nukleazė, skelianti visus iki šiol žinomus RegB kirptų transkriptų antrinius taikinius. Šie taikiniai yra pirmieji fago T4 transkriptuose nustatyti RNazės G taikiniai.

Ankstesnių tyrimų metu nustatyta, kad tiek RNazė E, tiek RNazė G teikia pirmenybę tiems RNR substratams, kurie 5' gale turi monofosfatinę grupę (Mackie, 1998, 2000; Baker ir Mackie, 2003; Jiang ir kt., 2000). Be to, RNazė G yra jautresnė 5'-monofosforilintam galui nei RNazė E (Tock ir kt., 2000).

Tačiau po endoribonukleazės RegB skėlimo, transkripto gale lieka 5' OH grupė (Saida ir kt., 2003), o tokie transkriptai nėra geri substratai endoribonukleazėms E bei G. Todėl buvo siekiama išsiaiškinti kas gali turėti įtakos RNazių E/G aktyvumui. Įterpus T4 *regB* geną bei RegB ir antrinius taikinius turinčius genus ir indukavus jų raišką nuo plazmidžių, buvo pastebėta, kad antriniai mRNR kirpimai plazmidinėse sistemose neatsiranda. Jie būdavo stebimi tik plazmidines sistemas papildomai infekavus ir bakteriofagu T4<sup>+</sup>. Tai parodė, kad papildomi fago koduojami veiksniai turi įtakos *E. coli* RNazių E ir G aktyvumui. Tolimesni tyrimai buvo skirti nustatyti, kokie fago baltymai veikia RNazių aktyvumą RegB kirptų ankstyvųjų fago transkriptų atžvilgiu. Tyrimų modeliu buvo pasirinkta pagrindinė šio proceso RNazė G ir tik jos hidrolizuojami transkriptai. Buvo tikrinama RNazės G modifikavimo galimybė, o taip pat panaudojant delecinius T4 mutantus buvo bandoma nustatyti fago baltymus, darančius įtaką antrinių skėlimų atsiradimui.

Tikrinant RNazės G modifikavimo galimybę, genas *mag* buvo įterptas į plazmidinį vektorių, indukuota jo raiška ir išgrynintas rekombinantinis baltymas. Dalis indukuotų ląstelių buvo infekuojama fagu T4<sup>+</sup> prieš baltymo išgryninimą. Analizuojant baltymus NDS PAGE nustatyta, kad keičiasi po faginės infekcijos išgryninto RnaG baltymo elektroforetinis judrumas. Po infekcijos, rekombinantinis baltymas RnaG tampa nevienalytis, juda elektroforetiniame lauke kaip trys atskiri, didesnės molekulinės masės baltymai. Atlikus *mag* koekspresijos su T4 riboziltransferazių genais (*alt*, *modA* ir *modB*) tyrimus, nustatėme, kad RNazė G faginės infekcijos metu gali būti ribozilinama baltymo ModB. Tačiau taip pat panašu, kad infekcijos metu, RNazė G gali būti ne tik ribozilinama, bet ir patiria ne vieno tipo modifikaciją.

Lygiagrečiai su RNazės G modifikavimo tyrimais buvo tiriami laboratorijos kolekcijoje esančių T4 delecinių mutantų transkriptai, siekiant rasti tokį mutantą, kurio infekcijos metu RegB kirptų transkriptų antriniai skėlimai nebūtų stebimi. Tyrimų modeliu naudojant *nrdC.3* transkriptus nustatyta, kad I/S sistemos (Selick ir kt., 1988) fago T4K10 infekcijos metu ties antriniais taikiniai jie nėra karpomi. Patikrinus šio fago delecinės srities



$\Delta$ rIIPT genų įtaką antriniam skėlimams, buvo parodyta, kad nė vienas iš tirtų delecinės srities genų nebuvo atsakingas už RNazių E/G aktyvumo RegB kirptų transkriptų atžvilgiu susilpnėjimą. Fagas T4K10 buvo sukonstruotas kryžminant atskirų genų mutantus, gautus bendrosios cheminės ar UV mutagenezės būdu (Selick ir kiti, 1988), todėl buvo didelė tikimybė, kad gali būti pažeisti ir kiti jo genai. Vienas iš kandidatų, galinčių turėti įtakos antrinių kirpimų atsiradimui, buvo fago T4 geno *pseT* koduojamas fermentas polinukleotidkinazė (PNK). PNK fosforilina tRNR<sup>lys</sup> antikodono 5' OH grupę, paliktą po nukleazės PrrC skėlimo (Amitsur ir kt., 1987). Tai buvo vienintelė iki šiol žinoma biologinė T4 PNK funkcija. Buvo nuspręsta patikrinti fago T4K10 *pseT* geno nukleotidinę seką. Nustačius ją, buvo pastebėta, jog šiame gene yra dvi taškinės mutacijos, keičiančios aminorūgštis – G14D ir R229H. Pirmoji buvo konservatyvioje padėtyje ir arti PNK 5' kinazės aktyviojo centro, o kita – nekonservatyvioje padėtyje ir toli nuo aktyviųjų centrų.

Įterpus T4 ir T4K10 *pseT* genus į ekspresijos vektorius, indukavus jų raišką ir išgryninus rekombinantinius baltymus, buvo atlikti *in vitro* 5'-kinazinio aktyvumo tyrimai. Nustatyta, kad T4K10 PNK aktyvumas siekia tik apie 5 % natyvios PNK aktyvumo. Taip pat buvo atliktas koekspresijos eksperimentas ir nustatyta, kad plazmidinėje sistemoje koduojamos PNK užtenka, kad nuo plazmidės indukuoti *nrnC.3* transkriptai būtų fosforilinami ir dėl to atpažįstami RNazės G bei efektyviai hidrolizuojami antrinių taikinių vietose. Šis tyrimas paneigė hipotezę, kad RNazės G modifikavimas T4 infekcijos metu yra reikalingas antrinių skėlimų atsiradimui, tam užtenka nuo plazmidės indukuoto PNK baltymo.

Sukonstravus T4K10 viengubus mutantus ir ištyrus jų RegB kirptus transkriptus, buvo nustatyta, kad G14D mutaciją turinti PNK nestimuliuoja RNazės G aktyvumo. Ši mutacija yra PNK 5'-kinazės domene, todėl greičiausiai yra pažeista 5' kinazės funkcija. Tuo tarpu, R229H pakaita yra įvykusi PNK 3'-fosfatazės nekonservatyvioje padėtyje, todėl greičiausiai nesutrikdė šios funkcijos arba ji yra nesvarbi RNazės G stimuliavimui. Vėliau buvo sukonstruoti T4 $\Delta$ *pseT* ir T4K10 $\Delta$ *pseT* deleciniai mutantai ir ištirti jų visi

septyni antrinius taikinius turintys, RegB hidrolizuojami transkriptai. Patvirtinta visų septynių transkriptų antrinės hidrolizės priklausomybė nuo fago T4 koduojamos PNK. Buvo padaryta išvada, kad fago koduojama PNK fosforilina visų tirtų fago ankstyvųjų RegB kirptų transkriptų 5' OH grupes ir taip sukuria palankius substratus *E. coli* RNazėms E/G, kurios toliau hidrolizuoja minėtuosius transkriptus.

Darbo pabaigoje, kiekybinio tikro laiko PGR metodu buvo įvertinta fago koduojamos PNK įtaka ankstyvųjų genų *nrdC.3*, *motB* ir *g39* transkriptų degradacijai. Tyrimams naudoti fagų T4K10 $\Delta$ *pseT* ir T4K10*pseT*<sup>+</sup> infekcijos eigoje išskirti transkriptai. Visų tirtų transkriptų degradacija yra greitesnė esant PNK, tačiau ilgainiui jie degraduojami ir nuo PNK nepriklausomu keliu. Buvo padaryta išvada, kad tirtų transkriptų stabilumas sumažėja esant veikliai PNK, tačiau sumažėjimas priklauso nuo konkretaus transkripto endoribonukleolitinės hidrolizės ypatumų.

Disertacijos rengimo metu buvo išspausdintas straipsnis (Durand ir kt., 2012), kuriame pateikti duomenys iš dalies persidengė su mūsų gautais duomenimis. Naudodami kitus metodus Durand ir bendraautoriai tyrė genų *cef*, *motB*, *g39*, *g43* ir *g30.8* transkriptų hidrolizę esant arba nesant veikliai PNK. Jų gauti rezultatai taip pat įrodė PNK vaidmenį fago T4 ankstyvųjų mRNR degradacijai.

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad tiek T4 RNazės RegB, tiek ir PNK sąlygotas *E. coli* RNazių E ir G veikimas yra skirtas ankstyvųjų transkriptų degradacijai pagreitinti. Dabar yra žinoma, kad PNK ne tik dalyvauja tRNR<sup>Lys</sup> antikodono kilpos reparacijoje, bet ir yra susijusi su mRNR degradacija, nes fosforilina 5' OH grupes, kurias sukuria endoribonukleazė RegB, ir taip stimuliuoja jų karpymą RNazių E ir G pagalba. Šiame darbe buvo parodyta, kad nesant veiklios PNK, fago T4 genų *ndd*, *nrdC.3*, *55.2*, *cef*, *motB*, *g43* ir *g39* RegB kirptų transkriptų antrinis skaldymas sutrinka. Tačiau 5' galo fosforilinimas gali skatinti degradaciją net ir tų transkriptų, kurie neturi aiškiai matomų antrinių kirpimų, nes jie gali vykti tolimesniu atstumu nuo RegB. Todėl PNK kinazės aktyvumas gali būti svarbus daugelio ankstyvųjų mRNR,

skeliamų RegB ar kitos nukleazės paliekančios 5' OH grupę, degradavimui. Be to, PNK gali turėti dar ir kitų neidentifikuotų funkcijų fago T4 vystymosi ciklo metu, kadangi nukleorūgščių 5' galo fosforilinimas yra labai svarbus veiksnys kitų fermentų veiklai (DNR arba RNR ligazėms, polimerazėms ir nukleazėms).

## Išvados

1. Bakteriofago T4 ankstyvųjų transkriptų *ndd.4*, *mobD*, *sp*, *segD*, *pin* ir *dmd* SD sekose bei prieš geną *arn* rasti nauji endoribonukleazės RegB taikiniai.
2. Genas *segD* yra nurašomas nuo ankstyvojo promotoriaus P<sub>EsegD</sub>, -35 srityje turinčio skirtumų nuo tipinės sekos.
3. T4 *nrdC.3*, *ndd* ir *55.2* transkriptai už RegB taikinių turi AU turtingas sritis su antriniais endoribonukleazių taikiniais.
4. RNazės RegB perkirptų transkriptų antrinius taikinius hidrolizuoja *E. coli* koduojamos endoribonukleazės E ir G. Pastaroji yra pagrindinė RegB kirptus transkriptus skelianti RNazė.
5. *E. coli* RNazė G gali būti modifikuojama fago T4 infekcijos metu, tačiau tai neturi įtakos jos aktyvumui RegB kirptų transkriptų atžvilgiu.
6. Bakteriofago T4 K10 *pseT* genas turi dvi mutacijas, lemiančias G14D ir R229H pakaitas koduojamoje polinukleotidkinazėje. G14D pakaita sutrikdo fermento 5'-kinazinį aktyvumą.
7. Fago T4 RNazės RegB ir PNK sąlygotas *E. coli* RNazių E ir G veikimas yra skirtas ankstyvųjų transkriptų degradacijai pagreitinti.

## Publikacijos disertacijos tema

1. Truncaitė L., Stoškienė G., Kalinienė L., **Strazdaitė Ž.**, Nivinskas R. (2006). *In vivo* and *in vitro* activities of the bacteriophage T4 early promoters. *Biologija*. 3:8-11.
2. Zajančauskaitė A., Truncaitė L., **Strazdaitė-Žielenė Ž.**, Nivinskas R. (2008). Involvement of the *Escherichia coli* endoribonucleases G and E in the secondary processing of RegB-cleaved transcripts of bacteriophage T4. *Virology*. 375:342-353.
3. **Strazdaitė-Žielenė Ž.**, Zajančauskaitė A., Kalinienė L., Meškys R., Truncaitė L. (2013). A mutation in the gene for polynucleotide kinase of bacteriophage T4K10 affects mRNA processing. *Archives of Virology*. Doi: 10.1007/s00705-013-1800-x

## Padėka

Esu nuoširdžiai dėkinga darbo vadovams: habil. dr. Rimantui Nivinskui – už suteiktą galimybę atlikti šį darbą ir dr. Lidijai Truncaitei už visapusišką pagalbą ir patarimus atliekant eksperimentus ir ruošiant disertaciją. Taip pat norėčiau išreikšti padėką dr. Rolandui Meškiui už patarimus bei pastabas ruošiant disertacijos tekstą.

Dėkoju visiems Molekulinės Mikrobiologijos ir Biotechnologijos skyriaus darbuotojams, o ypač dr. Aurelijai Zajančkauskaitei už vertingus patarimus, mokslines diskusijas bei kasdienę pagalbą atliekant šį darbą, dr. Laurai Kalinienei už disertacijos santraukos korekciją, Nijolei Uždavienei bei Linai Juškienei už kasdienę pagalbą ir palaikymą.

Taip pat esu dėkinga dr. Maksimui Bratchikovui už pagalbą ir patarimus atliekant kPGR. Ypatingai esu dėkinga recenzentams: dr. Jauniui Urbonavičiui ir dr. Elenai Servienei už vertingus patarimus, pastabas ir pasiūlymus. Tariu ačiū dr. Virginijai Bukelskienei už rūpestingumą ir pagalbą ruošiant dokumentus disertacijos gynimui. Nuoširdžiai dėkoju savo biologijos mokytojai Alai Vaicekauskienei, kuri pirmoji išvelgė manyje gabumus biologijai ir skatino siekti savo tikslų – studijuoti širdžiai mielą dalyką. Taip pat tariu ačiū savo šeimos nariams ir draugams be kurių pagalbos ir palaikymo neišsiversčiau.

## Literatūros sąrašas

1. Adams M. H. (1959). Bacteriophages. *Interscience, Publishers, Inc.* New York, 527.
2. Adelman K., Brody E. N., Buckle M. (1998). Stimulation of bacteriophage T4 middle transcription by the T4 proteins MotA and AsiA occurs at two distinct steps in the transcription cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:15247-15252.
3. Aliprandi P., Sizun C., Perez J., Mareuil F., Caputo S., Leroy J. L., Odaert B., Laalami S., Uzan M., Bontems F. (2008). S1 ribosomal protein functions in translation initiation and ribonuclease RegB activation are mediated by similar RNA-protein interactions: an NMR and SAXS analysis. *J Biol Chem.* 283(19):13289-13301.
4. Amblar M., Barbas A., Fialho A. M., Arraiano C. M. (2006). Characterization of the functional domains of *Escherichia coli* RNase II. *J Mol Biol.* 360(5):921-933.
5. Amblar M., Barbas A., Gomez-Puertas P., Arraiano C. M. (2007). The role of the S1 domain in exoribonucleolytic activity: substrate specificity and multimerization. *RNA.* 13(3):317-327.
6. Amitsur M., Levitz R., Kaufmann G. (1987). Bacteriophage T4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA. *EMBO J.* 6:2499-2503.
7. Anderson K. L., Dunman P. M. (2009). Messenger RNA Turnover Processes in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and Emerging Studies in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Microbiol.* 2009:525491.
8. Andrade J. M., Cairrao F., Arraiano C. M. (2006). RNase R affects gene expression in stationary phase: regulation of *ompA*. *Mol Microbiol.* 60(1):219-228.
9. Ang D., Keppel F., Klein G., Richardson A., Georgopoulos C. (2000). Genetic analysis of bacteriophage-encoded cochaperonins. *Annu. Rev. Genet.* 34:439-456.

10. Apirion D. (1978). Isolation, genetic mapping and some characterization of a mutation in *Escherichia coli* that affects the processing of ribonucleic acid. *Genetics*. 90(4):659-671.
11. Arraiano C. M., Andrade J. M., Domingues S., Guinote I. B., Malecki M., Matos R. G., Moreira R. N., Pobre V., Reis F. P., Saramago M., Silva I. J., Viegas S. C. (2010). The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:883-923.
12. Awano N., Rajagopal V., Arbing M., Patel S., Hunt J., Inouye M., Phadtare S. (2010). *Escherichia coli* RNase R has dual activities, helicase and RNase. *J Bacteriol.* 192(5):1344-1352.
13. Baker K. E., Mackie G. A. (2003). Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 47(1):75-88.
14. Bandyra K. J., Bouvier M., Carpousis A. J., Luisi B. F. (2013). The social fabric of the RNA degradosome. *Biochim Biophys Acta.* 1829(6-7):514-522.
15. Barbas A., Matos R. G., Amblar M., Lopez-Vinas E., Gomez-Puertas P., Arraiano C. M. (2008). New insights into the mechanism of RNA degradation by ribonuclease II: identification of the residue responsible for setting the RNase II end product. *J Biol Chem.* 283(19):13070-13076.
16. Barth K. A., Powell D., Trupin M., Mosig G. (1988). Regulation of two nested proteins from gene 49 (recombination endonuclease VII) and of a lambda RexA-like protein of bacteriophage T4. *Genetics.* 120:329-343.
17. Belasco J. G. (2010). All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(7):467-478.
18. Bell C. E., Eisenberg D. (1996). Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry.* 35(4):1137-1149.
19. Bereta J., Bereta M. (1995). Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine activated endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:363-369.



20. Bhatia P., Taylor W. R., Greenberg A. H., Wright J. A. (1994). Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal. Biochem.* 216:223-226.
21. Bisaglia M., Laalami S., Uzan M., Bontems F. (2003). Activation of the RegB endoribonuclease by the S1 ribosomal protein is due to cooperation between the S1 four C-terminal modules in a substrate-dependant manner. *J Biol Chem.* 278(17):15261-15271.
22. Blaszczyk J., Gan J., Tropea J. E., Court D. L., Waugh D. S., Ji X. (2004). Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. *Structure.* 12(3):457-466.
23. Bradwell J. C. A., Regnier P., Chen S. M., Nakamura Y., Grunberg-Manago M., Court D. L. (1989). Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing. *EMBO J.* 8:3401-3407.
24. Bram R. J., Young R. A., Steitz J. A. (1980). The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell.* 19(2):393-401.
25. Briant D. J., Hankins J. S., Cook M. A., Mackie G. A. (2003). The quaternary structure of RNase G from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 50(4):1381-1390.
26. Brody E. N., Kassavetis G. A., Ouhammouch M., Sanders G. M., Tinker R. L., Geiduschek E. P. (1995). Old phage, new insights: two recently recognized mechanisms of transcriptional regulation in bacteriophage T4 development. *FEMS Microbiol Lett.* 128(1):1-8.
27. Brody E., Uzan M., Leautey J., d'Aubenton-Carafa Y. (1983). Identification and biosynthesis of the bacteriophage T4 *mot* regulatory protein. *EMBO J.* 2:1207-1212.
28. Cairrao F., Cruz A., Mori H., Arraiano C. M. (2003). Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol Microbiol.* 50(4):1349-1360.
29. Calin-Jageman I., Nicholson A. W. (2003). RNA structure-dependent

uncoupling of substrate recognition and cleavage by *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic Acids Res.* 31(9):2381-2392.

30. Callaghan A. J., Marcaida M. J., Stead J. A., McDowall K. J., Scott W. G., Luisi B. F. (2005). Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature.* 437(7062):1187-1191.

31. Calvori C., Frontali L., Leoni L., Tecce G. (1965). Effect of rifampicin on protein synthesis. *Nature.* 207(995):417-418.

32. Cameron V., Uhlenbeck O. C. (1977). 3'-phosphatase activity in T4 polynucleotide kinase. *Biochemistry.* 16:5120-5126.

33. Campbell E. A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.* 104(6):901-912.

34. Carlson K., Raleigh E. A., Hattman S. (1994). Restriction and modification. In Karam J. D., Drake J. W., Kreuzer K. N., Mosig G., Hall D. H., Eiserling F. A., Black L. W., Spicer E. K., Kutter E., Carlson K., Miller E. S. (ed.), *Molecular biology of bacteriophage T4.* ASM Press, Washington, D.C. 369-381.

35. Carpousis A. J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:71-87.

36. Carpousis A. J., Luisi B. F., McDowall K. J. (2009). Endonucleolytic initiation of mRNA decay in *Escherichia coli*. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85:91-135.

37. Carpousis A. J., Leroy A., Vanzo N. F., Sousa S., Dreyfus M. (2002). Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol. Microbiol.* 45:1231-1243.

38. Carpousis A. J., Krisch H. M. (1994). mRNA processing and degradation. In *Bacteriophage T4* (Mathews C. K., Kutter E. M., Mosig G., Berget P. B. eds.) *American Society for Microbiology.* Washington, D.C. 37:176-182.

39. Celesnik H., Deana A., Belasco J. G. (2007). Initiation of RNA decay in

- Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. *Mol. Cell.* 27(1):79-90.
40. Chang T. J., Juan C. C., Yin P. H., Chi C. W., Tsay H. J. (1998). Up-regulation of  $\beta$ -actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol. Rep.* 5:469-471.
  41. Cheng Z. F., Deutscher M. P. (2002). Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *J. Biol. Chem.* 277(24):21624-21629.
  42. Cheng Z. F., Deutscher M. P. (2003). Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:6388–6393.
  43. Cheng Z. F., Deutscher M. P. (2005). An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol Cell.* 17(2):313–318.
  44. Cheng Z. F., Zuo Y., Li Z., Rudd K. E., Deutscher M. P. (1998). The *vacB* gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase R. *J. Biol. Chem.* 273(23):14077-14080.
  45. Christensen A. C., Young E. T. (1983). In Bacteriophage T4 (Matthews C. K., Kutter E. M., Mosig G., Bernet P. B.). *ASM Press*, Washington, D.C. 184-188
  46. Christensen S. K., Gerdes K. (2004). Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Mol. Microbiol.* 53(2):587-597.
  47. Chung D. H., Min Z., Wang B. C., Kushner S. R. (2010). Single amino acid changes in the predicted RNase H domain of *Escherichia coli* RNase G lead to complementation of RNase E deletion mutants. *RNA.* 16(7):1371-1385.
  48. Claverie-Martin F., Diaz-Torres M. R., Yancey S. D., Kushner S. R. (1991). Analysis of the altered mRNA stability (*ams*) gene from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and homology of its product to MRP3, a mitochondrial ribosomal protein from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 266(5):2843-2851.
  49. Clokie M. R. (2009). Quantification of host and phage mRNA expression during infection using real-time PCR. *Methods Mol. Biol.* 502:177-191.

50. Clowes R. C., Hayes W. (1968). Experiments in microbial genetics. *Blackwell scientific publications*. Oxford and Edinburgh. 247.
51. Coburn G. A., Mackie G. A. (1999). Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62:55-108.
52. Corda D., Di Girolamo M. (2003). Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J.* 22(9):1953-1958.
53. Court D. (1993). RNA processing and degradation by RNase III. In: Belasco J., Brawerman G, eds. Control of Messenger RNA Stability. *New York: Academic Press. Inc.* 71–116.
54. Dasgupta S., Fernandez L., Kameyama L., Inada T., Nakamura Y., Pappas A., Court D. L. (1998). Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III – the effect of dsRNA binding on gene expression. *Mol Microbiol.* 28(3):629-640.
55. de Smit M. H., van Duin J. (1990). Control of procariotic translational initiation by mRNA secondary structure. *Progress in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 38:1-35.
56. Deana A., Celesnik H., Belasco J. G. (2008). The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature.* 451(7176):355-358.
57. Deana A., Belasco J. G. (2005). Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev.* 19:2526–2533.
58. Depping R., Lohaus C., Meyer H. E., Ruger W. (2005). The mono-ADP-ribosyltransferases Alt and ModB of bacteriophage T4: Target proteins identified. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335:1217-1223.
59. Desplats C., Krisch H. M. (2003). The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages. *Nucl. Acid Res. in Microbiol.* 154:259-267.
60. Deutscher M. P. (1988). The metabolic role of RNases. *Trends Biochem Sci.* 13(4):136-139.

61. Deutscher M. P. (1993a). Ribonuclease multiplicity, diversity and complexity. *J. Biol. Chem.* 268:13011-13014.
62. Deutscher M. P. (1993b). Promiscuous exoribonucleases of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 175(15):4577-4583.
63. Deutscher M. P. (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res.* 34(2):659-666.
64. Dharmalingam K., Goldberg E. B. (1976). Phage-coded protein prevents restriction of unmodified progeny T4 DNA. *Nature.* 260(5550):454-456.
65. Dharmalingam K., Revel H. R., Goldberg E. B. (1982). Physical mapping and cloning of bacteriophage T4 anti-restriction endonuclease gene. *J Bacteriol.* 149(2):694-699.
66. Diwa A., Bricker A. L., Jain C., Belasco J. G. (2000). An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev.* 14(10):1249-1260.
67. Donovan W. P., Kushner S. R. (1986). Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(1):120-124.
68. Dreyfus M. (2009). Killer and protective ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 85:423-466.
69. Drider D., Condon C. (2004). The continuing story of endoribonuclease III. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8(4):195-200.
70. Durand S, Richard G, Bontems F, Uzan M (2012). Bacteriophage T4 polynucleotide kinase triggers degradation of mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7073-7078.
71. Durand S., Richard G., Bisaglia M., Laalami S., Bontems F., Uzan M. (2006). Activation of RegB endoribonuclease by S1 ribosomal protein requires an 11 nt conserved sequence. *Nucl. Acids Res.* 34(22):6549-6560.
72. Eastberg J. H., Pelletier J., Stoddard B. L. (2004). Recognition of DNA substrates by T4 bacteriophage polynucleotide kinase. *Nucleic Acids Res.* 32(2):653-660.
73. Ehretsmann C. P., Carpousis A. J., Krisch H. M. (1992). Specificity of

*Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: *in vivo* and *in vitro* analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes Dev.* 6(1):149-159.

74. Fang P., Wang J., Li X., Guo M., Xing L., Cao X., Zhu Y., Gao Y., Niu L., Teng M. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Escherichia coli* RNase G. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 65(Pt 6):586-588.

75. Farley A. R., Link A. J. (2009). Identification and Quantification of Protein Posttranslational Modifications. *Methods in Enzymology.* 463:725–763.

76. Feng S., Chen Y., Kamada K., Wang H., Tang K., Wang M., Gao Y. G. (2013). YoeB-ribosome structure: a canonical RNase that requires the ribosome for its specific activity. *Nucleic Acids Res.* 41(20): 9549-9556.

77. Galburt E. A., Pelletier J., Wilson G., Stoddard B. L. (2002). Structure of a tRNA repair enzyme and molecular biology workhorse: T4 polynucleotide kinase. *Structure* 10:1249-1260.

78. Geiduschek E. P., Kassavetis G. A. (2010). Transcription of the T4 late genes. *Virology Journal.* 7:288.

79. Ghora B. K., Apirion D. (1978). Structural analysis and *in vitro* processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an *rne* mutant of *E. coli*. *Cell.* 15(3):1055-1066.

80. Ghosh S., Deutscher M. P. (1999). Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(8):4372-4377.

81. Goff C. G. (1979). Bacteriophage T4 *alt* gene maps between genes 30 and 54. *J. Virol.* 29(3):1232-1234.

82. Goff C. G., Setzer J. (1980). ADP ribosylation of *Escherichia coli* RNA polymerase is nonessential for bacteriophage T4 development. *J. Virol.* 33:547-549.

83. Guild N., Gayle M., Sweeney R., Hollingsworth T., Modeer T., Gold L. (1988). Transcriptional activation of bacteriophage T4 middle promoters by the MotA protein. *J. Mol. Biol.* 199:241-258.

84. Herendeen D. R., Kassavetis G. A., Geiduschek E. P. (1992). A transcriptional enhancer whose function imposes a requirement that proteins track along DNA. *Science*. 256:1298-1303.
85. Herring C. D., Raffaele M., Allen T. E., Kanin E. I., Landick R., Ansari A. Z., Palsson B. Ø. (2005). Immobilization of *Escherichia coli* RNA polymerase and location of binding sites by use of chromatin immunoprecipitation and microarrays. *J Bacteriol*. 187(17):6166-6174.
86. Hinton D. M. (1991). Transcription from a bacteriophage T4 middle promoter using T4 MotA protein and phage-modified RNA polymerase. *J Biol Chem*. 266(27):18034-18044.
87. Hinton D. M., March-Amegadzie R., Gerber J. S., Sharma M. (1996). Bacteriophage T4 middle transcription system: T4-modified RNA polymerase; AsiA, a 70 binding protein; and transcriptional activator MotA. *Methods Enzymol*. 274:43-57.
88. Hinton D. M. (2010). Transcriptional control in the prereplicative phase of T4 development. *Virology J*. 7:289.
89. Hinton D. M., Vuthoori S. (2000). Efficient inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by the bacteriophage T4 AsiA protein requires that AsiA binds first to free  $\sigma^{70}$ . *J. Mol. Biol*. 304:731-739.
90. Hsieh M. L., James T. D., Knipling L., Waddell M. B., White S., Hinton D. M. (2013). Architecture of the bacteriophage T4 activator MotA/promoter DNA interaction during sigma appropriation. *J Biol Chem*. 288(38):27607-27618.
91. Hsu T., Karam J. D. (1990). Transcriptional mapping of a DNA replication gene cluster in bacteriophage T4. Sites for initiation, termination and mRNA processing. *J. Biol Chem*. 265:5303-5316.
92. Hurley J. M., Cruz J. W., Ouyang M., Woychik N. A. (2011). Bacterial toxin RelE mediates frequent codon-independent mRNA cleavage from the 5' end of coding regions *in vivo*. *J Biol Chem*. 286(17):14770-14778.
93. Jain C., Belasco J. G. (1995). Autoregulation of RNase E synthesis in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Symp Ser*. 33:85-88.

94. Jain C., Deana A., Belasco J. G. (2002). Consequences of RNase E scarcity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 43(4):1053-1064.
95. Jain C., Kleckner N. (1993). IS10 mRNA stability and steady state levels in *Escherichia coli*: indirect effects of translation and role of *rne* function. *Mol Microbiol.* 9(2):233-247.
96. Jiang X., Belasco J. G. (2004). Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(25):9211-9216.
97. Jiang X., Diwa A., Belasco J. G. (2000). Regions of RNase E important for 5'-end – dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *J Bacteriol.* 182:2468-2475.
98. Kaberdin V. R. (2003). Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res.* 31(16):4710-4716.
99. Kai T., Selick H. E., Yonesaki T. (1996). Destabilization of bacteriophage T4 mRNAs by a mutation of gene *61.5*. *Genetics.* 144(1):7-14.
100. Kai T., Yonesaki T. (2002). Multiple mechanisms for degradation of bacteriophage T4 *soc* mRNA. *Genetics.* 160(1):5-12.
101. Kamzolova S. G., Sivozhelezov V. S., Sorokin A. A., Dzhelyadin T. R., Ivanova N. N., Polozov R. V. (2000). RNA polymerase-promoter recognition. Specific features of electrostatic potential of "early" T4 phage DNA promoters. *J Biomol Struct Dyn.* 18(3):325-334.
102. Kanesaki T., Hamada T., Yonesaki T. (2005). Opposite roles of the *dmd* gene in the control of Rnase E and Rnase LS activities. *Genes Genet. Syst.* 80:241-249.
103. Karam J. D., Drake J. W., Kreuzer K. N., Mosig G., Hall D. H., Eiserling F. A., Black L. W., Spicer E. K., Kutter E., Carlson C., Miller E. S. (ed.) (1994). Molecular biology of bacteriophage T4. *American Soc. for Microbiol.* Washington, DC.
104. Kashlev M., Nudler E., Goldfarb A., White T., Kutter E. (1993). Bacteriophage T4 Alc protein: a transcription termination factor sensing local



- modification of DNA. *Cell*. 75(1):147-154.
105. Kaufmann G., David M., Borasio G. D., Teichmann A., Paz A., Amitsur M. (1986). Phage and host genetic determinants of the specific anticodon loop cleavages in bacteriophage T4-infected *Escherichia coli* CTr5X. *J Mol Biol*. 188(1):15-22.
106. Kavalchuk K., Madhusudan S., Schnetz K. (2012). RNase III initiates rapid degradation of *proU* mRNA upon hypo-osmotic stress in *Escherichia coli*. *RNA Biol*. 9(1):98-109.
107. Kawabata T., Arisaka F., Nishikawa K. (2000). Structural/functional assignment of unknown bacteriophage T4 proteins by iterative database searches. *Gene*. 259(1-2):223-233.
108. Kelch B. A., Makino D. L., O'Donnell M., Kuriyan J. (2011). How a DNA polymerase clamp loader opens a sliding clamp. *Science*. 334(6063):1675-1680.
109. Khemici V., Poljak L., Luisi B. F., Carpousis A. J. (2008). The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol*. 70(4):799-813.
110. Kim K., Sim S. H., Jeon C. O., Lee Y., Lee K. (2010). Base substitutions at scissile bond sites are sufficient to alter RNA-binding and cleavage activity of RNase III. *FEMS Microbiol Lett*. 315(1):30-37.
111. Kim K. S., Lee Y. (2004). Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases. *Nucleic Acids Res*. 32:6057-6068.
112. Kime L., Jourdan S. S., Stead J. A., Hidalgo-Sastre A., McDowall K. J. (2010). Rapid cleavage of RNA by RNase E in the absence of 5' monophosphate stimulation. *Mol Microbiol*. 76(3):590-604.
113. Koch T., Raudonikiene A., Wilkens K., Ruger W. (1995). Overexpression, purification and characterization of the ADP-ribosyltransferase (gpAlt) of bacteriophage T4: ADP-ribosylation of *E. coli* RNA polymerase modulates T4 "early" transcription. *Gene Expression* 4:253-264.

114. Koga M., Otsuka Y., Lemire S., Yonesaki T. (2011). *Escherichia coli rnlA* and *rnlB* compose a novel toxin-antitoxin system. *Genetics*. 187(1):123-130.
115. Kolesky S. E., Ouhammouch M., Geiduschek E. P. (2002). The mechanism of transcriptional activation by the topologically DNA-linked sliding clamp of bacteriophage T4. *J Mol Biol*. 321:767–784.
116. Kushner S. R. (2004). mRNA decay in prokaryotes and eukaryotes: different approaches to a similar problem. *IUBMB Life*. 56(10):585-594.
117. Kutter E., Wiberg J. S. (1969). Biological effects of substituting cytosine for 5-hydroxymethylcytosine in the deoxyribonucleic acid of bacteriophage T4. *J. Virol*. 4:439-453.
118. Laing S., Unger M., Koch-Nolte F., Haag F. (2011). ADP-ribosylation of arginine. *Amino Acids*. 41:257–269.
119. Lebars I., Hu R. M., Lallemand J. Y., Uzan M., Bontems F. (2001). Role of the substrate conformation and of the S1 protein in the cleavage efficiency of the T4 endoribonuclease RegB. *J. Biol. Chem*. 276(16):13264-13272.
120. Lee K., Bernstein J. A., Cohen S. N. (2002). RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 43(6):1445-1456.
121. Lehnik-Habrink M., Lewis R. J., Mäder U., Stülke J. (2012). RNA degradation in *Bacillus subtilis*: an interplay of essential endo- and exoribonucleases. *Mol Microbiol*. 84(6):1005-1017.
122. Levitz R., Chapman D., Amitsur M., Green R., Snyder L., Kaufmann G. (1990). The optional *E. coli prr* locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease. *EMBO J*. (5):1383-1389.
123. Li H., Nicholson A. W. (1996). Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *EMBO J*. 15(6):1421-1433.
124. Li Z., Deutscher M. P. (2002). RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA*. 8(1):97-109.

125. Li Z., Pandit S., Deutscher M. P. (1999). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18(10):2878-2885.
126. Li Y., Altman S. (2003). A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(23):13213-13218.
127. Lillehaug J. R., Kleppe R. K., Kleppe K. (1976). Phosphorylation of double-stranded DNAs by T4 polynucleotide kinase. *Biochemistry.* 15(9):1858-1865.
128. Lin-Chao S., Wong T. T., McDowall K. J., Cohen S. N. (1994). Effects of nucleotide sequence on the specificity of *rne*-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *J Biol Chem.* 269(14):10797-10803.
129. Lisser S., Margalit H. (1993). Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 21:1507-1515.
130. Luke K., Radek A., Liu X., Campbell J., Uzan M., Haselkorn R., Kogan Y. (2002). Microarray analysis of gene expression during bacteriophage T4 infection. *Virology.* 299(2):182-191.
131. Ma J., Campbell A., Karlin S. (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J Bacteriol.* 184:5733-5745.
132. Mackie G. A. (1998). Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature.* 395:720-723.
133. Mackie G. A. (2000). Stabilization of circular *rpsT* mRNA demonstrates the 5'-end dependence of RNase E action *in vivo*. *J Biol Chem.* 275(33):25069-25072.
134. Mackie G. A., Genereaux J. L. (1993). The role of RNA structure in determining RNase E-dependent cleavage sites in the mRNA for ribosomal protein S20 *in vitro*. *J Mol Biol.* 234(4):998-1012.
135. Malys N. (2012). Shine-Dalgarno sequence of bacteriophage T4: GAGG prevails in early genes. *Mol Biol Rep.* 39(1):33-39.

136. Malys N., Nivinskas R. (2009). Non-canonical RNA arrangement in T4-even phages: accommodated ribosome binding site at the gene 26-25 intercistronic junction. *Mol. Microbiol.* 73:1115-1127.
137. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A.
138. Marchand I., Nicholson A. W., Dreyfus M. (2001). Bacteriophage T7 protein kinase phosphorylates RNase E and stabilizes mRNAs synthesized by T7 RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 42(3):767-776.
139. Marshall P., Sharma M., Hinton D. M. (1999). The bacteriophage T4 transcriptional activator MotA accepts various base-pair changes within its binding sequence. *J. Mol. Biol.* 285:931-944.
140. Masse E., Escorcía F. E., Gottesman S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 17(19):2374-2383.
141. Mathy N., Bernard L., Pellegrini O., Daou R., Wen T., Condon C. (2007). 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell.* 129(4):681-692.
142. Mathy N., Hébert A., Mervelet P., Bénard L., Dorléans A., Li de la Sierra-Gallay I., Noirot P., Putzer H., Condon C. (2010). *Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Molecular Microbiology.* 75(2):489-498.
143. Matsunaga J., Simons E. L., Simons R. W. (1997). *Escherichia coli* RNase III (*rnc*) autoregulation occurs independently of *rnc* gene translation. *Mol Microbiol.* 26(5):1125-1135.
144. Mayer J. E., Schweiger M. (1983). RNase III is positively regulated by T7 protein kinase. *J Biol Chem.* 258(9):5340-5343.
145. McDowall K. J., Cohen S. N. (1996). The N-terminal domain of the *rnc* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol.* 255(3):349-355.
146. McDowall K. J., Hernandez R. G., Lin-Chao S., Cohen S. N. (1993). The *ams-1* and *rnc-3071* temperature-sensitive mutations in the *ams* gene are

in close proximity to each other and cause substitutions within a domain that resembles a product of the *Escherichia coli mre* locus. *J Bacteriol.* 175(13):4245-4249.

147. Mathews, C. K. (2002). Bacteriophages. *Encyclopedia of life sciences* 1:15-21

148. McPheeters D. S., Christensen A., Young E. T., Stormo G., Gold L. (1986). Translational regulation of expression of the bacteriophage T4 lysozyme gene. *Nucleic Acids Res.* 14(14):5813-5826.

149. Meng W., Nicholson A. W. (2008). Heterodimer-based analysis of subunit and domain contributions to double-stranded RNA processing by *Escherichia coli* RNase III *in vitro*. *Biochem J.* 410(1):39-48.

150. Mesyanzhinov V. V., Leiman P. G., Kostyuchenko V. A., Kurochkina L. P., Miroshnikov K. A., Sykilinda N. N., Shneider M. M. (2004). Molecular architecture of bacteriophage T4. *Biochemistry.* 69(11):1463-1476.

151. Miller E. S., Kutter E., Mosig G., Arisaka F., Kunisawa T., Ruger W. (2003). Bacteriophage T4 genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:86-156.

152. Miller E. S., Karam J. D., Spicer E. (1994). Control of translational initiation: mRNA structure and protein repressors. In: Karam J. D., Drake J., Kreuzer K., Mosig G., Hall D., Eiserling F., Black L., Spicer E., Kutter E., Carlson K., Miller E. (Eds.) *Molecular Biology of Bacteriophage T4.* *Amer. Soc. for Microbiol.*, Washington, DC. 193-208.

153. Mohanty B. K., Kushner S. R. (2008). Rho-independent transcription terminators inhibit RNase P processing of the *secG leuU* and *metT* tRNA polycistronic transcripts in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 36(2):364-375.

154. Mosig G, Eiserling F. (2006). *The Bacteriophages* (2nd edition). *Oxford university press.*

155. Mosig G, Hall D. H. (1994). Gene expression: a paradigm of integrated circuits. In *Bacteriophage T4* (Mathews C. K., Kutter E. M., Mosig G., Berget P. B. eds.) *Amer. Soc. for Microbiol.*, Washington, D.C. 127-131.

156. Mudd E. A., Higgins C. F. (1993). *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA.

*Mol Microbiol.* 9(3):557-568.

157. Mudd E. A., Prentki P., Belin D., Krish H. M. (1988). Processing of unstable bacteriophage T4 gene 32 mRNAs into stable species requires *Escherichia coli* ribonuclease E. *EMBO J.* 7:3601-3607.

158. Mudd E. A., Carpousis A. J., Krisch H. M. (1990). *Escherichia coli* RNase E has a role in the decay of bacteriophage T4 mRNA. *Genes Dev.* 4:873-881.

159. Nechaev S., Severinov K. (2003). Bacteriophage-induced modifications of host RNA polymerase. *Annual Review of Microbiology.* 57:301-322.

160. Nechaev S., Geiduschek E. P. (2006). The role of an upstream promoter interaction in initiation of bacterial transcription. *EMBO J.* 25(8):1700-1709.

161. Nechaev S., Geiduschek E. P. (2008). Dissection of the bacteriophage T4 late promoter complex. *J Mol Biol.* 379(3):402-413.

162. Neidhardt F. C., Marchin G. L., McClain W. H., Boyd R. F., Earhart C. F. (1969). Phage-induced modification of valyl-tRNA synthetase. *J Cell Physiol.* 74(2):80-87.

163. Neubauer C., Gao Y. G., Andersen K. R., Dunham C. M., Kelley A. C., Hentschel J., Gerdes K., Ramakrishnan V., Brodersen D. E. (2009). The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell.* 139(6):1084-1095.

164. Nicholson A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev.* 23(3):371-390.

165. Nicholson A. W. (2013). Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* doi: 10.1002/wrna.1195.

166. Niyogi S. K., Datta A. K. (1975). A novel oligoribonuclease of *Escherichia coli*. Isolation and properties. *J Biol Chem.* 250(18):7307-7312.

167. Nolan J. M., Petrov V., Bertrand C., Krisch H. M., Karam J. D. (2006). Genetic diversity among five T4-like bacteriophages. *Virol J.* 3(1):3-30.

168. Novogrodsky A., Tal M., Traub A., Hurwitz J. (1966). The enzymatic phosphorylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. II. Further properties of the 5'-hydroxyl polynucleotide kinase. *J Biol Chem.*

241(12):2933-2943.

169. Odaert B., Saida F., Aliprandi P., Durand S., Crechet J. B., Guerois R., Laalami S., Uzan M., Bontems F. (2007). Structural and functional studies of RegB, a new member of a family of sequence-specific ribonucleases involved in mRNA inactivation on the ribosome. *J Biol Chem.* 282(3):2019-2028.

170. O'Farrell P. Z, Gold L. M. (1973). Bacteriophage T4 gene expression. Evidence for two classes of prereplicative cistrons. *J Biol Chem.* 248(15):5502-5511.

171. Okada Y., Wachi M., Hirata A., Suzuki K., Nagai K., Matsuhashi M. (1994). Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *J. Bacteriol.* 176(3):917-922.

172. Ono M., Kuwano M. (1979). A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 129(3):343-357.

173. Oppenheim A. B., Kornitzer D., Altuvia S., Court D. L. (1993). Posttranscriptional control of the lysogenic pathway in bacteriophage lambda. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 46:37-49.

174. Otsuka Y., Koga M., Iwamoto A., Yonesaki T. (2007). A role of RnlA in the RNase LS activity from *Escherichia coli*. *Genes Genet Syst.* 82(4):291-299.

175. Otsuka Y., Ueno H., Yonesaki T. (2003). *Escherichia coli* endoribonucleases involved in cleavage of bacteriophage T4 mRNAs. *J Bacteriol.* 185(3):983-990.

176. Otsuka Y., Yonesaki T. (2012). Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins. *Mol Microbiol.* 83(4):669-681.

177. Otsuka Y., Yonesaki T. (2005). A novel endoribonuclease, RNase LS, in *Escherichia coli*. *Genetics.* 169:13-20.

178. Ouhammouch M., Adelman K., Harvey S. R., Orsini G., Brody E. N. (1995). Bacteriophage T4 MotA and AsiA proteins suffice to direct *Escherichia*

- coli* RNA polymerase to initiate transcription at T4 middle promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1451-1455.
179. Ow M. C., Kushner S. R. (2002). Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes Dev.* 16(9):1102-1115.
180. Ow M. C., Perwez T., Kushner S. R. (2003). RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Mol Microbiol.* 49(3):607-622.
181. Ow M.C., Liu Q., Mohanty B. K., Andrew M. E., Maples V. F., Kushner S. R. (2002). RNase E levels in *Escherichia coli* are controlled by a complex regulatory system that involves transcription of the *rne* gene from three promoters. *Mol. Microbiol.* 43:159-171.
182. Pedersen M., Nissen S., Mitarai N., Lo Svenningsen S., Sneppen K., Pedersen S. (2011). The functional half-life of an mRNA depends on the ribosome spacing in an early coding region. *J Mol Biol.* 407(1):35-44.
183. Pedersen K., Zavialov A. V., Pavlov M. Y., Elf J., Gerdes K., Ehrenberg M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell.* 112(1):131-140.
184. Penner M., Morad I., Snyder L., Kaufmann G. (1995). Phage T4-coded Stp: double-edged effector of coupled DNA and tRNA-restriction systems. *J Mol Biol.* 249(5):857-868.
185. Perwez T., Kushner S. R. (2006). RNase Z in *Escherichia coli* plays a significant role in mRNA decay. *Mol Microbiol.* 60(3):723-737.
186. Petrov V. M., Nolan J. M., Bertrand C., Levy D., Desplats C., Krisch H. M., Karam J. D. (2006). Plasticity of the gene functions for DNA replication in the T4-like phages. *J. Mol. Biol.* 361(1):46-68.
187. Piešiniene L., Truncaite L., Zajanėkauskaitė A., Nivinskas R. (2004). The sequences and activities of RegB endoribonucleases of T4-related bacteriophages. *Nucl. Acids Res.* 32:18.
188. Potapov A. P., Subramanian A. R. (1992). Effect of *E. coli* ribosomal protein S1 on the fidelity of the translational elongation step: reading and misreading of poly(U) and poly(dT). *Biochem Int.* 27(4):745-753.



189. Pragai B., Apirion D. (1981). Processing of bacteriophage T4 tRNAs. The role of RNase III. *J Mol Biol.* 153(3):619-630.
190. Rauhut R, Klug G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 23(3):353-370.
191. Ravel J. M., Shorey R. L., Garner C. W., Dawkins R. C., Shive W. (1969). The role of an aminoacyl-tRNA–GTP-protein complex in polypeptide synthesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 321–330.
192. Regnier P., Arraiano C. M. (2000). Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays.* 22(3):235-244.
193. Richardson C. C. (1965). Phosphorylation of nucleic acid by an enzyme from T4 bacteriophage-infected *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 54(1):158-165.
194. Robertson E. S., Nicholson A. W. (1992). Phosphorylation of *Escherichia coli* translation initiation factors by the bacteriophage T7 protein kinase. *Biochemistry.* 31(20):4822–4827.
195. Robertson H. D. (1982). *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. *Cell.* 30(3):669-672.
196. Rohrer H., Zillig W., Mailhammer R. (1975). ADP-ribosylation of DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* by an NAD<sup>+</sup>: protein ADP-ribosyltransferase from bacteriophage T4. *Eur. J. Biochem.* 60:227–238.
197. Ruckman J., Parma D., Tuerk C., Hall D. H., Gold L. (1989). Identification of a T4 gene required for bacteriophage mRNA processing. *New Biol.* 1:54-65.
198. Ruckman J., Ringquist S., Brody E., Gold L. (1994). The bacteriophage T4 RegB ribonuclease. *J Biol Chem.* 269:26655-26662.
199. Saida F., Uzan M., Bontems F. (2003). The phage T4 restriction endoribonuclease RegB: a cyclizing enzyme that requires two histidines to be fully active. *Nucleic Acids Res.* 31:2751-2758.
200. Saiki R. K., Walsh P. S., Levenson C. H., Erlich H. A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(16):6230-6234.

201. Sakai T., Nakamura N., Umitsuki G., Nagai K., Wachi M. (2007). Increased production of pyruvic acid by *Escherichia coli* RNase G mutants in combination with *cra* mutations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76(1):183-192.
202. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.
203. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
204. Sanson B., Uzan M. (1993). Dual role of the sequence-specific bacteriophage T4 endoribonuclease RegB. *J. Mol. Biol.* 233:429-446.
205. Sanson B., Uzan M. (1995). Post-transcriptional controls in bacteriophage T4: roles of the sequence-specific endoribonuclease RegB. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:141-150.
206. Sanson B., Hu R. M., Troitskaya E., Mathy N., Uzan M. (2000). Endoribonuclease RegB from bacteriophage T4 is necessary for the degradation of early but not middle or late mRNAs. *J Mol Biol.* 297:1063-1074.
207. Schmeissner U., McKenney K., Rosenberg M., Court D. (1984). Removal of a terminator structure by RNA processing regulates *int* gene expression. *J Mol Biol.* 176(1):39-53.
208. Selick H. E., Kreuzer K. N. (1994). Directed insertion/substitution mutagenesis. In: Karam J. D., Drake J., Kreuzer K., Mosig G., Hall D., Eiserling F., Black L., Spicer E., Kutter E., Carlson K., Miller E. (Eds.) *Molecular Biology of Bacteriophage T4.* Amer. Soc. for Microbiol. Washington, DC. 193-208.
209. Selick H. E., Kreuzer K. N., Alberts B. M. (1988). The bacteriophage T4 insertion/substitution vector system. *J Biol Chem.* 263:11336-11347.
210. Sharp J. S., Bechhofer D. H. (2003). Effect of translational signals on mRNA decay in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 185(18):5372-5379.
211. Sherrer R. L., O'Donoghue P., Söll D. (2008). Characterization and evolutionary history of an archaeal kinase involved in selenocysteinyl-tRNA

- formation. *Nucleic Acids Res.* 36(4):1247-59.
212. Shine J., Dalgarno L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71(4):1342-1346.
213. Sim S. H., Yeom J. H., Shin C., Song W. S., Shin E., Kim H. M., Cha C. J., Han S. H., Ha N. C., Kim S. W., Hahn Y., Bae J., Lee K. (2010). *Escherichia coli* ribonuclease III activity is downregulated by osmotic stress: consequences for the degradation of *bdm* mRNA in biofilm formation. *Mol Microbiol.* 75(2):413-425.
214. Sirotkin K., Cooley W., Runnels J., Snyder L. R. (1978). A role in true-late gene expression for the T4 bacteriophage 5' polynucleotide kinase 3' phosphatase. *J Mol Biol.* 123(2):221-233.
215. Skorupski K., Tomaschewski J., R ger W., Simon L. D. (1988). A bacteriophage T4 gene which functions to inhibit *Escherichia coli* Lon protease. *J Bacteriol.* 170(7):3016-3024.
216. Snyder L., Blight S., Auchtung J. (2003). Regulation of translation of the head protein of T4 bacteriophage by specific binding of EF-Tu to a leader sequence. *J Mol Biol.* 334(3):349-361.
217. Soltis D. A., Uhlenbeck O. C. (1982). Independent locations of kinase and 3'-phosphatase activities on T4 polynucleotide kinase. *J Biol Chem.* 257(19):11340-11345.
218. Sommer N., Šalniene V., Gineikiene E., Nivinskas R., R ger W. (2000). T4 early promoter strength probed *in vivo* with unribosylated and ADP-ribosylated *Escherichia coli* RNA polymerase: a mutation analysis. *Microbiology.* 146:2643-2653.
219. Sorensen M. A., Fricke J., Pedersen S. (1998). Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 280(4):561-569.
220. Sousa S., Marchand I., Dreyfus M. (2001). Autoregulation allows *Escherichia coli* RNase E to adjust continuously its synthesis to that of its substrates. *Mol Microbiol.* 42(3):867-878.

221. Stead M. B., Marshburn S., Mohanty B. K., Mitra J., Pena Castillo L., Ray D., van Bakel H., Hughes T. R., Kushner S. R. (2011). Analysis of *Escherichia coli* RNase E and RNase III activity *in vivo* using tiling microarrays. *Nucleic Acids Res.* 39(8):3188-3203.
222. Steege D. A. (2000). Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA.* 6:1079-1090.
223. Stitt B., Hinton D. (1994). Regulation of middle-mode transcription. In Bacteriophage T4 (Mathews C. K., Kutter E. M., Mosig G., Berget P. B. eds.) *Amer. Soc. for Microbiol.* Washington, D.C. 142-160.
224. Stormo G. D., Schneider T. D., Gold L. (1986). Quantitative analysis of the relationship between nucleotide sequence and functional activity. *Nucleic Acids Res.* 14(16):6661-6679.
225. Stoškienė G., Truncaitė L., Zajančauskaitė A., Nivinskas R. (2007). Middle promoters constitute the most abundant and diverse class of promoters in bacteriophage T4. *Mol Microbiol.* 64(2):421-434.
226. Subramanian A. R. (1983). Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 28:101-142.
227. Svenson S. B., Karlstrom O. H. (1976). Bacteriophage T4-induced shut-off of host-specific translation. *J Virol.* 17(2):326-334.
228. Tang Z., Wang K., Tan W., Ma C., Li J., Liu L., Guo Q., Meng X. (2005). Real-time investigation of nucleic acids phosphorylation process using molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* 33(11):e97.
229. Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 75:291-295.
230. Tiemann B., Depping R., Gineikiene E., Kaliniene L., Nivinskas R., Rürger W. (2004). ModA and ModB, two ADP-ribosyltransferases encoded by bacteriophage T4: catalytic properties and mutation analysis. *J Bacteriol.* 186(21):7262-7272.
231. Tiemann B., Depping R., Rürger W. (1999). Overexpression, purification, and partial characterization of ADP-ribosyltransferases ModA and

- ModB of bacteriophage T4. *Gene Expr.* 8(3):187-196.
232. Tock M. R., Walsh A. P., Carroll G., McDowall K. J. (2000). The CafA protein required for 5'-maturation of 16S rRNA is a 5'-end-dependent ribonuclease that has context-dependent broad specificity. *J. Biol. Chem.* 275:8726-8732.
233. Truncaite L., Piesiniene L., Kolesinskiene G., Zajanckauskaite A., Driukas A., Klausas V., Nivinskas R. (2003). Twelve new MotA-dependent middle promoters of bacteriophage T4: consensus sequence revised. *J Mol Biol.* 327(2):335-346.
234. Truncaite L., Zajanckauskaite A., Nivinskas R. (2002). Identification of two middle promoters upstream DNA ligase gene 30 of bacteriophage T4. *J of Mol Biol.* 317(2):179-190.
235. Twist K. A. F., Campbell E. A., Deighan P., Nechaev S., Jain V., Geiduschek E. P., Hochschild A., Darst S. A. (2011). Crystal structure of the bacteriophage T4 late transcription coactivator gp33 with the  $\beta$ -subunit flap domain of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:19961-19966.
236. Tyndall C., Meister J., Bickle T. A. (1994). The *Escherichia coli* *prf* region encodes a functional type IC DNA restriction system closely integrated with an anticodon nuclease gene. *J Mol Biol.* 237(3):266-274.
237. Ueno H., Yonesaki T. (2001). Recognition and specific degradation of bacteriophage T4 mRNAs. *Genetics.* 158:7-17.
238. Ueno H., Yonesaki T. (2004). Phage induced change in the stability of mRNAs. *Virology.* 329:134-141.
239. Umitsuki G., Wachi M., Takada A., Hikichi T., Nagai K. (2001). Involvement of RNase G in *in vivo* mRNA metabolism in *Escherichia coli*. *Genes Cells.* 6(5):403-410.
240. Uzan M. (2009). RNA processing and decay in bacteriophage T4. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 85:43-89.
241. Uzan M., Miller E. S. (2010). Post-transcriptional control by bacteriophage T4: mRNA decay and inhibition of translation initiation. *Virol J.*

7:360.

242. Uzan M. (2001). Bacteriophage T4 RegB endoribonuclease. *Methods Enzymol.* 342:467-480.

243. Uzan M., Favre R., Brody E. (1988). A nuclease that cuts specifically in the ribosome binding site of some T4 mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8895-8899.

244. Vaiškūnaitė R., Miller A., Davenport L., Mosig G. (1999). Two new early bacteriophage T4 genes, *repEA* and *repEB*, that are important for DNA replication initiated from origin E. *J. Bacteriol.* 181:7115-7125.

245. van Houten V., Denkers F., van Dijk M., van den Brekel M., Brakenhoff R. (1998). Labeling efficiency of oligonucleotides by T4 polynucleotide kinase depends on 5'-nucleotide. *Anal Biochem.* 265(2):386-389.

246. Vanzo N. F., Li Y. S., Py B., Blum E., Higgins C. F., Raynal L. C., Krisch H. M., Carpousis A. J. (1998). Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* 12(17):2770-2781.

247. Vincent H. A., Deutscher M. P. (2006). Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J. Biol. Chem.* 281(40):29769-29775.

248. Vincent H. A., Deutscher M. P. (2009). Insights into how RNase R degrades structured RNA: analysis of the nuclease domain. *J. Biol. Chem.* 387(3):570-583.

249. Wachi M., Doi M., Ueda T. (1991). Sequence of the downstream flanking region of the shape-determining genes *mreBCD* of *Escherichia coli*. *Gene.* 106:135-136.

250. Wachi M., Umitsuki G., Nagai K. (1997). Functional relationship between *Escherichia coli* RNase E and the CafA protein. *Mol. Gen. Genet.* 253(4):515-519.

251. Wagner L. A., Gesteland R. F., Dayhuff T. J., Weiss R. B. (1994). An efficient Shine-Dalgarno sequence but not translation is necessary for *lacZ* mRNA stability in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 176(6):1683-1688.

252. Wagner P. L., Waldor M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect. Immun.* 70(8):3985-3993.
253. Wang L. K., Lima C. D., Shuman S. (2002). Structure and mechanism of T4 polynucleotide kinase: an RNA repair enzyme. *EMBO J.* 21(14):3873-3880.
254. Wang L. K., Shuman S. (2001). Domain structure and mutational analysis of T4 polynucleotide kinase. *J Biol Chem.* 276(29):26868-26874.
255. Wang L. K., Shuman S. (2002). Mutational analysis defines the 5'-kinase and 3'-phosphatase active sites of T4 polynucleotide kinase. *Nucleic Acids Res.* 30(4):1073-1080.
256. Wilkens K., Ruger W. (1994). Transcription from early promoters. In Bacteriophage T4 (Mathews C. K., Kutter E. M., Mosig G., Berget P. B. eds.) *Amer. Soc. for Microbiol.* Washington, D.C. 132-141.
257. Wilkens K., Ruger W. (1996). Characterization of bacteriophage T4 early promoters *in vivo* with a new promoter probe vector. *Plasmid.* 35:108-120.
258. Yamaguchi Y., Inouye M. (2011). Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol.* 9(11):779-790.
259. Yamanishi H., Yonesaki T. (2005). RNA cleavage linked with ribosomal action. *Genetics.* 171(2):419-425.
260. Yu D., Deutscher M. P. (1995). Oligoribonuclease is distinct from the other known exoribonucleases of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 177(14):4137-4139.
261. Yuan A. H., Hochschild A. (2009). Direct activator/co-activator interaction is essential for bacteriophage T4 middle gene expression. *Mol Microbiol.* 74(4):1018-1030.
262. Zajankauskaitė A., Raudonikienė A., Nivinskas R. (1994). Cloning and overexpression of genes from genomic region between genes *cd* and *30* of bacteriophage T4. *Gene.* 147:71-76.
263. Zajankauskaite A., Truncaite L., Strazdaite-Žieliene Ž., Nivinskas R. (2008). Involvement of the *Escherichia coli* endoribonucleases G and E in the

secondary processing of RegB-cleaved transcripts of bacteriophage T4. *Virology*. 375:342–353.

264. Zhu H., Smith P., Wang L. K., Shuman S. (2007). Structure-function analysis of the 3' phosphatase component of T4 polynucleotide kinase/phosphatase. *Virology*. 366(1):126-136.