

Nieprogramowany poślizg transkrypcji: analiza porównawcza bakteryjnej (*Escherichia coli*) i bakteriofagowej (T7) polimerazy RNA
mgr Dawid Kościelniak

Spośród wielu obserwowanych procesów przyczyniających się do nieprawidłowości w przekazywaniu informacji genetycznej najmniej opisanym do tej pory jest nieprogramowany poślizg transkrypcji. Proces ten związany jest z deficytem wierności syntezy mRNA zgodnej z matrycą DNA wykazywanym przez polimerazy RNA, które katalizując włączanie kolejnych nukleotydów do rosnącego łańcucha mRNA, w warunkach lokalnej destabilizacji wiązań wodorowych hybrydu RNA:DNA, przesuując go do przodu lub do tyłu w stosunku do matrycy DNA, powodując błędy w mRNA typu insercji lub delecji nukleotydów. Zjawisko to ma swoje konsekwencje fenotypowe, obserwowane jako tworzenie się heterogennej puli mRNA w komórkach, w tym również przywrócenie fenotypu białka dzikiego typu w przypadku ekspresji zmutowanych genów. W tej pracy po raz pierwszy zanalizowano zdolność do poślizgu transkrypcji polimeraz RNA bakteryjnej i fagowej w komórkach *Escherichia coli* na sekwencjach homopolimerycznych typu poli(A/T) krótszych niż 9 nukleotydów.

Dane uzyskane w wyniku analizy porównawczej zdolności do poślizgu transkrypcji bakteryjnej (*Escherichia coli*) i bakteriofagowej (T7) polimerazy RNA z wykorzystaniem modelowego genu metylotransferazy *mboIIM2* i jego wariantu delecyjnego *mboIIM2ΔA356* wykazały kilkudziesięciokrotną różnicę w poziomie ekspresji genu *mboIIM2ΔA356* na korzyść polimerazy fagowej. Efekt ten był wynikiem braku właściwości korekcyjnych, braku wpływu białek elongacyjnych GreAB oraz braku sprzężenia transkrypcji z translacją na powstające błędy transkrypcji w przypadku polimerazy RNA T7, w odróżnieniu od polimerazy bakteryjnej. Zaobserwowano, że epimutacje InDel w przypadku polimerazy RNA *E. coli* będącej podatną na efekt polarności transkrypcji, wywołują mniejszy efekt fenotypowy, jaki wynikałby z analizy polimorfizmu InDel mRNA, w odróżnieniu od polimerazy faga T7. Wyniki uzyskane poprzez wykorzystanie serii genów reporterowych opartych na białku zielonej fluorescencji GFP w fuzji z sekwencjami homopolimerycznymi poli(A/T) potwierdziły, że proces ten zależy od rodzaju i długości sekwencji homopolimerycznej poli(A) lub poli(T) oraz od sekwencji nukleotydów znajdujących się zarówno za, jak i przed sekwencją homopolimeryczną, które mają znaczący wpływ na częstotliwość występowania poślizgu transkrypcji. Próg indukcji poślizgu przez insercję w przypadku RNAP T7 to 3-nukleotydowe powtórzenia A/T, natomiast znaczący poziom detekcji pojedynczych delecji obserwowano w ciągach 4-5 nt poli(A/T). Polimeraza bakteryjna wymaga do indukcji poślizgu przez insercję lub delecję ciągów o długości co najmniej 7 nukleotydów typu T. W obu przypadkach

preferowane są pojedyncze insercje nukleotydów. Najbardziej prawdopodobny typ poślizgu dla RNAP T7 to insercja nukleotydu w sekwencjach poli(A) i delecja w sekwencjach poli(T), w odróżnieniu od RNAP *E. coli* preferującej sekwencje poli(T) w obu przypadkach.