

**σ^{54} -välitteisen transkription initiaatio ja
*Synechocystis sp. PCC6803***

Pro Gradu-tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Biokemia

Joulukuu 2017

Outi Karhuvaara

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

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

KARHUVAARA, OUTI: σ^{54} -välitteisen transkription initiaatio ja *Synechocystis* sp. PCC6803

Pro Gradu-tutkielma, 78 s., 6 liites.

Biokemia

Joulukuu 2017

Sigmafaktorien tehtävä on tunnistaa promoottori ja avustaa RNA polymeraasia (RNAP) transkription aloituksessa. Bakteereilla on useita sigmafaktoreita, jotka säätelevät eri geenien ekspressiota. Sigmafaktorit jaetaan σ^{70} ja σ^{54} -perheisiin ja ne eroavat toisistaan niin rakenteeltaan kuin toiminnaltaan. σ^{70} -RNAP-holoentsyymi isomerisoituu spontaanisti transkriptioon kykeneväksi kompleksiksi, kun taas σ^{54} -RNAP vaatii ATP:ta hydrolysoivan aktivaattoriproteiinin ja DNA:ta taivuttavia avustavia tekijöitä. σ^{70} ja σ^{54} -perheiden promoottorialueet ovat myös hyvin erilaiset. Syanobakteereilla ei ole löydetty σ^{54} :ää, vaikka se tavataan useimmilla bakteerilajeilta. Syanobakteerien RNAP poikkeaa muiden bakteerien RNAP:sta, ja ei tiedetä kykeneekö σ^{54} muodostamaan transkription aloittavan kompleksin syanobakteerien RNAP:n kanssa.

Syanobakteerin RNAP:n ja σ^{54} :n välisen vuorovaikutuksen tutkimista varten suunniteltiin ja rakennettiin *Synechocystis* sp. PCC6803 (tästäed *Synechocystis*)-kanta, johon oli siirretty synteettinen *sigma54*-operoni sisältäen *Escherichia coli* σ^{54} (*rpoN*), σ^{54} -aktivaattorin, PspF:n, ja DNA:n taipumista avustava proteiinin IHF:n geenit. Tehokasta ja kasvatusolosuhteilla säädeltävää induointia varten operonin edessä oli kuumalla (P_{sigB}) tai kirkaalla valolla (P_{sigD}) induoituva syanobakteeripromoottori. Samaan *Synechocystis*-kantaan siirrettiin myös bakteerilusiferaasin geenit (*luxCDABE*) *E. coli* σ^{54} -spesifisen promoottorin P_{psp} alaisuuteen, jolloin bioluminesenssia mittaamalla voitiin selvittää aktivoiko σ^{54} -RNAP-holoentsyymi transkription syanobakteereilla. Lisäksi *Synechocystis*ksen promoottoreita tutkittiin siirtämällä *luxCDABE* promoottorien P_{sigB} ja P_{sigD} -alaisuuteen.

*Synechocystis*ksen promoottorin P_{sigD} havaittiin induoituvan kirkaassa valossa, jossa reportterigeenin tuottama luminesenssi kasvoi nelinkertaiseksi standardiolosuhteisiin verrattuna. P_{sigB} induoitui kuumassa valossa, mutta reportterigeenin tuottaman bioluminesenssin kasvu oli vähäisempää. *Synechocystis*-kanta, jossa on synteettinen *sigma54*-operoni P_{sigD} :n alaisuudessa ja *luxCDABE* P_{psp} :n alaisuudessa, saatiin luotua, ja sen toimintaa voidaan tutkia tulevaisuudessa.

Asiasanat: sigmafaktorit, transkriptio, σ^{54} , syanobakteerit, promoottorit

Sisältö

Sanasto ja Lyhenteet.....	3
I. Johdanto	5
1 Alkusanat	5
2 RNA-polymeraasin rakenne ja toiminta.....	6
3 σ -faktorit.....	7
3.1 σ^{70} -perhe	9
3.1.1 RNAP- σ^{70} ja transkription initiaatio	11
3.2 σ^{54} -perhe	11
3.2.1 σ^{54} :n avoimen kompleksin muodostusta inhiboivat rakenteet.....	14
3.2.2 σ^{54} :n aktivaattoriproteiinit, bEBP:t.....	15
3.2.3 bEBP:n katalysoima hydrolyysi ja RNAP σ^{54} :n modifikaatio	19
3.2.4 σ^{54} -välitteinen transkription initiaatio.....	22
4 Syanobakteerit.....	24
4.1 Syanobakteriaalinen RNAP	24
4.1.1 Syanobakteerien sigmafaktorit	25
5 Syanobakteerien käyttö tutkimuksessa ja bioteknologisissa sovelluksissa	26
5.1 Syanobakteriaaliset promoottorit heterologisten geenien ekspressiossa	28
6 σ^{54} -välitteinen transkriptiosysteemi syanobakteereihin	29
6.1 <i>Psp</i> -operoni	31
6.1.1 <i>Psp</i> -operonin aktivaattori PspF	32
6.1.2 IHF:n rooli <i>psp</i> -operonin transkriptiossa.....	34
6.1.3 <i>Psp</i> -promoottori	34
6.2 Bioluminesenssi ja lusiferaasientsyymit	35
7 Työn tavoitteet	37
II. Menetelmät	39
1 <i>Sigma54</i> -operonin suunnittelu	39
2 <i>Synechocystis</i> -kannat ja ylläpitokasvatusolosuhteet.....	40
2.1 Kasvatuskokeiden olosuhteet.....	40
3 Neutraalien kohtien valintaprosessi	41
3.1 <i>slr0271</i> , <i>slr0397</i> , <i>slr1396</i> , <i>sll1476</i> ja <i>slr0397</i> –geenien ekspression muutokset kuumassa ja kirkkaassa valossa	41
3.2 Kasvatuskokeet neutraalien kohtien valintaa varten	42

4	Kloonausprosessit <i>E. colissa</i>	42
4.1	Plasmidien eristys ja digestiot	43
4.2	Plasmidit	43
4.3	Nourseotriiniresistenssiä koodaavan kasetin liittäminen <i>lux</i> -operoniin	44
4.4	Promoottorin liittäminen <i>lux</i> -operoniin	45
4.5	Kanamysiiniresistenssiä koodaavan kasetin liittäminen σ^{54} -operoniin.....	47
5	<i>Synechocystis lux</i> -kantojen luominen	47
5.1	<i>Synechocystiksen</i> transformaatio	48
5.2	Transformaation onnistumisen verifiointi PCR:llä.....	49
5.3	Luminesenssimittauksen optimointi <i>Synechocystis</i> -kasvatuksia varten.....	50
5.4	Luminesenssimittaukset	51
III.	Tulokset.....	52
1	σ^{54} -välitteisen transkriptiosysteemin ja synteettisen <i>sigma54</i> -operonin suunnittelu.....	52
2	<i>Synechocystis lux</i> -kantojen tuottama luminesenssi	53
3	<i>Synechocystikseen insertoitu luxCDABE</i> ei tuota luminesenssia <i>psp</i> -promoottorin alaisuudessa	55
4	<i>Synechocystis</i> -promoottorit P_{sigB} ja P_{sigD} indusoituivat kuumassa ja kirkaassa valossa	56
5	Neutraalin kohdan määrittäminen <i>Synechocystiksen</i> genomissa	58
6	Suunniteltu konstrukt σ^{54} -välitteiseen transkriptioon <i>Synechocystiksessä</i>	62
IV.	Tulosten tarkastelu.....	64
1	<i>slr0397</i> on neutraali kohta <i>Synechocystiksen</i> genomissa	64
2	<i>Lux</i> -operonin toiminta <i>Synechocystiksessä</i>	65
3	<i>Synechocystis</i> -peräisten promoottorien P_{sigD} ja P_{sigB} toiminta	66
4	σ^{54} ja <i>Synechocystis</i> tulevaisuudessa	68
5	Loppupäätelmät.....	69
	Kiitokset.....	71
	Lähteet	72
	Liitteet	79

Sanasto ja Lyhenteet

σ -faktori = sigmafaktori

RNAP = RNA polymeraasi

RP_C = suljettu kompleksi

RP_O = avoin kompleksi

PSF = Primary Sigma Factor, primäärinen sigmafaktori

CBD = Core Binding Domain, Ydinentsyymiin sitoutuva domeeni

HTH-ELH = Helix-turn-helix – Extra Long Helix, Erittäin pitkä heeliksi

RpoN = σ^{54} :n yleisesti käytetty toinen nimi

UAS = Upstream Activator Sequence, aktivaattorisekvenssi

bEBP = Bacterial Enhancer Binding Protein, aktivaattorisekvenssiin sitoutuva proteiini

AAA+ = ATPases Associated with various cellular Activities

IHF = Integration Host Factor

Psp = Phage Shock Protein, esimerkiksi PspA

psp operoni = PspA-E-proteiineja koodaava operoni

luxCDABE = *Photobacterium luminescens*-bakteerista peräisin olevat geenit *luxCDABE*, jotka koodaavat lusiferaasia ja sen substraatin tuottoon tarvittavia entsyymejä

σ^{54} -operoni = synteettinen operoni, jossa *E. coli* *rpoN*, *pspF*, *ihfA* ja *ihfB* on järjestetty operoniksi

P_{sigB} = *Synechocystis* geenin *sigB* promoottori

P_{sigD} = *Synechocystiksen* geenin *sigD* promoottori

P_{psbA2} = *Synechocystiksen* geenin *psbA2* promoottori

RBS = Ribosome Binding Sequence, ribosomin sitoutumiskohta

TSS = Transcription Start Site, transkription aloituskohta

I. Johdanto

1 Alkusanat

Bakteerien geenisäätely tapahtuu pääasiallisesti transkription tasolla. Transkriptio on geeniekspression ensimmäinen vaihe, jossa DNA:sta syntetisoidaan mRNA. Transkriptiosta vastaavat RNA polymeraasi (RNAP) ja siihen sitoutuvat dissosioituvat sigmafaktorit. Erityisesti sigmafaktoreilla on keskeinen rooli transkription säätelyssä, sillä niiden sitoutumista vaaditaan transkription aloitukseen. Sigmafaktoreita esiintyy vain bakteereilla; eukaryooteilla transkription aloitukseen osallistuvat erilaiset transkription säätelijät. Sigmafaktorit jaetaan kahteen ryhmään, ja transkription initiaatiomekanismi eroaa kahden ryhmän välillä merkittävästi.

Syanobakteerit ovat poikkeuksellinen ja heterogeeninen ryhmä prokaryootteja, jotka kykenevät fotosynteesiin. Fotosynteettisen koneiston lisäksi myös niiden transkriptioon osallistuvat tekijät eroavat muista prokaryooteista. Syanobakteerien RNAP muistuttaa enemmän kasvien kloroplastien RNAP:ia kuin bakteeriaalista RNAP:ia. Syanobakteereilla tavataan vain yhden ryhmän sigmafaktoreita.

On epäselvää, millaisia vaikutuksia syanobakteerien poikkeavalla RNAP:n rakenteella on transkriptiossa ja vuorovaikutuksessa sigmafaktorien kanssa. Tämän työn tavoitteena on tutkia, kykeneekö syanobakteerien RNAP aloittamaan transkription muilla bakteereilla esiintyvän σ^{54} -tyypin sigmafaktorin kanssa.

2 RNA-polymeraasin rakenne ja toiminta

Bakteereilla on yksi RNAP, joka vastaa sekä mRNA:n että ei-koodaavan RNA:n synteesistä. Entsyymien polymeraasiaktiivisuudesta vastaava, noin 400 kDa:n kokoinen ydin, koostuu kahdesta α -alayksiköstä sekä yhdestä β -, β' - ja ω -alayksiköstä (Vassylyev et al. 2002). β ja β' , joita koodaavat geenit *rpoB* ja *rpoC*, muodostavat entsyymien katalyyttisen keskuksen; niiden välille muodostuu vako, joka sitoo transkriptiokuplan. Kaksi identtistä *rpoA*:n koodaamaa α -yksikköä tehostavat transkriptiota ja osallistuvat promoottorin tunnistukseen. ω -alayksikkö, jota koodaa *rpoZ*, ei ole solun hengissä säilymisen kannalta täysin välttämätön, mutta vaikuttaa RNAP:n muodostumiseen ja vakauten (Mukherjee, Chatterji 1997). Ydinentsyymi kykenee sitoutumaan DNA:han epäspesifisesti ja syntetisoimaan RNA:ta DNA:n päädyistä ja katkoista, mutta spesifisen transkription initiaatioon vaaditaan myös dissosioituva alayksikkö σ (Vassylyev et al. 2002). σ -faktorin tehtävä on tunnistaa transkriptoitavaa geeniä edeltävä, promoottoriksi kutsuttu DNA-sekvenssi, ja välittää kaksijuosteisen DNA:n sulamista yksijuosteiseksi templaatiksi. Transkription aloitus edellyttää σ -faktoriksi kutsutun alayksikön sitoutumista α_2 -, β -, β' - ja ω -alayksiköiden muodostamaan ydinentsyymiin. RNAP ja σ -faktori muodostavat RNAP- σ -holoentsyymiin.

Geenien transkriptio on tiukasti säädelty tapahtuma, joka koostuu aloitus-, pidentymis- ja lopetusvaiheesta. Transkription säätelyyn on kehittynyt useita menetelmiä; prokaryooteilla säätely tapahtuu useimmiten erilaisten sigmafaktorien välityksellä, kun taas eukaryooteilla säätelyyn osallistuvat TFIIB ja muut yleiset transkriptiotekijät (Wosten 1998).

Ensimmäinen vaihe transkriptiossa on transkription initiaatio, jonka avaintapahtumia ovat RNAP:n sitoutuminen DNA:han, DNA:n sulaminen yksijuosteiseksi sekä templaatti-DNA:n ja sen vastinjuosteen asettumien oikeille paikoilleen. Prokaryooteilla transkription initiaatioon vaaditaan RNAP:iin sitoutuvaa sigmafaktoria. Holoentsyymi tunnistaa geeniä edeltävän

promoottorisekvenssin, joka sisältää tunnistukseen vaadittavat konsensussekvenssit, ja sitoutuu siihen sigmafaktorin välityksellä (Fassler, Gussin 1996). Holoentsyymien sitoutuessa DNA:han syntyy suljettu transkriptiokompleksi RP_C , joka isomerisoituu transkriptioon kykeneväksi avoimeksi kompleksiksi RP_o (Wosten 1998, Fassler, Gussin 1996).

Aloituvaiheen jälkeen seuraa pidentymisvaihe, jolloin sigmafaktori irtoaa RNAP:sta. RNAP syntetisoi 5' -> 3' suuntaan mRNA:ta, joka on templaattijuosteelle komplementaarinen. RNAP:n edetessä DNA:ta pitkin transkriptiokuplan taakse jäävät DNA-juosteet palaavat takaisin kaksijuosteiseen muotoonsa. Terminaatio tapahtuu, kun RNAP dissosioituu DNA:sta kohdatessaan terminaatiosekvenssin. Terminaatio voi tapahtua joko rho-tekijästä riippuvaisella tai riippumattomalla tavalla. Rho-tekijästä riippumattomassa terminaatioissa hiusneularakenne ja usean urasiilin sekvenssi johtaa RNAP:n pysähtymiseen ja dissosioitumiseen DNA:sta. Rho-tekijästä riippuvaisessa terminaatioissa RNAP:n dissosioitumista DNA:sta avustaa rho-proteiini, joka on RNA:DNA-helikaasi.

3 σ -faktorit

Sigmafaktorit ovat transkription initiaatioissa avustavia tekijöitä. Sigmafaktorilla itsessään ei ole katalyyttistä aktiivisuutta, vaan se avustaa RNA-polymeraasia transkriptoitavaa geeniä edeltävän promoottorialueen tunnistuksessa ja siihen kiinnittymisessä (Fassler, Gussin 1996). Sigmafaktorit sitoutuvat reversiibelisti RNAP:iin. Transkription aloitusvaihetta seuraavassa pitenemisvaiheessa σ -faktoria ei enää tarvita, ja pääsääntöisesti se dissosioituu RNAP:sta (Wosten 1998). Bakteereilla on tyypillisesti yksi primäärinen σ -faktori ja useampi vaihtoehtoinen σ -faktori. Primäärinen σ -faktori on konstitutiivisesti aktiivinen, ja se osallistuu useimpien normaaleissa kasvuolosuhteissa vaadittavien geenien

transkriptioon. Vaihtoehtoiset sigmafaktorit sen sijaan ekspressoituvat tai aktivoituvat spesifisissä olosuhteissa ja säätelevät näissä spesifisissä olosuhteissa vaadittavien geenien transkriptiota. (Wosten 1998)

σ -faktorit jaetaan kahteen perheeseen: σ^{70} ja σ^{54} , jotka eroavat toisistaan rakenteeltaan, toiminnaltaan ja promoottorisekvensiltään (Wosten 1998). σ^{70} -perhe sisältää useita eri faktoreita: primäärinen sigmafaktori ja useat vaihtoehtoiset sigmafaktorit kuuluvat tähän ryhmään. σ^{54} -perheeseen sen sijaan kuuluu yksi useilla bakteereilla tavattava vaihtoehtoinen sigmafaktori, joka tunnetaan myös nimellä σ^N (Merrick 1993). Syanobakteereilla ja arkkibakteereilla σ^{54} -perheen sigmafaktoreita ei tavata. Pääsääntöisesti bakteerilla on vain yksi *rpoN*-geeni. σ^{54} säätelee useita eri funktioita bakteereissa: energiametaboliaa, typen ja hiilen käyttöön liittyviä prosesseja, RNA:n muokkausta, kemotaksista, ja vasteita kuumaan ja virusinfektioon (Buck et al. 2000). σ^{54} ei tyypillisesti ole välttämätön bakteerin kasvulle ja selviytymiselle suotuisissa olosuhteissa, vaan suurin osa sen säätelemistä geneistä on tarpeellisia erilaisissa stressiolosuhteissa (Buck et al. 2000). Kahden eri sigmafaktorinperheen ja niiden säätelymekanismien evoluutiota ei tunneta (Saecker, Record & Dehaseth 2011).

Molemmat sigmafaktorit sitoutuvat samaan RNA-polymeraasiin, mutta transkription aloitukseen vaadittavat mekanismit ovat erilaisia. σ^{70} -RNAP-holoentsyymi isomerisoituu spontaanisti inaktiivisesta suljetusta kompleksista transkriptionaalisesti aktiiviseksi avoimeksi kompleksiksi, kun taas σ^{54} -RNAP:n muodostaman suljetun kompleksin isomerisaatio avoimeksi vaatii avustavia tekijöitä (Buck et al. 2000). σ^{54} -RNAP-holoentsyymien isomerisoituminen avoimeksi kompleksiksi tapahtuu ATP:ta hydrolysoivien aktivaattoriproteiinien avulla. Aktivaattoriproteiinit puolestaan sitoutuvat aktivaattorisekvensseihin, jotka sijaitsevat σ^{54} :n säätelemien geenien ylävirrassa. Kaiken kaikkiaan σ^{54} -välitteinen transkriptio on tiukemmin säädeltyä kuin σ^{70} -välitteinen transkriptio.

3.1 σ^{70} -perhe

σ^{70} -perheeseen kuuluu useita sigmafaktoreita. Se on saanut nimensä *E. coli* 70 kDa:n kokoisen primäärisen sigmafaktorin mukaan (Harley, Reynolds 1987). Primäärisen sigmafaktorin lisäksi esimerkiksi *E. coli* lta on löydetty viisi σ^{70} -perheen faktoria, jotka on nimetty niiden molekyylipainon mukaan: σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} , ja σ^{18} (Wigneshweraraj et al. 2000).

σ^{70} -välitteisesti transkriptoitujen geenien promoottorialueet sisältävät tyypillisesti kaksi tunnusomaista piirrettä, joita kutsutaan konsensussekvensseiksi (Harley, Reynolds 1987, Fassler, Gussin 1996). Yksi kuuden emäksen mittainen konsensussekvenssi (useimmiten TTGACA) sijaitsee 35 emäsparia ylävirtaan transkription aloituskohdasta +1 (Transcription start site, TSS) Toinen konsensussekvenssi TATAAT sijaitsee 10 emäsparia ylävirtaan transkription aloituskohdasta. RNAP:iin sitoutuneena σ^{70} tunnistaa ja sitoutuu geenien promoottoreihin -35 ja -10 konsensussekvenssien välityksellä. RNAP- σ^{70} :n sitoutuessa promoottorialueelle syntyy epävakaasti suljettu kompleksiksi, joka isomerisoituu spontaanisti transkriptionaaliseksi aktiiviseksi avoimeksi kompleksiksi. (Saecker et al. 2011)

σ^{70} -perhe jaetaan edelleen neljään eri ryhmään (Paget 2015). Ryhmään 1 kuuluvat primääriset sigmafaktorit (primary sigma factors, PSF), jotka ovat välttämättömiä solun hengissä säilymisen kannalta, ja jotka säätelevät eksponentiaalisen kasvun vaiheessa ekspressoitavien geenien transkriptiota. Ryhmään 2 kuuluvat PSF:n kaltaiset sigmafaktorit, jotka eivät ole välttämättömiä eksponentiaalisen kasvun vaiheessa ihanteellisissa kasvuolosuhteissa. Useimmilla ryhmän 2 faktoreilla on rooli erilaisiin stressiolosuhteisiin, kuten kuumuuteen ja typenpuutteeseen, sopeutumisella. Niitä tavataan useita enterobakteereilla, syanobakteereilla sekä korkean GC-pitoisuuden omaavilla gram-positiivisillä bakteereilla. Ryhmään 3 kuuluvat sigmafaktorit eroavat aminohapposekvenssiltään ryhmän 1 ja 2 sigmafaktoreista. Nämä vaihtoehdot

sigmafaktorit säätelevät muun muassa ekstrasytoplasmisissa olosuhteissa, sporulaatiossa ja flagellan muodostuksessa tarvittavien geenien ekspressiota (Tuominen, Tyystjarvi & Tyystjarvi 2003, Paget 2015).

σ^{70} -perheen jäsenet koostuvat neljästä helikaalisesta domeenista σ_1 , σ_2 , σ_3 ja σ_4 (kuva 2), joita yhdistävät joustavat linkkerit (Paget 2015, Lonetto, Gribskov & Gross 1992). Jokainen domeeni voidaan jakaa toiminnallisiin aladomeeneihin, jotka osallistuvat promoottorin tunnistukseen, RNAP:n sitomiseen ja isomerisaatioon.

N-terminaalinen σ_1 on vähiten konservoitunut alayksikkö. $\sigma_{1.1}$ tavataan vain primäärisillä sigmafaktoreilla, ja se sijaitsee alavirrassa DNA:ta sitovassa kanavassa apo-muodossa, jolloin DNA ei ole täysin sitoutunut, vaan työntynyt ulos kanavasta RNAP-promoottori-DNA-kompleksissa. Alayksikkö $\sigma_{1.2}$ osallistuu todennäköisesti avoimen kompleksin muodostukseen, ja se löytyy useimmilta sigmafaktoreilta. (Wosten 1998)

Alayksikkö σ_2 on konservoitunein, ja sen eri osat sitoutuvat RNAP:iin ja ja sulattavat DNA:n yksijuosteiseksi. $\sigma_{2.1}$ sitoutuu RNAP:iin, kun taas $\sigma_{2.3}$:lla on tärkeä rooli DNA:n sulamisessa yksijuosteiseksi. $\sigma_{2.4}$ tunnistaa -10-konsensussekvenssin promoottorialueella. (Wosten 1998, Paget 2015)

σ_3 jakautuu kahteen osaan. $\sigma_{3.1}$ sisältää DNA:ta sitovan HTH-motiivin, ja huomattavasti vähemmän konservoitunut $\sigma_{3.2}$ saattaa osallistua sigmafaktorin ja RNAP:n väliseen sitoutumiseen. (Wosten 1998)

Alue σ_4 jaetaan myös kahteen osaan. $\sigma_{4.2}$ vastaa -35 promoottorialueen tunnistuksesta. $\sigma_{4.1}$:n roolista ei ole varmuutta, mutta sen oletetaan sitoutuvan transkriptiota aktivoiviin tekijöihin initiaation aikana. (Wosten 1998)

3.1.1 RNAP- σ^{70} ja transkription initiaatio

Sitoutuessaan promoottoriin RNAP- σ^{70} muodostaa DNA:n kanssa aluksi suljetun kompleksin RP_c , jonka seurauksena molemmat molekyylit käyvät läpi rakenteellisia muutoksia (Saecker et al. 2011). Konsensussekvenssistä -10 avautuu noin 13 emäsparia, jonka seurauksena muodostuu epästabiili avoin kompleksi. Templaattijuoste +1 (T) siirtyy RNAP:n aktiiviseen keskukseen, ja templaatin vastinjuoste (nontemplate strand, NT) siirtyy sitä sitovaan kohtaan. Avoin kompleksi stabiloituu kun alavirran "clamp" muodostuu ja sitoo DNA:ta.

σ^{70} ei ole tarpeellinen transkription pitenemisvaiheessa ja vapautuu tyypillisesti transkriptiokompleksista kun syntyvän RNA:n pituus saavuttaa 12-15 nukleotidia (Wosten 1998). Syntyvän RNA:n saavuttaessa 8-9 nukleotidin pituuden on σ_2 :n ja σ_4 :n välisen linkkerin siirryttävä RNA:n poistumiskanavan edeltä, jotta RNA voi pidentyä. Kilpailu syntyvän RNA:n kanssa siis vapauttaa $\sigma_{3.2}$:n σ_4 :n, ja vuorovaikutus σ_2 :n ja RNAP:n β' :n katkeaa toistaiseksi tuntemattomalla tavalla (Saecker et al. 2011).

3.2 σ^{54} -perhe

σ^{54} -perheeseen kuuluu vain yksi sigmafaktori. Sen säätelemiä geenejä vaaditaan useimmiten erilaisissa stressiolosuhteissa tai jonkin spesifisen typpi- tai hiililähteen ollessa saatavilla (Buck et al. 2000). Nimensä mukaan se on *E. coli*lla 54 kDa:n kokoinen (Zhang, Buck 2015). σ^{54} eroaa σ^{70} -perheestä niin sekvenssiltään kuin rakenteeltaankin. -10- ja -35 konsensussekvenssien sijaan se tunnistaa konsensussekvenssiä TGC kohdassa -12 ja GG -24 ennen transkription aloituskohtaa. -12- ja -24-alueet ovat osa laajempaa konsensussekvenssiä YTGGCACGrNNNTTGCW (iso kirjain= voimakkaasti konservoitunut, pieni kirjain=

heikosti konservoitunut, N= konservoitumaton, Y= pyrimidiiniemäs, R= puriiniemäs ja W= A tai T) (Bush, Dixon 2012).

σ^{54} sisältää kolme rakenteellista domeenia, alueet I-III (RI-RIII) (kuva1 ja 2). Domeeneja yhdistävät pitkät nauhamaiset silmukat, jotka kattavat ison osan RNAP-ydinentsyymien pinta-alasta (Zhang, Buck 2015). σ^{54} :n domeenit eivät ole sekvenssiltään homologisia σ^{70} -perheen faktorien kanssa, mutta ne sitoutuvat samoihin osiin ydinentsyymiä ja ovat toiminnallisesti samankaltaisia (Wigneshweraraj et al. 2000).

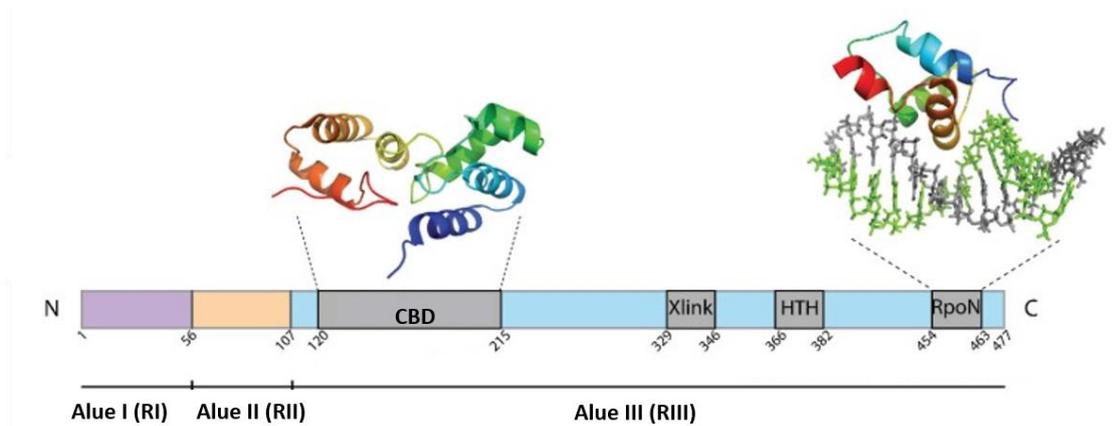
Aminoterminaalinen alue I (RI, *E. coli* aminohapot 1-56) sisältää runsaasti glutamiini- ja leusiinimolekyylejä, ja se vuorovaikuttaa aktivaattoriproteiinien, RNAP:n ja -12 promoottorisekvenssin kanssa (Zhang, Buck 2015). RI koostuu kahdesta α -kierteestä, jotka muodostavat koukkumaisen rakenteen (Yang et al. 2015). RI:stä 50 aminohappoa on erittäin konservoituneita. RI inhiboi avoimen kompleksin muodostumista ja on siten transkriptiota aktivoivien tekijöiden muokkauksen kohde. RI ei ole välttämätön promoottorisekvenssiin tai RNAP:in sitoutumisen kannalta, mutta tarpeellinen aktiivisuuden säätelyn kannalta (Zhang, Buck 2015).

Alue II (RII, *E. coli* aminohapot 57-120) muodostuu RI:n tavoin kahdesta α -heliksistä, joiden lisäksi se sisältää syväälle RNAP:iin hautautuvia silmukoita. Se vaihtelee aminohapposekvenssiltään ja pituudeltaan eri bakteerilajeissa. Sen oletetaan osallistuvan DNA:n sitomiseen ja DNA:n sulamiseen yksijuosteiseksi templaatiksi. Joidenkin bakteerien σ^{54} :stä se puuttuu täysin, mikä viittaa siihen että se ei ole proteiinin toiminnalle välttämätön. RII voidaan jakaa alueisiin RII.1, RII.2 ja RII.3 perustuen niiden sijaintiin holoentsyymissä.

Alue III (RIII) sisältää useita konservoituneita, funktionaalisia alueita, ja jaetaan joissain tapauksissa vielä useampaan domeeniin. RNAP:iin sitoutumisesta vastaa CBD (Core Binding Domain). CBD muodostuu *E. coli* aminohapoista 120-250, jotka muodostavat kahdesta α -heliksistä. CBD:tä seuraa silmukka ja sen jälkeen erittäin pitkä α -heeliksi, ELH (Extra Long Helix, 315-353). ELH:ta seuraa

konservoitunut HTH-motiivi, jonka oletetaan osallistuvan -12-promoottorisekvenssin tunnistukseen. (Zhang, Buck 2015)

RIII:n C-terminalisessa päässä sijaitsee -24-konsensussekvenssin tunnistavan RpoN-laatikon sisältävä RpoN-domeeni (aminohapot 415-477), joka koostuu kolmen heliksin kimpusta. Se on kaikista domeeneista konservoitunein eri organismien välillä. RpoN-laatikko koostuu kymmenen aminohapon sekvenssistä ARRTVAKYRE, joka tavataan kaikissa σ^{54} -proteiineissa (Doucleff et al. 2007). RpoN-domeeni ulottuu ulos holoentsyymistä, eikä ole kontaktissa sigmafaktorin muihin osiin tai RNAP:iin.

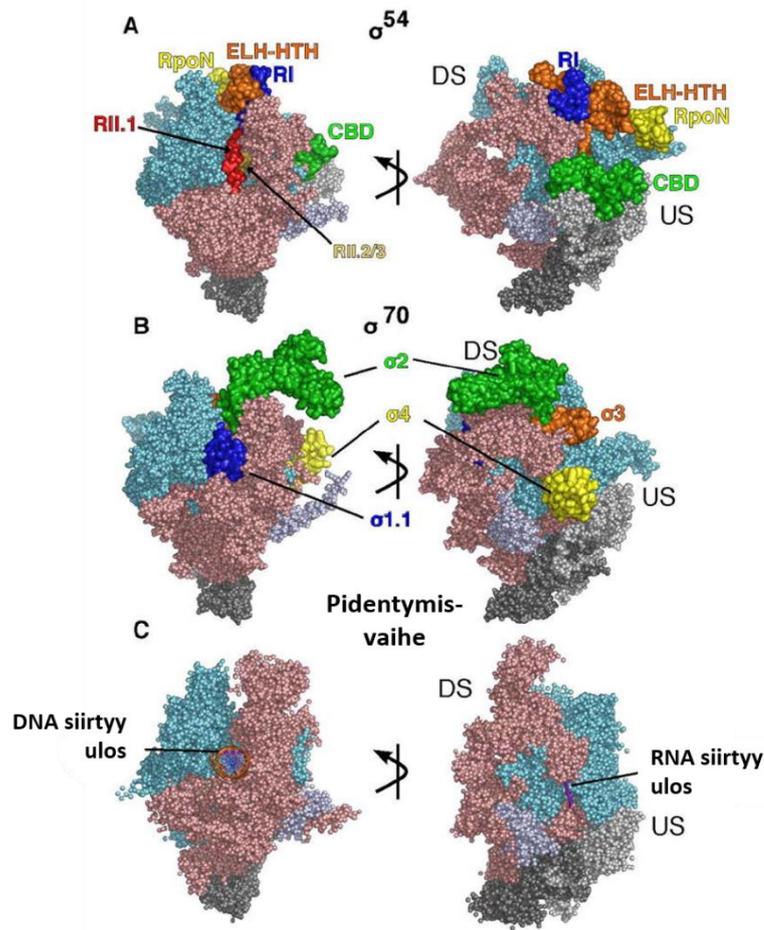


Kuva 1. σ^{54} :n domeenit RI-III N-terminaalista päästä C-terminaaliseen päähän. Violetilla merkitty alue I (RI) osallistuu aktivaattoriproteiinin sitomiseen, -12-promoottorialueen tunnistukseen ja jossain määrin RNAP:n ydinentsyymiin sitoutumiseen. Sinisellä merkitty Alue III (RIII) sisältää useita konservoituneita alueita (merkitty harmaalla). Core Binding (CBD)-alue sitoutuu ydinentsyymiin. Xlink- ja HTH-alueet osallistuvat holoentsyymien ja -12-promoottorialueen väliseen vuorovaikutukseen. Erittäin konservoitunut RpoN-alue tunnistaa -24-sekvenssin promoottorialueella. (Muokattu kuvasta Zhang, Buck 2015)

3.2.1 σ^{54} :n avoimen kompleksin muodostusta inhiboivat rakenteet

RI on pääasiallinen avoimen kompleksin muodostuksen inhibiittori. Suljetussa kompleksissa se sijaitsee β - ja β' -alayksiköiden välisessä vaossa. Se vuorovaikuttaa RIII:n kanssa, muodostaen näin esteen promoottori-DNA:n siirtymiselle RNAP:n aktiiviseen keskukseen (Yang et al. 2015). Avoimen kompleksin muodostusta inhiboiva keskus muodostuu ensisijaisesti RI:n ja -12 konsensussekvenssin välille. Mutaatiot joko -12/-11 alueella promoottorissa tai promoottorin tunnistukseen osallistuvissa osissa σ^{54} :ssa poistavat tarpeen aktivaattoriproteiinille (Guo, Lew & Gralla 2000), ja σ^{54} -mutantit, joista RI on poistettu kykenevät aktivaattorista riippumattomaan transkriptioon valmiiksi yksijuosteiseksi sulaneesta templaatti-DNA:sta.

RII.1 sijaitsee alavirran DNA:ta sitovassa vaossa, ja sillä siten on rooli avoimen kompleksin muodostumisen inhibitiassa. RII.2 on templaatti-DNA:n paikassa, ja sen pitää myös siirtyä, jotta templaatti-DNA kykenee siirtymään katalyyttiseen keskukseen. (Yang et al. 2015)



Kuva 2. RNAP- σ^{54} -holoentsyymi (A), RNAP- σ^{70} -holoentsyymi (B) ja RNAP pidentymisvaiheessa (C). Kuvassa A on esitetty σ^{54} :n konservoituneet alueet RI (sininen), RII.1 (punainen), RII.2 (vaaleankeltainen), CBD (vihreä), ELH-HTH (oranssi) ja RpoN-domeeni (keltainen). Kuvassa B on esitetty σ^{70} :n konservoituneet alayksiköt $\sigma_{1.1}$ (sininen), σ_2 (vihreä), σ_3 (oranssi) ja σ_4 (keltainen). Kuvassa C pidentymisvaiheessa olevasta RNAP:sta on dissosioitunut sigmafaktori, ja DNA:n ja RNA:n ulostuloaukot ovat näkyvissä. DNA:n ylävirran sijainti merkitty lyhenteellä US (upstream) ja alavirran sijainti lyhenteellä DS (downstream). (Muokattu kuvasta Yang et al. 2015)

3.2.2 σ^{54} :n aktivaattoriproteiinit, bEBP:t

σ^{54} muodostaa RNAP:n kanssa inaktiivisen suljetun kompleksin, jonka isomerisoituminen avoimeksi kompleksiksi vaatii energiaa. Tarvittavan energian avoimen kompleksin muodostukseen tarjoavat promoottorialueen lähelle sitoutuvat aktivaattoriproteiinit (Morett, Segovia 1993). Tätä

aktivaattoriproteiinien joukkoa kutsutaan nimellä bEBP (Bacterial Enhancer Binding Proteins). bEBP:t kuuluvat AAA+-proteiinien (ATPases associated with various cellular activities) superperheeseen (Neuwald et al. 1999). AAA+-proteinit ovat ATP:tä hydrolysoivia proteiineja, joita tavataan kaikissa organismeissa. AAA+-superperheen proteiineja karakterisoivat kyky järjestäytyä oligomeerisiksi rakenteiksi ja kyky muuttaa ATP-hydrolyysistä vapautuva energia mekaaniseksi voimaksi, jolla ne muokkaavat substraattejaan. AAA+-proteiinien substraatteihin kuuluu proteiinikomplekseja, nukleiinihappoja sekä nukleoproteiinikomplekseja (Neuwald et al. 1999, Bordes et al. 2003).

Aktivaattoriproteiineilla on kolme tehtävää transkription initiaatiossa (Bordes et al. 2003). Niiden täytyy stimuloida DNA:n sulamista yksijuosteiseksi, muokata σ^{54} :n RI:tä jotta sen aiheuttama fyysinen este DNA:n siirtymiselle RNAP:n aktiiviseen kohtaan poistuisi, sekä katalysoida σ^{54} :n DNA:ta sitovien osien uudelleenjärjestymistä pidentymisvaihetta varten. Hyvin tunnettuja ja tutkittuja bEBP:tä ovat *Azotobacter vinelandii*n NtrC (Nitrogen regulatory protein C), *Sinorhizobium meliloti*n DctD (C4-dicarboxylic transport protein D), *Salmonella enterican* NifA (Nitrogen fixation regulatory protein A) ja *E. coli*n PspF (Phage shock protein F) (Bush, Dixon 2012).

bEBP:t koostuvat pääosin kolmesta domeenista (Bush, Dixon 2012). N-terminaalinen säätelydomeeni (R) osallistuu signaalointiin ja proteiinin aktiivisuuden säätelyyn. Keskimäinen AAA+-domeeni (C) on proteiinin ATP:tä hydrolysoiva osa. C-terminaalinen (D) osa puolestaan sitoutuu DNA:han. Kaikki bEBP:t eivät sisällä kolmea domeenia; vain AAA+-domeeni on konservoitunut, ja bEBP:sta saattaa puuttua joko R- tai D-domeeni. bEBP:t jaetaan viiteen ryhmään proteiinien sisältämien domeenien perusteella (taulukko 1). Ryhmät I-III sisältävät erilaisia R-domeeneja omaavia proteiineja, ryhmän IV proteiineilta puuttuu R-domeeni ja ryhmän V proteiineilta D-domeeni.

Taulukko 1. *bEBP:t jaoteltuna viiteen ryhmään alayksiköiden perusteella. C-domeeni on läsnä kaikissa proteiineissa. Ryhmien I-IV bEBP:t sisältävät DNA:ta sitovan D-domeenin. Ryhmien I-III bEBP:t sisältävät kolme domeenia; ne on jaoteltu eri ryhmiin regulatorisen R-domeenin perusteella. Ryhmän I aktiivisuutta säätee RR-domeeni (Response regulator domain). Ryhmän II proteiinien säätelydomeeninä toimii joko PAS (Per, ARNT, Sim)-, XylR-N- tai V4R (vinyyli-4-reduktaasi). Ryhmän III proteiinit sisältävät GAF-domeenin (cGMP-specific and stimulated phosphodiesterase, Anabaena adenylate cyclase, and E. coli FhlA (GAF) domain). Ryhmän IV bEBP:t koostuvat vain katalyyttisesti aktiivisesta C-domeenista ja DNA:ta sitovasta D-domeenista. Ryhmän V proteiineilla ei ole D-domeenia. (Bush, Dixon 2012)*

Ryhmä	R-domeeni	D-domeeni
I	RR	kyllä
II	PAS, XylR-N, V4R	kyllä
III	GAF	kyllä
IV	Ei R-domeenia	kyllä
V	RR	ei

R-domeeni reagoi ympäristön aiheuttamiin ärsykkeisiin ja säätelee AAA+ -domeenin aktiivisuutta (Bush, Dixon 2012). Säätelymekanismi vaihtelee eri ryhmien aktivaattoriproteiineissa. Joissakin tapauksissa R-domeeni toimii intramolekulaarisena repressorina estäen proteiinin vuorovaikutuksen RNAP- σ^{54} -holoentsyymin kanssa (Dworkin, Jovanovic & Model 1997). Joiltain bEBP:lta R-domeeni puuttuu ja säätely tapahtuu muiden proteiinien välityksellä (Elderkin et al. 2002).

C-domeeni on proteiinin katalyyttisestä aktiivisuudesta vastaava osa, joka on AAA+-proteiineille tyypillisesti laskostunut α/β -subdomeeniksi ja α -helikaaliseksi subdomeeniksi (Rappas, Bose & Zhang 2007, Schumacher et al. 2006). C-domeeni jaetaan seitsemään osaan C1:stä C7:ään. Se sisältää useita AAA+-proteiineille tyypillisiä rakenteita, jotka osallistuvat nukleotidien tunnistukseen, sitomiseen ja hydrolyysiin. AAA+-proteiineja karakterisoivien yhteisten piirteiden lisäksi bEBP:n C-domeeneilla on niille uniikkeja, äärimmäisen konservoituneita rakenteita,

joiden tehtävä on σ^{54} :ään sitoutuminen ja holoentsyymin muokkaus avoimen kompleksin muodostusta varten.

AAA+ proteiineille ominaisia, C-domeenista löytyviä rakenteita ovat Walker A- (GxxxxGK[T/S], x edustaa mitä tahansa aminohappoa) ja Walker B -(hhhhDE, h viittaa hydrofobisiin aminohappoihin) motiivit, jotka osallistuvat nukleotidien sitomiseen ja hydrolyysiin (Rappas et al. 2007) . Walker A sijaitsee C1-osassa, ja se on välttämätön proteiinin ja ATP:n sisältämien fosfaattien välisen vuorovaikutuksen kannalta. Walker B:tä taas tarvitaan nukleotidien hydrolyysiin, ja se sijaitsee C4-alueella. C-domeenista löytyvät myös useimpien AAA+-proteiinien sisältämät nukleotidien tilaa havaitsevat sensor I- ja II-motiivit, jotka sijaitsevat C6- ja C5-alueilla. Nukleotidit sitoutuvat subdomeenien väliseen vakoon. (Rappas et al. 2007)

AAA+-proteiinit sisältävät tyypillisesti yksi tai kaksi arginiinitähdettä, joita kutsutaan R-sormiksi, ja jotka osallistuvat nukleotidien tunnistukseen ja subdomeenien väliseen katalyysiin. bEBP:n C-domeeneista R-sormia löytyy, kaksi jotka Sensor II:n kanssa sijaitsevat protomeerien välisellä pinnalla.

Yksinomaan bEBP:n C-domeeneissa tavattava piirre on GAFTGA-motiivi, (G= glysiini, A= alaniini, F=fenyyialaniini, T= treoniini) joka sijaitsee α/β -subdomeenin pinnalla silmukassa L1. L1 sijaitsee C3-alueella. Niillä on myös toinen pinnalla C5- ja C6- alueiden välissä sijaitseva silmukka L2, joka löytyy myös joiltain AAA+-perheen DNA-helikaaseilta. Molemmat silmukat ovat tärkeitä bEBP:n ja sigma 54:n välisissä vuorovaikutuksissa. (Rappas et al. 2007) L1:n GAFTGA-motiivi on erittäin konservoitunut kaikissa bEBP:ssä ja sen aminohappotähteillä on rooli aktivaatiossa.

D-domeenin keskeisin rooli on DNA:han sitoutuminen. Konservoitunut elementti on HTH-motiivi, joka vastaa proteiinille spesifisen DNA-sekvenssin, UAS:N (Upstream Activator Sequence) tunnistuksesta ja siihen sitoutumisesta .

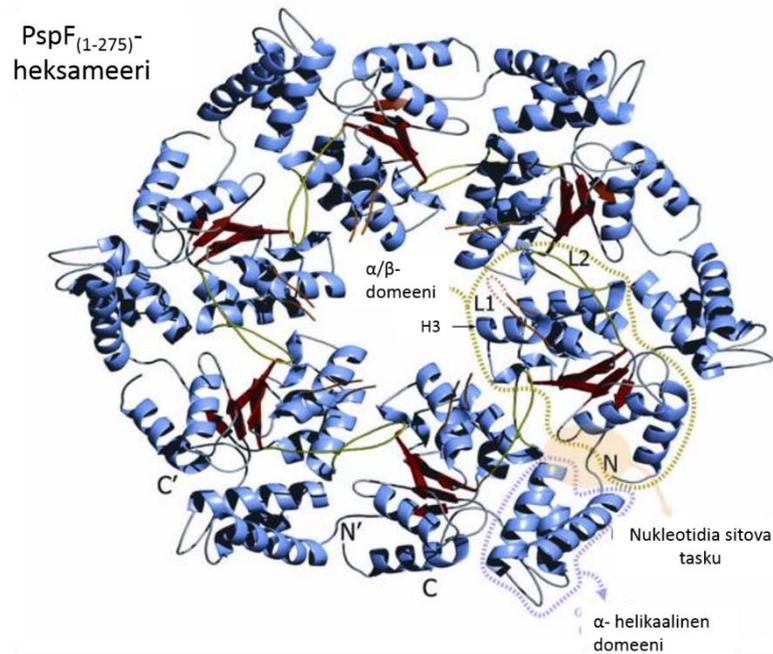
bEBP:t esiintyvät tyypillisesti dimeereinä inaktiivisessa muodossa. Dimeerisaatioon osallistuvat pääasiallisesti R- ja D-domeenin osat. Aktivoivat

signaalit saavat aikaan oligomeerien, useimmiten heksameerien tai heptameerien muodostumisen (Bush, Dixon 2012, Rappas et al. 2007). Oligomerisoituminen tapahtuu tällöin AAA+-domeenien välityksellä.

3.2.3 bEBP:n katalysoima hydrolyysi ja RNAP σ^{54} :n modifikaatio

bEBP:t tunnistavat niille spesifisiä sitoutumiskohtia, jotka sijaitsevat 80-150 emäsparia ylävirrassa transkription aloituskohdasta (Bush, Dixon 2012). bEBP:n tulee sitoutua vastakkaiselle puolelle DNA:ta RNAP σ^{54} -holoentsyymin kanssa. Kontakti bEBP:n ja RNAP- σ^{54} -holoentsyymin välillä edellyttää usein DNA:n taipumista, johon osallistuu muita avustavia tekijöitä (Dworkin et al. 1997).

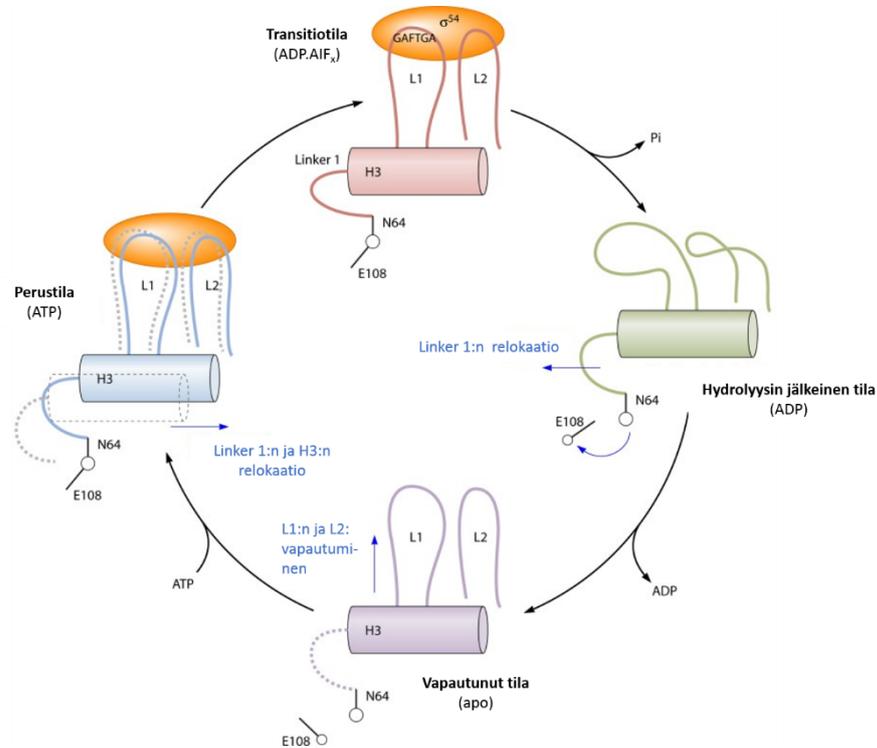
Inaktiivisena bEBP-dimeerit sitoutuvat UAS-alueille. Aktivoiva stimulaatio poistaa aktiivisuutta inhiboivat tekijät, kuten R-domeenin tai toisen aktiivisuutta säätelevän proteiinin aiheuttaman steerisen esteen, mikä johtaa ATP:ta sitovan ja hydrolysoivan oligomeerin muodostumiseen (Rappas et al. 2005). Oligomeeri on aluksi epästabili, mutta nukleotidin sitoutuminen stabilisoi sitä. Muodostunut oligomeeri on muodoltaan rengasmainen, ja GAFTGA-motiivin sisältävä L1 on renkaan sisäpinnalla (Rappas et al. 2006) (kuva 3). Kaikki oligomeerin proteiinit eivät ole kontaktissa σ^{54} :n kanssa, mikä viittaa siihen että rengas on epäsymmetrinen. Oligomerisaatio ja muut avustavat tekijät mahdollistavat DNA taipumisen ja sen seurauksena kontaktin bEBP-oligomeerin ja RNAP- σ^{54} -holoentsyymin välillä.



Kuva 3. *bEBP PspF:n AAA+-domeenien (aminohapot 1-275) muodostama heksameeri. Kuvaan on ympyröity vaaleankeltaisella α/β -domeeni, jossa sijaitsee entsyymin katalyyttisen aktiivisuuden kannalta välttämättömät Loop 1 ja Loop 2 (L1 ja L2). α -helikaalinen domeeni on ympyröity vaaleansinisellä. Nukleotidit sitoutuvat kahden eri PspF-molekyylin α/β -domeenin ja α -helikaalisen domeenin muodostamaan taskuun. (Muokattu kuvasta Rappas et al. 2005)*

bEBP:n muokkauksen kohde on σ^{54} :n RI ja RIII. Kontakti holoentsyymin kanssa tapahtuu pääasiassa AAA+ domeenin GAFTGA-motiivin välityksellä (Rappas et al. 2006). Avoimen kompleksin muodostuminen tapahtuu ATP-hydrolyysiä seuraavan L1:n ja L2:n relokalisoinnin avulla. Ennen ATP-hydrolyysiä GAFTGA-motiivin fenyyialaniinin, L2:ssa sijaitsevan valiinin ja heliksi 3:n aminohapotähteiden väliset vuorovaikutukset lukitsevat GAFGTA-motiivin konformaatioon, jossa se osoittaa kohti rengasmaisen oligomeerin keskustaa. Konformaatio ei suosi stabiilia vuorovaikutusta σ^{54} :n kanssa, ja sitoutumiskohta onkin todennäköisesti peitossa ennen hydrolyysiä. L1:n täytyy siirtyä ylöspäin heksameerirenkaasta kontaktia varten. ATP-hydrolyysi saa aikaan muutoksia konformaatioon, jonka seurauksena L1 ja L2 nousevat ylöspäin ja muokkaavat σ^{54} :ta. Hydrolyysin jälkeen ADP vapautuu, ja L1 sekä L2 palaavat alkuperäiseen

asentoonsa (Kuva 5). (Rappas et al. 2005, Schumacher et al. 2006, Rappas et al. 2006)



Kuva 4. Nukleotidin sitoutumisen ja hydrolyysin katalysoima L1:n ja L2:n relokaatio bEBP:ssä. Kuvassa on esitetty nukleotidin hydrolyysiin osallistuvat osat linkkeri 1, heeliksi 3 (H3), L1 ja L2 yhdessä bEBP:ssä. Vapautunut tila on esitetty alimmassa kuvassa. ATP:n sitoutuessa E18:n ja N64:n vuorovaikutus ohjaavat L1:n relokaatiota niin, että GAFTGA-motiivi kykenee kontaktiin σ^{54} :n kanssa (vasemmanpuoleinen kuva). ATP-hydrolyysin aikana L1 ja L2 ovat stabiloituneet, ja GAFTGA vuorovaikuttaa σ^{54} :n kanssa (ylimmäinen kuva) ATP-hydrolyysin jälkeisessä tilassa E18:n ja N64:n vuorovaikutus katkeaa, ja GFTGA-motiivi siirtyy σ^{54} -vuorovaikutuksen kannalta epäsuotuisaan tilaan (oikeanpuoleinen kuva) ADP:n dissosioituessa bEBP palaa vapautuneeseen tilaan. (Muokattu kuvasta Bush, Dixon 2012, Rappas et al. 2006)

Koska bEBP:n sitoutumiskohtat sijaitsevat jopa 150 emäsparin päässä transkription aloituskohdasta, on sitoutumiskohtien ja TSS:n väliin jäävän DNA:n taipuminen välttämätöntä bEBP:n ja σ^{54} :n välisen kontaktin kannalta. Taipumista avustavat usein pienet, heterodimeeriset DNA:n topologiaa muokkaavat proteiinit, jotka taivuttavat DNA:ta jopa 180 astetta. Taipumisessa avustavat

tyypillisesti IHF (Intergration Host Factor) tai HU. (Bush, Dixon 2012, Jovanovic, Model 1997)

Holoentsyymin ja bEBP:n oikea välimatka on tärkeä aktivaation kannalta, joten myös avustavan proteiinin sitoutumiskohta on spesifinen, ja sitoutumiselle löytyy spesifinen sekvenssi UAS:n ja holoentsyymin sitoutumiskohdan välillä. Aktivaattorin ja holoentsyymin välisen kontaktin mahdollistamisen lisäksi avustavat proteiinit indusoivat muutoksia DNA:n topologiassa, jotka tehostavat aktivaatioita ja lisäävät sen spesifisyyttä. (Bush&Dixon, Jovanovic et al.)

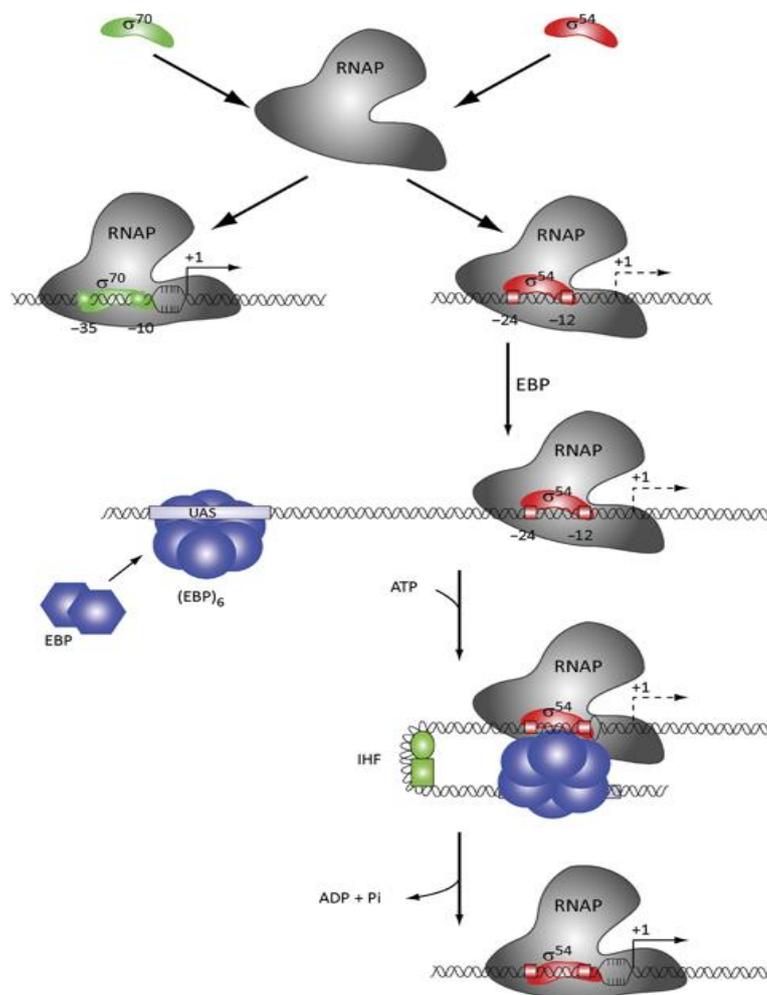
3.2.4 σ^{54} -välitteinen transkription initiaatio

σ^{70} -perheestä poiketen σ^{54} kykenee promoottorin tunnistukseen ja sitoutumiseen ilman RNAP:ta. Se sitoutuu promoottoriin suoraan eikä DNA:ta pitkin liukumalla. RNAP voi siis sitoutua valmiiksi promoottoriin sitoutuneeseen σ^{54} :ään (Zhang, Buck 2015). Sitoutuminen on kuitenkin tiukempaa RNAP σ^{54} -holoentsyyminä kuin pelkän σ^{54} :n. Vuorovaikutus RpoN-laatikon ja -24 promoottorisekvenssin välillä on RNAP:n sitoutumisesta riippumatonta (Burrows et al. 2003).

Suljetun kompleksin stabiilius johtuu σ^{54} :n alue I:n aiheuttamasta kineettisestä esteestä, joka estää templaatin vastinjuosteen siirtymisen sen sitoutumispaikkaa RNAP:ssa, kuten σ^{70} initioimassa transkriptiossa (Guo et al. 2000). Sitoutuessaan promoottoriin σ^{54} avaa A:T-emäspärin 3' puolelta -12 konsensussekvenssiä GC, jolloin repressiivinen transkriptiohaarukka, jonka kanssa σ^{54} :n alue I vuorovaikuttaa, syntyy. Tämän rakenteen purkamiseen ja avoimen kompleksin muodostamiseen tarvitaan bEBP:n ATP-hydrolyysin katalysoimaa rakenteen muutosta. ATP-hydrolyysiä seuraava bEBP:n ja RNAP σ^{54} :n muuttaa ensisijaisesti

σ^{54} :n RI:n konformaatiota, ja syntyy transkriptioon kykenevä avoin kompleksi RP_o (kuva 6).

RNAP:n siirtyessä pidentymisvaiheeseen myös σ^{54} dissosioituu promoottori-DNA:sta (Burrows et al. 2003). Pidentymisvaiheen alussa σ^{54} dissosioituu RNAP:sta. RNAP:n kanssa kontaktissa olevien domeenien suhteellinen sijainti eroaa σ^{54} :n ja σ^{70} :n välillä; σ^{54} :n CBD tukkii RNA:n ulospääsykanavan, kun taas σ^{70} :n ydinentsyymiin sitoutuva σ_2 on kontaktissa RNAP:n β' -domeenin kanssa alavirrassa (Yang et al. 2015). RNA:n ulospääsyn estymisen vuoksi oletetaan, että σ^{54} :n on dissosioitettava transkription edetessä ehdottomammin σ^{70} :n.



Kuva 5. σ^{70} - ja σ^{54} -välitteinen transkription initiaatio. Molemmat sigmafaktorit sitoutuvat samaan RNAP:iin. σ^{70} -RNAP-holoentsyymi isomerisoituu spontaanisti avoimeksi kompleksiksi, joka kykenee aloittamaan transkription. σ^{54} -RNAP-holoentsyymi muodostaa stabiilin suljetun kompleksin, jossa transkription aloitus

on estynyt. *bEBP*-oligomeeri sitoutuu *UAS*-alueelle ylävirtaan transkription aloituskohdasta. *IHF* taivuttaa *DNA*:ta siten, että *bEBP*-heksameeri kykenee muokkaamaan suljetun kompleksin avoimeksi kompleksiksi *ATP*-hydrolyysin avulla. (Joly et al. 2010)

4 Syanobakteerit

Syanobakteerit ovat laajakirjoinen fotosynteesiin erikoistunut joukko gram-negatiivisia prokaryootteja, joita löydetään kaikista vettä sisältävistä elinympäristöistä maan päällä. Niiden fotosynteesikoneisto muistuttaa huomattavasti eukaryoottien fotosynteesiä, ja kloroplastien arvellaan kehittyneen endosymbioottisista syanobakteereista (Rodriguez-Ezpeleta et al. 2005).

Syanobakteerit ovat kooltaan ja muodoltaan hyvin heterogeeninen mikrobien ryhmä. Koko vaihtelee 1 μ m:n ja 10 μ m:n välillä, ja ne saattavat esiintyä yksisoluisena, kolonniaina tai muodostaa filamentteja, joita kutsutaan trikomeiksi. Syanobakteereista tutkituin on *Synechocystis* sp PCC6803 (tästedes *Synechocystis*). *Synechocystis* on yksisolainen, makeassa vedessä elävä syanobakteeri, joka kykenee sekä autotrofiseen kasvuun fotosynteesillä valossa että heterotrofiseen kasvuun pimeässä glykolyysin ja oksidatiivisen fosforylaation avulla. *Synechocystis*in genomi koostuu 3.6 Mb:n kromosomista, ja sillä on seitsemän plasmidia.

4.1 Syanobakteriaalinen RNAP

Syanobakteerien RNA-polymeraasi eroaa rakenteeltaan muiden bakteerien RNAP:sta. β' -alayksikkö on jakaantunut kahteen alayksikköön: C-terminaaliseen

β' -alaysikköön ja N-terminaaliseen 66kDa alaysikköön γ (Schneider, Hasekorn 1988). Syanobakteerien RNAP:n ydin muodostuu siis alaysiköistä $\alpha_2\beta\beta'\gamma\omega$, joka muistuttaa kloroplastien RNAP:ia, joka koostuu alaysiköistä $\alpha_2\beta\beta'\beta''$. Siinä missä eubakteerien RNAP:n β' sisältää kahdeksan konservoitunutta domeenia A-H, muodostuvat syanobakteerien RNAP:n β - ja β' -alaysiköt kukin neljästä domeeneista A-D ja E-H (Schneider, Hasekorn 1988). Alaysikön jakaantumisen vaikutuksia ei tarkkaan tiedetä. Kenties merkittävin ero syanobakteerien ja tyypillisen bakteriaalisen RNAP:n välillä on iso insertio syanobakteerien RNAP:n γ -alaysikön G- ja H-domeenin välissä. *E. coli*n ja syanobakteerien RNAP:t ovat periaatteessa rakenteellisesti ja funktionaalisesti samankaltaisia, mutta eroja on havaittu promoottorin tunnistuksessa jopa samoilla promoottoreilla (Imamura, Asayama 2009).

Kuten useimpien bakteereilla, ω -alaysikkö ei ole syanobakteereille välttämätön. Sen poissaolo kuitenkin vaikuttaa negatiivisesti RNAP:n sitoutumiseen primääriseen sigmafaktoriin, mikä puolestaan johtaa runsaasti ekspressoituvien geenien vähäisempään ekspressioon (Gunnelius et al. 2014).

4.1.1 Syanobakteerien sigmafaktorit

Syanobakteereilla tavataan vain σ^{70} -perheen faktoreita, jotka jaetaan kolmeen eri ryhmään (Imamura, Asayama 2009). Kaikki ryhmät sisältävät konservoituneet alueet promoottorin tunnistusta ja pre-initiaatiokompleksin muodostusta varten, mutta eroavat hieman rakenteellisesti toisistaan.

Molekyyllipainoltaan 67 kDa:n painoinen primäärinen σ -faktori SigA muodostuu alueista 1(1.1. ja 1.2), 2, 3 ja 4 (Imamura, Asayama 2009). Se vastaa niin kutsuttujen housekeeping-geenien transkriptiosta. Normaaleissa kasvuolosuhteissa SigA:n määrä pysyy vakiona kasvuvaiheesta ja vuorokaudenajasta riippumatta (Imamura et al. 2003). Eräät stressiolosuhteet,

kuten kuumuus, pimeys ja korkea suolapitoisuus johtavat vähäisempään *sigA* ekspressioon (Tuominen et al. 2003), .

Ryhmän 2 sigmafaktorit säätelevät erilaisten kasvuolosuhteiden muutoksissa tarvittavien geenien transkriptiota, ja niitä koodaavat geenit *sigB*, *sigC*, *sigD* ja *sigE* (Imamura et al. 2003). Esimerkiksi *sigB* indusoituu kuumassa (Tuominen et al. 2003), ja *sigD* kirkaassa valossa (Imamura et al. 2003). Rakenteeltaan ryhmän 2 σ -faktorit ovat SigA:n kaltaisia, mutta niistä puuttuu alue 1.1. Kooltaan ryhmän 2 σ -faktorit vaihtelevat 40-47 kDa:n välillä.

Ryhmään 3 kuuluvat SigF, SigG, SigH ja SigI, joita koodaavat *sigF*, *sigG*, *sigH* ja *sigI* (Imamura et al. 2003). SigF luokitellaan joissain tapauksissa omaan ryhmäänsä. Ryhmän 2 tavoin se muodostuu alueista 2-4 mutta muistuttaa muuten ryhmän 2 sigmafaktoreita vähän. SigG, SigH ja SigI koostuvat alueista 2 ja 4. Ryhmän 3 σ -faktorit ovat kooltaan 23-30 kDa.

5 Syanobakteerien käyttö tutkimuksessa ja bioteknologisissa sovelluksissa

Viime vuosikymmenenä syanobakteerit ovat herättäneet kiinnostusta bioteknologian teollisuuden parissa potentiaalisina tuottoalustoina esimerkiksi biopolttoaineiden, kemikaalien ja elintarvikkeiden tuotannossa (Quintana et al. 2011). Niiden kasvatuskustannukset ovat alhaiset verrattuna heterotrofisiin organismeihin, sillä ne tarvitsevat vain vettä, hiilidioksidia ja auringonvaloa energianlähteenä, jotkut lajit kykenevät myös sitomaan ilmakehän typpeä (Al-Haj et al. 2016, Pinto et al. 2015). Verrattuna fotosynteesisiin eukaryoteihin, kuten leviin, niiden fotosynteesi- ja kasvunopeus on huomattavasti suurempi. Lisäksi syanobakteerisolut kykenevät varastoimaan merkittäviä määriä lipidejä.

Synteettinen biologia tarjoaa työkaluja ja metodeja syanobakteerien muokkaamiseen (Al-Haj et al. 2016). Syanobakteereihin sovellettavissa olevien työkalujen määrä on kuitenkin vähäinen verrattuna *E. coli*n kaltaisiin bioteknologiassa runsaasti käytettyihin organismeihin (Berla et al. 2013). Menetelmien tehokas hyödyntäminen vaatii kuitenkin sellaisten biologisten elementtien, kuten promoottorien, terminaatiosekvenssien, translationaalisten elementtien sekä optimaalisten kodonisekvenssien, tutkimista ja kehittämistä (Camsund, Lindblad 2014). Transkriptiossa vaadittavat komponentit, kuten promoottorit ja RNAP:n osat, ovat erittäin tärkeitä kehityskohteita, sillä ne kontrolloivat geeniekspression ensimmäistä vaihetta (Camsund, Lindblad 2014).

Vierasta DNA:ta voidaan siirtää syanobakteereihin useilla metodeilla: transformoimalla, konjugaatiolla tai elektroporaatiolla (Quintana et al. 2011). Vieras DNA voi monistua syanobakteerissa joko replikoituvassa plasmidissa tai integroitumalla kromosomiin. Verrattuna hyvin tutkittuihin ja paljon käytettyihin tuotto-organismeihin *E. coli*in ja *B. Subtilikseen* syanobakteerien muokkaaminen vaatii lukuisten seikkojen huomioon ottamista johtuen niiden oligoploidista tai polyploidista, restriktio- ja modifikaatiosysteemien läsnäolosta sekä vuorokausirytmien vaikutuksesta (Camsund, Lindblad 2014). Verrattuna *E. coli*in itsestään replikoituvien plasmidien käyttö on rajoitetumpaa, joten genomiin homologisella rekombinaatiolla integroituvat vektorit ovat tavallisempia (Pinto et al. 2015). *Synechocystis* kykenee luonnostaan integroimaan vierasta DNA:ta genomiinsa, ja optimaaliset olosuhteet DNA:n integroitumiseen tunnetaan hyvin (Al-Haj et al. 2016).

Siirrettäessä vierasta DNA:ta homologisen rekombinaation avulla on rekombinaatioalueella merkitystä: insertoitava DNA voi integroitua keskelle geeniä tai geenin toiminnalle tärkeitä säätelyalueita (Pinto et al. 2015). *Synechocystiksellä* on käytetty useita integraatiokohtia, joita kutsutaan neutraaleiksi kohdiksi. Neutraaleiksi kohdiksi luokitellaan genomien lokukset, joiden keskeyttäminen ei aiheuta muutoksia solun elinkyvyssä tai fenotyyppissä (Pinto et al. 2015).

5.1 Syanobakteriaaliset promoottorit heterologisten geenien ekspressiossa

Olellainen komponentti vieraiden geenien ekspressiossa missä tahansa organismissa on promoottori, johon RNAP kiinnittyy RNA:n transkriptiota varten (Berla et al. 2013). Promoottorit määräävät geenin ekspressiotehokkuuden ja induktio-olosuhteet. Eri organismeissa toimivat eri promoottorit, joten yhdelle organismille suunnitellut systeemit eivät välttämättä ole siirrettävissä toiseen organismiin.

Ihanteelliselta promoottorilta vaaditaan useita ominaisuuksia. Promoottorin tulisi olla inaktiivinen indusoivan ärsyksen puuttuessa, ja indusoinnin aiheuttaman vasteen tulisi olla ennustettava. Lisäksi indusoivan ärsyksen tulisi olla edullinen, vakaa ja tuotto-organismille vaaraton (Berla et al. 2013). Promoottoria seuraavalla vierasperäisellä geenillä ei tulisi olla vaikutusta promoottorin toimintaan tai tehokkuuteen. Promoottorit eivät kuitenkaan ole aina todellisuudessa modulaarisia tai selkeästi määriteltävissä (Camsund, Lindblad 2014). Usein ne sisältävät useita transkription aloituskohtia, jolloin se tuottaa pituudeltaan vaihtelevia mRNA-molekyylejä, tai promoottorisekvenssi jatkuu alavirtaan transkription aloituskohdasta. (Camsund, Lindblad 2014)

Bioteknologiassa yleisesti käytetyt, useimmiten *E. coli*ssa toimivat promoottorit eivät ole välttämättä toimivia syanobakteereissa, johtuen eroista RNAP:ssa ja transkriptiota säätelevissä tekijöissä (Berla et al. 2013). Lisäksi perinteiset promoottorit ovat tyypillisesti indusoitavissa spesifisillä kemikaaleilla, kuten IPTG:llä tai metalli-ioneilla, jotka eivät välttämättä ole käytännöllisiä isomman skaalan syanobakteeriviljelmissä (Abe et al. 2014, Berla et al. 2013). Vaihtoehtoisia kasvatusolosuhteilla indusoitavia promoottoreita on kehitetty syanobakteereihin, esimerkiksi vihreällä valolla induoituva promoottori P_{cpcG2} (Abe et al. 2014).

Syanobakteerien promoottorit voidaan jakaa kolmeen ryhmään (Camsund, Lindblad 2014). Tyyppi I promoottorit ovat tyypillisiä σ^{70} -promoottoreita, joissa

on TSS kohdassa +1, -10 konsensussekvenssi 5'-TATAAT-3' sekä -35 konsensussekvenssi 5'-TTGACA-3. Normaaleissa kasvuolosuhteissa tyyppin I promoottoreita tunnistaa SigA, joskin ryhmän 2 sigmafaktorit voivat myös tunnistaa niitä. Tyyppin II promoottorit liittyvät usein stressiolosuhteisiin ja niihin sitoutuvat usein ryhmän 2 sigmafaktorit. Tyyppin II promoottoreissa on -10 konsensussekvenssi, mutta -35 konsensussekvenssi puuttuu (Imamura, Asayama 2009). Näiden promoottorin toiminta perustuu ylävirtaan sitoutuvien transkription aktivaattorien sitoutumiseen -35 konsensussekvenssin sijaan. Esimerkiksi *Synechocystis* sp. PCC6803:lla tyyppin II promoottorissa *glnB* P2 on sitoutumiskohta NtcA:lle ja sen sitoutumista seuraava ekspresion voimistuminen typen puutteessa. Tyyppin III promoottoreilla ei ole -10 ja -35 konsensussekvenssejä, mutta niitä tunnistavat promoottorista riippuen kaikki sigmafaktorit (Imamura, Asayama 2009). Syanobakteereissa toimivia ekspresiosysteemejä suunniteltaessa on syytä valita promoottorityyppi toivottujen ekspresio-olosuhteiden mukaan (Camsund, Lindblad 2014).

6 σ^{54} -välitteinen transkriptiosysteemi syanobakteereihin

Syanobakteereilla tavataan vain σ^{70} -perheen sigmafaktoreita, eikä ole tietoa kykeneekö σ^{54} sitoutumaan syanobakteerin RNA polymeeraasiin ja muodostamaan transkription aloitukseen kykenevän kompleksin. Olennaisimmat erot syanobakteerien ja muiden bakteerien RNA polymeeraasien välillä on β' -alaysikön jakaantuminen kahteen alaysikköön ja insertio γ -alaysikössä. Ei tiedetä, vaikuttavatko nämä erot sigmafaktorien sitoutumiseen ja avoimen kompleksin muodostukseen. Sigmafaktorit vuorovaikuttavat ensisijaisesti β' -

alaysikön kanssa (Kuznedelov et al. 2002), ja on mahdollista, että jakaantuminen vaikuttaa myös siihen.

Syanobakteereista puuttuvat myös muut σ^{54} -välitteiseen transkriptioon vaadittavat elementit: promoottorisekvenssit, bEBP:t sekä bEBP:n sitoutumiskohdat geenin promoottorialueella. σ^{54} -välitteisen transkription aloitukseen vaadittavat arkkitehtuurilliset proteiinit sitoutuvat niille spesifisiin sekvensseihin, eikä syanobakteereilta välttämättä näitä spesifisiä sekvenssejä tunnistavia proteiineja ole.

σ^{54} -välitteinen transkription aloitus on tarkkaan säädeltyä, ja muistuttaa eukaryoottisia transkriptionsäätelymekanismeja; paitsi σ^{54} :lle spesifisen promoottorin lisäksi se vaatii myös kullekin geenille spesifisen aktivaattoriproteiinin sekä sille spesifiset sitoutumiskohdat.

Koska syanobakteereilla ei tavata σ^{54} :ää, voisi σ^{54} ja sen avustava tekijät toimia syanobakteeriin siirrettynä hyvin spesifisenä ekspressiosysteeminä. Syanobakteereille kehitetyllä ekspressiosysteemillä olisi käyttöä bioteknologiassa. σ^{54} :n ja syanobakteerien RNAP:n vuorovaikutuksesta ja yhteistoiminnasta ei kuitenkaan ole tutkimustietoa. Syanobakteerien poikkeavan RNAP:n rakenteen vaikutuksia sigmafaktorin sitoutumiseen ei tiedetä.

bEBP:t ovat itsessään säädeltyjä. N-terminaalinen R-domeeni vastaa useimmiten aktiivisuudesta, ja R-domeeni taas reagoi hyvinkin monimutkaisiin signaaleihin, joihin vaikuttavat muutokset ympäristössä. Mikäli σ^{54} -välitteiseen vaadittava koneisto haluttaisiin siirtää syanobakteeriin, tarvitaan aktivaatiosysteemi, joka ei itsessään vaadi muita tekijöitä toimiakseen. Olisi siis syytä valita ryhmä III bEBP, jonka aktiivisuutta ei säätele R-domeeni ja joka on säätelevän tekijän puuttuessa aktiivinen.

6.1 *Psp*-operoni

Escherichia coli *psp*-operoni on yksi tutkituimmista σ^{54} -välitteisesti transkriptoiduista operoneista. *Psp*-operoni indusoituu vasteena lukuisiin solukalvon eheyttä uhkaaviin stressiolosuhteisiin, kuten kuumaan, osmoottiseen shokkiin ja filamenttisten bakteriofaagien infektiioon (Brissette et al. 1991). *Psp*-proteiineja ja niiden homologeja löytyy sekä gram-positiivista että gram-negatiivisista bakteereista, arkeista ja kasveista (Joly et al. 2010). Operoniin kuuluu ainakin neljä geeniä: *pspA*, *pspB*, *pspC* ja *PspE*. Operonin koodaamat proteiinit Phage Shock Protein A-E (*PspA-E*) ovat osa Phage shock response-mekanismia, johon kuuluvat myös proteiinit *PspF* ja *PspG* (Darwin 2005). Operonin transkriptioon initiaatioon osallistuvat RNAP- σ^{54} , bEBP *PspF* sekä IHF (Jovanovic, Model 1997).

Psp-proteiinien tehtävä on ylläpitää elektrokemiallista potentiaalia sisäistä solukalvoa vahingoittavissa solunulkoisissa stressiolosuhteissa (Jovanovic et al. 2010) Normaaleissa kasvuolosuhteissa *PspF*:n aktiivisuus on inhiboitunut. Solukalvoon kohdistuvan stressin seurauksena negatiivinen säätely poistuu, ja *PspF* aktivoi *psp*-operonin transkription (Elderkin et al. 2002).

Psp-reguloni reagoi erityisesti sekretiinien mislokalisatioon, ja *psp*-operoni havaittiin ensimmäiseksi vasteena yksijuosteisen DNA-faagi fl:n infektiioon ja sen geenin IV proteiiniin (*pIV*) (Brissette et al. 1990). Sekretiinit lokalisoituvat normaalisti ulommalle solukalvolle kaitsijaproteiinin kaltaisen pilottiproteiinin avustuksella (Darwin 2005). Pilottiproteiinin puuttuminen johtaa mislokalisatioon, kuten esimerkiksi *pIV*:n tapauksessa, sillä faagin genomi ei koodaa pilottiproteiineja. Sekretiinien mislokalisatioon lisäksi *psp*-operoni indusoituu myös muissa stressiolosuhteissa, mutta niihin liittyy usein myös muiden proteiinien aktivaatioita.

Induktion voimakkuus on suoraan verrannollinen indusoivan stressin voimakkuuteen, ja ekspressio on voimakkainta kasvua rajoittavissa ja tappavissa olosuhteissa (Weiner, Brissette & Model 1991). *Psp*-operonin ekspressio on

vaimennettua normaaleissa kasvuolosuhteissa ja kuumuus ja osmoottinen shokki indusoivat ekspresion vain lyhytaikaisesti. Faagi-infektiossa ekspresio jatkuu niin kauan kun faagiperäisiä proteiineja on solussa.

Psp operonin säätely tapahtuu PspF:n aktiivisuutta säätelemällä, mihin osallistuvat PspA, PspB ja PspC (Weiner et al. 1991). Operonia ekspresoidaan normaaleissa kasvuolosuhteissa pieniä määriä, ja PspA estää silloin PspF:n aktivoiman transkription. PspB ja PspC ovat integraalisia kalvoproteiineja, jotka reagoivat *psp*-vasteen indusoivaan signaaliin. PspB ja PspC vuorovaikuttavat PspA:n kanssa, jolloin PspF vapautuu PspA:n aiheuttamasta inhibitiosta. PspB ja PspC aktivoivat ekspresiota ko-operatiivisesti f1-infektiossa, etanolikäsittelyssä ja osmoottisessa shokissa, mutta kuumassa induktio on PspB:stä ja PspC:stä riippumaton (Weiner et al. 1991). *Psp* operonin ekspresio on voimakkaammin riippuvainen PspC:stä; PspB voimistaa operonin ekspresiota, mutta ei ole välttämätön.

PspA on *psp*-operonin negatiivinen säätelijä; se todennäköisesti sitoutuu PspF:n kanssa ja vähentää sen ATPaasiaktiivisuutta (Elderkin et al. 2002). Indusoivan stimulaation puuttuessa pieni määrä PspA:ta transkriptoidaan. PspA sitoutuu PspF:n AAA+-domeeniin estäen ATP:n hydrolyysiä. PspA sitoutuu spesifisesti PspF:iin, eikä ole globaali AAA+-domeenin inhibiittori. PspA:n inaktivaatio johtaa PspB:stä ja PspC:stä riippumattomaan konstitutiiviseen *psp* operonin ekspresioon (Weiner et al. 1991).

6.1.1 *Psp*-operonin aktivaattori PspF

PspF on σ^{54} :n bEBP, joka säätelee *psp*-operonin ekspresiota (Jovanovic, Weiner & Model 1996). Se on 325 aminohappoa pitkä sytoplasminen proteiini, joka sisältää bEBP:lle ominaiset ATP-hydrolyysistä ja σ^{54} :n modifikaatiosta vastaavan AAA+-domeenin sekä DNA:ta sitovan D-domeenin. PspF:ää tuottava geeni on

lähellä *psp*-operonia, ja sitä transkriptoidaan yhdestä pääasiallisesta (p1) ja kahdesta vaihtoehtoisesta (p2 ja p3) σ^{70} -riippuvaisesta promoottorista, jotka ovat päällekkäin *psp*-promoottorin kanssa (Jovanovic, Dworkin & Model 1997). PspF:n ekspressiota säädelään autogeenisesti, ja transkriptotaso ei muutu *psp*-operonia indusoivissa olosuhteissa (Jovanovic et al. 1997).

AAA+ domeeni (1-275) koostuu bEBP:llä konservoituneista alueista C1-C7, ja se sisältää tyypilliset AAA+-proteiineissa konservoituneet motiivit: Walker A ja -B-motiivit, jotka muodostuvat aminohapoista 37-45 ja 103-108, SRH-alueen (aminohapot 142-169), GAFTGA- motiivin sisältävän silmukka 1:n (L1, aminohapot 79-94) ja silmukka 2:n (L2) (Darwin 2005).

DNA:ta sitova D-domeeni sisältää HTH-domeenin, joka tunnistaa UAS-alueet. . HTH-motiivin ensimmäinen kierre on homologinen muiden σ^{54} -aktivaattorien kanssa, kun taas toinen kierre on PspF:lle uniikki. (Jovanovic et al. 1996) HTH on välttämätön PspF:n UAS:n tunnistamisen kannalta, ja sen deleetio heikentää *psp*-operonin ekspressiota huomattavasti (Dworkin et al. 1997).

PspF:stä puuttuu bEBP-perheen jäsenillä usein tavattava N-terminaalinen säätelydomeeni (Jovanovic et al. 1996). R-domeenin sijaan sen aktiivisuutta säätelee PspA, jota puolestaan säätelevät PspB ja PspC (Elderkin et al. 2002). PspA säätelee PspF:n aktiivisuutta negatiivisesti ATPaasiaktiivisuutta inhiboimalla. PspA on solukalvon sisäpuolelle sitoutuva 222 aminohapon mittainen proteiini, joka muodostuu neljästä helikaalisesta domeenista HD1-HD4. Sillä on kaksi tehtävää: PspF:n aktiivisuuden negatiivinen säätely sekä solukalvon eheyden säilyttäminen (Darwin 2005).

Psp-vasteen indusoivissa olosuhteissa PspA muodostaa solukalvon sisäpinnalle sitoutuvia 36-meerejä, kun taas PspF:iin sitoutuessa se esiintyy huomattavasti pienempinä oligomeereinä (Joly et al. 2010). Inhibitorinen PspA-PspF-kompleksi muodostuu tyypillisesti noin kuudesta PspF-molekyylistä ja kuudesta PspA-molekyylistä. PspA dissosioituu PspF:stä stressiolosuhteissa, vapauttaen näin aktiivisen PspF:n.

ATPaasia katalysoivien aktiivisten keskusten muodostumiseen vaaditaan PspF:n oligomerisoitumista heksameereiksi (Bordes et al. 2003). Oligomerisoitumiseen osallistuvat AAA+ domeenin konservoituneet motiivit, ja ATP:n tai ADP:n sitoutuminen indusoi oligomerisoitumista, jonka mekanismia oligomerisoitumiselle ei tunneta. RNAP σ^{54} - holoentsyymin aktivaatio on kokonaisuudessaan avattu kappaleessa 3.2.3: *bEBP:n katalysoima ATP-hydrolyysi ja σ^{54} :n modifikaatio*.

6.1.2 IHF:n rooli *psp*-operonin transkriptiossa

IHF (Integration Host Factor) on sekvenssispesifinen DNA:ta sitova ja taivuttava proteiini, joka koostuu kahdesta ei-identtisestä alayksiköstä IHF α ja IHF β , joita koodaavat geenit *ihfA* (*himA*) ja *ihfB* (*himD*) (Jovanovic, Model 1997). IHF indusoi sitoutuessaan jyrkän, yli 160 asteen taitoksen DNA:ssa ja mahdollistaa siten vuorovaikutuksen proteiinien välillä jotka ovat sitoutuneet DNA:han suhteellisen kauas toisistaan.

IHF:ia tarvitaan PspF:n ja RNAP σ^{54} -holoentsyymin väliseen vuorovaikutukseen. Se ei itsessään osallistu transkription aloitukseen. PspF-heksameeri ja IHF sitoutuvat promoottoriin ko-operatiivisesti.

6.1.3 *Psp*-promoottori

Psp-operonin edessä sijaitsee promoottorialue, jota kutsutaan *psp*-promoottoriksi (P_{psp}). Se sisältää kaksi PspF:lle spesifistä sitoutumiskohtaa, UASI ja UASII, sijainneissa -80 ja -129 ylävirtaan transkription aloituskohdasta. IHF:lle

on kaksi sitoutumiskohtaa sijainneissa -60 ja -33 (Dworkin et al. 1997). -24 ja -12 kohdissa on σ^{54} :lle spesifiset sitoutumiskohdat. Sekä UASI, UASII että IHF:n sitoutumiskohdat sijaitsevat samalla puolella DNA:ta.

PspF:n sitoutuminen on transkription aloitukselle välttämätöntä; σ^{54} :n tai PspF puuttuessa operonia ei transkriptoida lainkaan (Dworkin et al. 1997). IHF:n sitoutuminen ei ole täysin välttämätöntä, mutta sitoutumiskohdan poistaminen laskee transkriptotehokkuutta huomattavasti. PspF:n ja ja IHF:n sitoutumiskohtien oikea sijainti toisiinsa nähden on erittäin tärkeässä roolissa kaikkien transkription aloittamiseen vaadittavien komponenttien keskinäisen vuorovaikutuksen kannalta; IHF säätelee operonin ekspressiota negatiivisesti silloin kun sitoutumiskohtien sijainti on väärä (Dworkin et al. 1997).

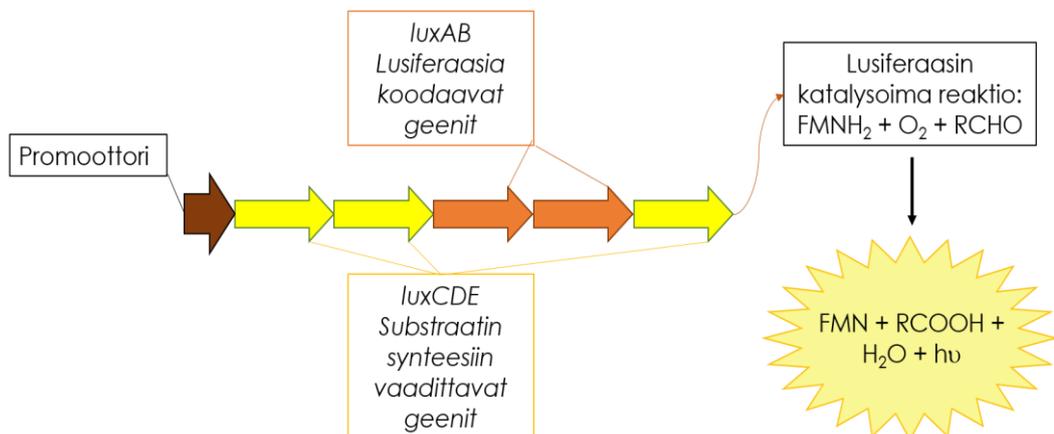
Psp-promoottori eroaa jossain määrin muista σ^{54} -promoottoreista (Joly et al. 2010). Promoottorin konsensussekvenssi -12 on tyypillisesti σ^{54} -promoottoreissa konservoituneen GC:n sijaan GT. Sama mutaatio on löydetty *pspG*:n, toisen σ^{54} -välitteisesti transkriptoidun ja PspF:n säätelemän geenin promoottorialueelta.

6.2 Bioluminesenssi ja lusiferaasientsyymit

Lusiferaasi on yleinen nimitys entsyymeille, jotka katalysoivat havaittavaa valoa tuottavia reaktioita (Baldwin et al. 1995). Lusiferaasientsyymejä on löydetty useilta eri organismeilta, kuten bakteereilta, sieniltä, kaloilta ja leviltä (Meighen 1993). Kaikki lusiferaasit katalysoivat oksidatiivisia prosesseja, joissa väli- tai lopputuote eksitoituu. Valoa emittoituu, kun eksitoitu molekyyli palaa perustilaan. Valoa tuottavien reaktioiden katalyyysin ohella eri lusiferaasientsyymit eivät juuri jaa samankaltaisuuksia (Baldwin et al. 1995, Meighen 1993).

Bioluminesenssia tuottavat bakteerien lusiferaasit ovat keskenään homologisia, ja ne katalysoivat alifaattisen aldehydin sekä pelkistetyn flaviinimononukleotidin oksidaatiota (Baldwin et al. 1995). Reaktio emittoi valoa, jonka emissiopiikki on 490 nm. Lusiferaasi koostuu kahdesta keskenään erilaisesta alayksiköstä, joita koodaavat geenit *luxA* ja *luxB*. Näitä kahta geeniä ympäröivät *lux*-operonissa geenit *luxC*, *luxD* ja *luxE*, jotka osallistuvat substraattina toimivan aldehydin synteesiin.

Lusiferaasia käytetään yleisesti reportterigeeninä. *LuxCDABE* tuottaa lusiferaasin holoentsyymikompleksia, jonka seurauksena solut emittoivat valoa ilman substraatin lisäystä. *LuxCDABE*:tä käytetään sekä bakteeri- että eläinsolusysteemeissä (Lehtinen, Nuutila & Lilius 2004). Myös pelkkää lusiferaasia koodaavaa operonia *luxAB* käytetään, jolloin bioluminesenssiin vaaditaan substraatin lisäys manuaalisesti (Kunert, Hagemann & Erdmann 2000). *Synechocystiksellä* on käytetty *luxAB*:ta reportterigeeninä (Kunert et al. 2000).



Kuva 6. *luxCDABE*-reportterigeenin toiminta. Transkriptioon vaadittavien tekijöiden sitoutuessa promoottoriin reportterigeeni transkriptoidaan, ja tuotteena syntyy lusiferaasia (*luxAB*) ja lusiferaasin substraattia tuottavat proteiinit (*luxCDE*). Lusiferaasin katalysoima reaktio tuottaa valoa, jonka emissiopiikki on 490 nm.

7 Työn tavoitteet

Erikoistyön tavoitteena oli siirtää *E. coli* σ^{54} -välitteinen transkription aloitusmekanismi *Synechocystikseen* ja selvittää, kykeneekö se muodostamaan aktiivisen aloituskompleksin *Synechocystiksen* RNAP:n kanssa. Tarvittavia komponentteja transkription aloitukseen ovat σ^{54} , sen aktivaatiosta vastaavat proteiinit sekä σ^{54} :lle että aktivoiville tekijöille spesifinen promoottori. Erikoistyössä siis luodaan synteettinen σ^{54} -operoni, joka sisältää σ^{54} -välitteiseen transkriptioon vaadittavien komponenttien geenit. Tavoitteena on ensisijaisesti tutkia syanobakteerin RNAP:n ja σ^{54} :n välistä vuorovaikutusta: sitoutuuko σ^{54} RNAP:n kanssa ja muodostuuko niistä transkriptioon kykenevä kompleksi? Millä muodostuva kompleksi kyetään havaitsemaan?

σ^{54} :n ja syanobakteerien RNAP:n välisen vuorovaikutuksen tutkiminen voi lisätä ymmärrystä syanobakteerien RNAP:n toiminnasta ja sen eroista bakteerien RNAP:iin nähden. Toimiessaan σ^{54} -välitteistä transkriptiota voitaisiin käyttää hyvin spesifisenä ekspressiosysteeminä syanobakteereissa. Sopivan promoottorin valinnan avulla systeemi olisi helposti indusoitavissa kasvatusolosuhteiden muutoksella.

σ^{54} - välitteisen transkription havaitsemiseen tarvitaan reportterisysteemi, jossa havaittavaa tuotetta koodaava reportterigeeni sijoitetaan σ^{54} :lle ja sen aktivaattoreille spesifisen promoottorin alaisuuteen. Yksi työn päämääristä oli tutkia *Synechocystiksessä* reportterigeeni *luxCDABE:n* toimintaa.

Ekspressoitukseen *Synechocystiksessä* σ^{54} -operoni vaatii *Synechocystiksessä* toimivan promoottorin. Vieraiden geenien ekspressoitumisen vaikutusta *Synechocystikseen* ei tiedetä, joten promoottorin tulisi olla indusoitavissa ja olla transkriptionaalisesti inaktiivinen indusoivan ärsykkeen puuttuessa. Työn tavoitteena oli myös tutkia *Synechocystiksen* kirkaassa valossa indusoituvan

sigD:n ja kuumassa indusoituvan *sigB*:n promoottorien P_{sigD} :n ja P_{sigB} :n indusoitumista ja tehokkuutta kirkaassa valossa ja kuumassa.

Työssä otettiin huomioon myös muita vieraiden geenien ekspressioon vaadittavia elementtejä. Transkriptioon ja translaatioon vaikuttavia tekijöitä ovat ribosomien sitoutumiskohdat, vieraiden geenien sisältämät kodonit ja niiden yleisyys *Synechocystiksessä* sekä oikea terminaatiosekvenssi. Synteettiseen operoniin tulee valita *Synechocystiksessä* toimivat ribosomien sitoutumiskohdat. Eri organismit suosivat eri kodoneita, ja harvinaiset kodonit häiritsevät translaatiota.

II. Menetelmät

1 *Sigma54*-operonin suunnittelu

E. coli σ^{54} :n (accession number: EYD82587), PspF:n (ABV16457), IHF α :n (Q14F23) ja IHF β :n (AAY89705) nukleotidisekvenssit sijoitettiin synteettiseen *sigma54*-operoniin järjestyksessä *pspF*, *rpoN*, *ihfA* ja *ihfB*. *Sigma54*-operoniin sijoitetut geenit muokattiin translaatioon *Synechocystiksessä* poistamalla harvoin *Synechocystiksen* DNA:ssa syrjittyjä kuuden nukleotidin sekvenssejä (Liite 1, perustuen henkilökohtaiseen keskusteluun Esa Tyystjärven kanssa). Geeneihin tehdyt muutokset on esitetty liitteessä 2. Geenien väliin sijoitettiin RBS (ribosomin sitoutumiskohta) *Synechocystis*-peräisestä geenistä *sll1579* 5'TATTTATTGACACTTATCTAGGAGAACAAA 3'. Synteettisen operonin perään sijoitettiin *Synechocystis*-peräisen *psbA2*:n terminaatiosekvenssi 5' TTCCTTGGTGTAATGCCAACTGAATAATCTGCACTCTCCTTCAATGGGGGGTGCTTTTTGC 3'.

Synechocystiksen promoottorien P_{sigB} , P_{sigD} ja P_{psbA2} sekvenssit haettiin Kazusa DNA Research Instituten tietokannasta <http://genome.microbedb.jp/cyanobase>. Promoottorien sekvenssit esitetty liitteessä 3.

Synteettisen operonin insertioon vaadittavat *Synechocystiksen* *slr0397*:n ja sen viereiset alueet haettiin Kazusa Research Instituten tietokannasta (liite 3).

Photorhabdus luminescens –peräisen geenin *luxCDABE*:n eteen sijoitettiin *E. coli* *psp*-operonin promoottori P_{psp} (liite 3), kimeerinen promoottori $P_{psp'psbA2}$ (liite 3), P_{sigB} , P_{sigD} ja P_{psbA2} . Reportterigeeni sijoitettiin *psbA1*:n kohtaan *Synechocystiksen* genomissa. Insertioon vaadittavat *psbA1*:n sekvenssit (liite 3) haettiin Kazusa Research Instituten tietokannasta.

2 *Synechocystis*-kannat ja ylläpitokasvatusolosuhteet

Mutaatiot tehtiin glukoositoleranttiin *Synechocystis*-kantaan (*wt*) (Williams 1988) sekä kantaan, jonka RNAP:iin oli lisätty histidiinihäntä (RNAP-His) (Koskinen et al. 2016). Soluja ylläpidettiin tarvittavat antibiootit (taulukko 1) sisältävillä BG-11-agarmaljoilla 32 °C:ssa jatkuvassa valaistuksessa PPFD 35-40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Taulukko 2. *Synechocystis*-kantojen kasvatuksessa käytetyt antibiootit ja niiden pitoisuudet.

<i>Synechocystis</i> -kanta	Antibiootti	pitoisuus $\mu\text{g}/\text{ml}$
<i>wt</i>	-	-
$\Delta\text{slr}0397, \Delta\text{sll}1476$	Kanamysiini	50
<i>RNAP-his</i>	Kloramfenikoli (CAP)	10
<i>Lux</i>	Nourseotrisiini (NAT)	10
<i>lux RNAP-his</i>	NAT + CAP	10, 10
<i>lux sigma 54</i>	NAT + kanamysiini (kn)	10, 50
<i>lux sigma 54 RNAP-his</i>	NAT + kn + CAP	10, 10, 50

2.1 Kasvatuskokeiden olosuhteet

Kasvatuskokeita ja transformaatioita varten soluja kasvatettiin nestemäisessä BG-11-mediumissa, jonka pH oli säädetty 7.5:een HEPES-NaOH-puskurilla. Soluja huuhdeltiin ylläpitomaljalta nestemäiseen mediumiin niin, että kasvatusten optinen tiheys oli $A_{730}=0.1$.

Taulukko 3. *Synechocystis*-kantojen kasvatusolosuhteet.

Kasvatusolosuhde	Lämpötila (°C)	Valo (PPFD $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ravistelu (rpm)
Standardi	32	35-40	90
Kuuma	40	35-40	90
Kirkas valo	30-32	380	90

3 Neutraalien kohtien valintaprosessi

3.1 *slr0271*, *slr0397*, *slr1396*, *sll1476* ja *slr0397* –geenien ekspression muutokset kuumassa ja kirkkaassa valossa

Mikrosiru- ja RNA-seqdataa *Synechocystiksen* geenien *slr0271*, *slr0397*, *slr1396*, *sll1476* ja *slr0397* ekspressiosta standardiolosuhteissa, kuumassa ja kirkkaassa valossa haettiin CyanoEXpress-tietokannasta (cyanopress.syslab.eu).

Geenien ekspressiota kuumassa ja kirkkaassa valossa verrattiin ekspression standardiolosuhteissa mikrosirudatan (Hakkila et al. 2013) perusteella. Datan analysointi toteutettiin aiemmin kuvatuilla menetelmillä (Hakkila et al. 2013, Koskinen et al. 2016)

3.2 Kasvatuskokeet neutraalien kohtien valintaa varten

Kannat, geenit *slr0397* ja *sll1476* oli inaktivoitu (*Synechocystis* Δ *slr0397* ja *Synechocystis* Δ *sll1476*) (Pinto et al. 2015), sekä villityypin *Synechocystis*-kanta (*wt*), johon mutaatiot oli tehty, saatiin Paula Tamagninin laboratorion Porton yliopistosta.

Wt, Δ *slr0397* ja Δ *sll1476* ylläpidettiin kanamysiiniä sisältävillä BG-11-maljoilla. Kasvatuskokeita varten ne huuhdeltiin 30 ml:aan BG-11-mediumia, ja solutiheys säädettiin $A_{730} = 0.1$:een. Soluja kasvatettiin neljä päivää, ja A_{730} mitattiin vuorokauden välein. Mitattavaa näytettä laimennettiin tarvittaessa BG-11-mediumilla siten, että absorbanssi pysyi lineaarisella mittausalueella 0.1-0.4. Kasvatuksissa käytettiin kolmea biologista replikaattia. Kasvatuskoe toteutettiin standardiolosuhteissa, kuumassa ja kirkkaassa valossa.

4 Kloonausprosessit *E. colissa*

Synechocystikseen insertoitavien DNA-fragmenttien muokkaus, monistus ja eristys tehtiin *E. colissa*. Kloonausprosessit toteutettiin kemiallisesti kompetenteissa TOP10 OneShot-soluissa (New England Biolabs) Solujen transformointiin kemiallisesti New England Biolabsin protokollaa mukaillen. 25 μ l TOP10-soluja inkuboitiin jäällä insertoitavan lugaatioseoksen kanssa 30 minuuttia, jonka jälkeen ne siirrettiin 42 °C:een lämpökylpyyn. Lämpökäsittelyn jälkeen seokset siirrettiin takaisin jäälle. Solujen annettiin elpyä käsittelystä tunnin ajan 37 °C:essä 200 rpm ravistelussa SOC-mediumissa. Elpyneitä soluja levitettiin huoneenlämpöisille oikeat antibiootit sisältäville LB-maljoille 50 μ l ja 150 μ l. Yön yli kasvatuksen jälkeen maljoilta valittiin yksittäisiä pesäkkeitä uusille maljoille.

4.1 Plasmidien eristys ja digestiot

Plasmidien eristystä varten *E. colia* kasvatettiin yön yli (18-20h) 200 rpm:n ravistelussa 37 °C:ssa 5 ml:ssa LB-mediumia, joka sisälsi vaadittavat antibiootit. Solut kerättiin sentrifugoimalla 2-3 minuuttia huoneenlämmössä 6800 X g. Plasmidin eristys tehtiin Fermentasin/ Thermo Scientificin Genejet Plasmid Purification –kitillä valmistajan ohjeen mukaan. Puhdistettu plasmidi liuotettiin 50 µl:aan MQ-vettä. Eristetyn plasmidin pitoisuus ja puhtaus määritettiin BioDrop-laitteella.

Digestio-olosuhteet vaihtelivat käytettävän restriktioentsyymien mukaan. Digestoidun plasmidin fragmentit erotettiin toisistaan agarosigeelillä 1 x Modified TAE-puskurissa (Millipore), irrotettiin geelistä UV-valon alla ja eristettiin geelistä Milliporen Gel Extraction–kitillä. DNA-konsentraatio määritettiin BioDropilla.

4.2 Plasmidit

Genscriptiltä tilattiin seuraavat synteettiset DNA-fragmentit (liite 3), jotka toimitettiin ampicilliiniresistenssikasetin sisältävässä pUC 57-simple-plasmidissa. Käytetyt plasmidit on kuvattu taulukossa 4.

Taulukko 4. Kloonausprosessissa käytetyt DNA-fragmentit, plasmidit ja niiden kuvaukset.

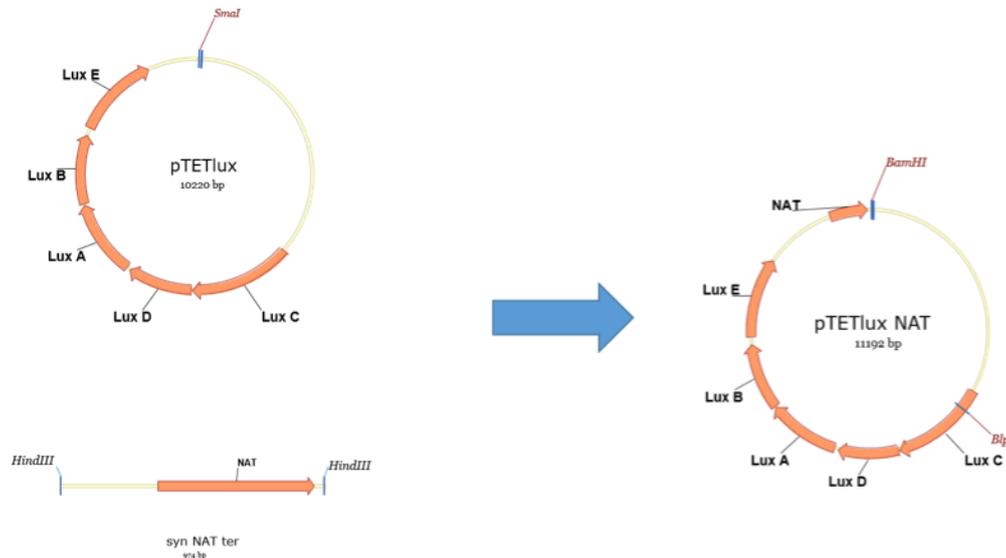
Nimi	Plasmidi	Kuvaus
<i>pTetlux</i>	pTet	<i>luxCDABE (lux-operoni)</i>
<i>pGEM-NATter</i>	pGEM	Nourseotrisiiniresistenssiä koodaava kasetti

<i>psbA1'-PpspluxC'</i>	pUC57-simple	Homologiseen rekombinaatioon vaadittavat alueet <i>psbA1</i> :stä, <i>E. coli</i> promoottori <i>Ppsp</i> ja <i>luxC'</i> NheI-restriktiokohtaan asti
<i>Ppsp'psbA2luxC'</i>	pUC57-simple	kimeerinen promoottori <i>Pps'psbA2p</i> ja <i>luxC'</i> NheI-restriktiokohtaan asti
<i>PpsbA2luxC'</i>	pUC57-simple	<i>Synechocystiksen</i> promoottori <i>PpsbA2</i> ja <i>luxC'</i> NheI-restriktiokohtaan asti
<i>PsigBluxC'</i>	pUC57-simple	<i>Synechocystiksen</i> promoottori <i>PsigB</i> ja <i>luxC'</i> NheI-restriktiokohtaan asti
<i>PsigDluxC'</i>	pUC57-simple	<i>Synechocystiksen</i> promoottori <i>PsigD</i> ja <i>luxC'</i> NheI-restriktiokohtaan asti
<i>slr0397'-PsigB-sigma54</i>	pUC57-simple	Homologiseen rekombinaatioon vaadittavat alueet <i>slr0397</i> :stä, <i>Synechocystiksen</i> promoottori <i>PsigB</i> ja <i>E. coli</i> geenit <i>pspF</i> , <i>rpoN</i> , <i>ihfA</i> ja <i>ihfB</i>
<i>kanamysiinikasetti</i>	pUC4K	Kanamysiiniresistenssiä koodaava kasetti

4.3 Nourseotriiniresistenssiä koodaavan kasetin liittäminen *lux*-operoniin

LuxCDABE (tästedes *lux*-operoni) oli ampicilliiniresistenssin sisältävässä pTetlux-plasmidissa *E. coli* K-12-kannassa, jonka toimitti Marko Virta Helsingin Yliopistosta. pTetLux:iin lisättiin nourseotriini(NAT)-kasetti plasmidista pGEM-NATter. pTetLux

digestoitiin SmaI:llä (New England Biolabs). pGEM-NAT-ter digestoitiin HindIII:lla (NEB). Digestoituun NAT-kasettiin tehtiin tylpät päät Klenow-fragmentilla (NEB). NAT-kasetti ligatoitiin pTetLuxiin T4- ligaasilla (kuva 7).



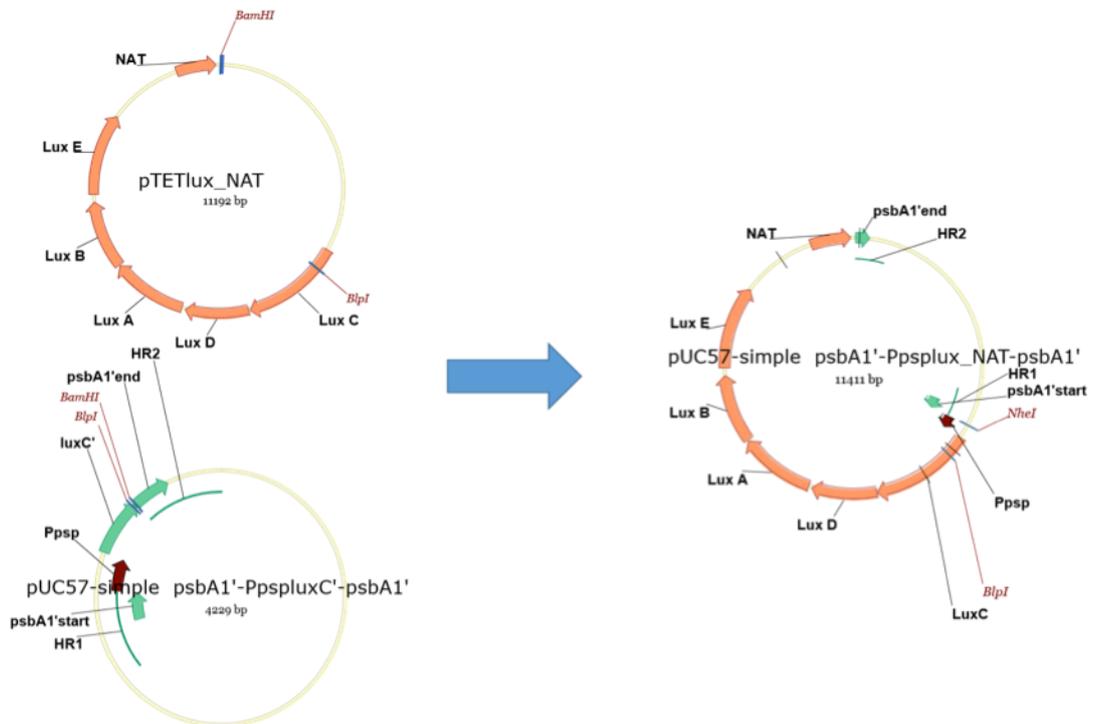
Kuva 7. NAT-resistenssikasetin (NATter) liittäminen luxCDABE-operoniin. pTETlux digestoitiin SmaI:llä ja NATter digestoitiin HindIII:llä NATter liitettiin pTetlux:iin.

TOP10- solut transformoitiin plasmidilla ohjeen mukaan, jonka jälkeen ne siirrettiin LB-maljalle, joka sisälsi NAT 50 µg/ml. Transformaation onnistuminen verifioitiin koedigestiolla.

4.4 Promoottorin liittäminen lux-operoniin

Psp-promoottorin ja psbA1:n 500 emäsparia molemmin puolin homologista rekombinaatiota varten sisältävä konstrukti psbA1'-PpsluxC'-psbA1 tilattiin Genscriptiltä pUC57-simple vektorissa. PsbA1'-PpsluxC' ja pTetlux_NAT digestoitiin BlnI:llä ja BamHI:lla. Lux_NAT ligatoitiin psbA1'-PpsluxC'-psbA1:han T4-ligaasilla (kuva 8). Plasmidi psbA1'-Ppslux_NAT siirrettiin TOP10-soluihin.

Plasmidiin psbA1'-Ppsplux_NAT vaihdettiin promoottorit *Ppsp'*psbA2, *PpsbA2*, *PsigD* ja *PsigB* digestoimalla Plasmidi psbA1'-Ppsplux_NAT-psbA1 sekä Genscriptillä teetetyt plasmidit *Ppsp'*psbA2luxC', *PpsbA2luxC'*, *PsigDluxC'* ja *PsigBluxC'* *NheI*:llä (NEB) ja *BlpI*:llä (NEB) ja ligatoimalla T4-ligaasilla. Transformaatio tehtiin aiempaa protokollaa noudattaen.



Kuva 8. *Psp*-promoottorin liittäminen *luxCDABE:n* eteen. *LuxCDABE_NAT* iroitettiin *pTETlux*-plasmidista *BlpI*:llä ja *BamHI*:llä. *pUC57-simple psbA1'-PpspluxC'* digestoitettiin *BlpI*:llä ja *BamHI*:llä.

Transformaation onnistumista seurattiin koedigestoimalla aiemman protokollan mukaan eristetty plasmidi *NheI*:llä ja *BlpI*:llä ja erottamalla erikokoiset promoottorit agaroosigeelillä. Onnistuminen verifioitiin sekvensoimalla.

4.5 Kanamysiiniresistenssiä koodaavan kasetin liittäminen σ^{54} -operoniin

Kanamysiiniresistenssiä koodaava kasetti irrotettiin pUC4K-plasmidista EcoRI:llä (NEB) ja erotettiin agarosigeelillä aiemmin kuvatulla protokollalla. Synteettisen sigma54-operonin sisältävä plasmidi *slr0397'-PsigBsigma54* katkaistiin EcoRI:llä. Ligaatio tehtiin T4-ligaasilla aiemman protokollan mukaan ja ligatoitu plasmidi transfromoitiin *E. coli* TOP10-soluihin. Kanamysiiniresistenssikasetin suunta suhteessa sigma54-operoniin todettiin koedigestoimalla plasmidi *slr0397'-PsigBsigma54_kan* AhdI:llä ja XhoI:llä (NEB).

5 *Synechocystis lux*-kantojen luominen

Synechocystis lux-kantoja luotiin viisi kappaletta sekä *Synechocystis wt*- että *Synechocystis RNAP-his* -kantaan (taulukko 5). Synteettinen sigma54-operoni siirrettiin *PsigB:n* ja *PsigD:n* alaisena *Synechocystis Ppsplux:iin*.

Taulukko 5. Tutkimuksessa käytetyt *Synechocystis*-kannat.

Kanta	Kuvaus
<i>P_{psp}lux</i>	<i>Lux</i> -operoni <i>E. coli</i> <i>psp</i> -operonin promoottori <i>P_{psp:n}</i> alaisuudessa
<i>P_{psp'psbA2}lux</i>	<i>Lux</i> -operoni kimeerisen promoottorin <i>P_{psp'psbA2:n}</i> alaisuudessa
<i>P_{psbA2}lux</i>	<i>Lux</i> -operoni <i>Synechocystis</i> ksen <i>psbA2:n</i> promoottori <i>P_{psbA2:n}</i> alaisuudessa

<i>P_{sigBlux}</i>	<i>Lux</i> -operoni <i>Synechocystiksen sigB:n</i> promoottori <i>PsigB:n</i> alaisuudessa
<i>P_{sigDlux}</i>	<i>Lux</i> -operoni <i>Synechocystiksen sigD:n</i> promoottori <i>PsigD:n</i> alaisuudessa
<i>P_{psplux-PsigBsigma54}</i>	Synteettinen <i>sigma54</i> -operoni <i>PsigB:n</i> alaisuudessa ja <i>lux</i> -operoni <i>Ppsp:n</i> alaisuudessa
<i>P_{psplux-PsigDsigma54}</i>	Synteettinen <i>sigma54</i> -operoni <i>PsigD:n</i> alaisuudessa ja <i>lux</i> -operoni <i>Ppsp:n</i> alaisuudessa

5.1 *Synechocystiksen* transformaatio

Synechocystis wt ja *Synechocystis RNAP-His*-soluja kasvatettiin transformaatiota varten BG-11-mediumissa solutiheyteen $A_{730} = 0.8-1.2$. Insertoitavan DNA:n ja homologisen rekombinaation alueen sisältävää pUC57-simple-plasmidia linearisoi Ahdl-restriktioentsyymillä. 500 µl soluja ja 4-5 µg linearisoitua plasmidia inkuboi 4-5 h kasvatusolosuhteissa. Inkubaation jälkeen solut siirrettiin antibioottia sisältäville BG-11 maljoille ja siirrettiin standardiolosuhteisiin kasvamaan.

Transfromoidut solut valikoituivat transformoitumattomista antibioottia sisältävillä maljoilla selektiopaineen avulla (taulukko 1). 10-14 vuorokautta transformaation jälkeen selektiomaljolle ilmestyvät pesäkkeet siirrettiin uudelle selektiomaljalle, jonka jälkeen uudelle BG-11 + antibiootti -maljalle siirrettiin viikon välein hengissä olevat pesäkkeet. Pesäkkeitä siirrettiin uusille maljoille 30-60 vuorokautta.

5.2 Transformaation onnistumisen verifiointi PCR:llä

Selektiomaljoilla kasvaneiden pesäkkeiden transformaation onnistumista havaittiin PCR:llä käyttämällä templaattina joko transformoidusta pesäkkeestä otettuja hajotettuja soluja tai nestekasvatuksesta fenoliuutolla eristettyä DNA:ta.

Pesäke-PCR:ssä maljoilta liuotettiin pesäkkeestä silmämääräisesti soluja 10 µl:aan steriiliä MQ-vettä. Solut hajotettiin käyttämällä soluja vuorotellen +60 °C:ssa ja -80 °C:ssa.

Fenoliuutolla DNA:ta eristettäessä soluja kasvatettiin tiheyteen $A_{730} = 1$, jonka jälkeen ne kerättiin sentrifugoimalla 6 000 x g 5 minuuttia. Solut liuotettiin 600 µl:aan eristyspuskuria (50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1mM EDTA, 50 mM NaCl, jonka jälkeen DNA uutettiin kerran fenolilla, 1:1 fenoli-kloroformilla ja kloroformilla. Faasit erotettiin sentrifugoimalla 5 minuuttia 12 000 x g huoneenlämmössä. DNA saostettiin kylmällä 100-prosenttisellä etanolilla yön yli -25 °C:ssa. Saostunut DNA kerättiin sentrifugoimalla 10 minuuttia 14 000 x g ja liuotettiin veteen.

Transformaation onnistumisen havaitsemiseen käytettiin alukkeina *psbA1*- geenin alkuun ja loppuun sitoutuvia alukkeita ok_seq3 (5'-TCGGCCCAGGTGCTCACG-3') ja ok_seq5 (5'-CCGCTACCACCTGTTTTATTA-3'). Insertoidun DNA-fragmentin sisältävistä soluista tuli 10 000 emäsparin mittainen PCR-tuote, kun taas *psbA1*:stä monistuu noin 1 000 emäsparin pituinen tuote. PCR tehtiin käyttämällä Thermo Scientificin Phusion II Hot Startia valmistajan protokollan mukaan. PCR- tuotteet analysoitiin elektroforeesilla agarosigeelillä. Pesäke-PCR:n perusteella valikoituneista kannoista lähetettiin sekvensoitavaksi yksi pesäke mutanttia kohden. Sekvensointitulokset tarkistettiin Invitrogenin AlignX-ohjelmalla.

5.3 Luminesenssimittauksen optimointi *Synechocystis*-kasvatuksia varten

Synechocystis-kannat *wt*, *P_{psbA2}lux-*, *P_{psp}lux-* ja *P_{psp'}psbA2lux-* kannoista mitattiin luminesenssi 200 µl:sta soluja BG-11-mediumissa kolmella teknisellä toistolla. Signaalin voimistamisen vuoksi 200 µl:aan solususpensiota lisättiin 5mM dekanaalia 50% v/v vesi-metanoliliuoksessa siten, että lopullinen dekanaalikonsentraatio oli 0,01mM. Luminesenssin stabiiliuden tutkimiseksi kaivoista mitattiin aluksi 15 minuutin ajan 1 minuutin välein. Luminesenssi mitattiin myös puolen tunnin ja tunnin kuluttua dekanaalin lisäyksestä. Luminesenssin voimistamiseksi levyä inkuboitii kasvatusolosuhteissa 15 minuuttia.

Solujen kasvuvaiheen ja solutiheyden vaikutusta tutkittiin mittaamalla luminesenssi eri-ikäisistä kasvatuksista ja konsentroimalla soluja 2-5-kertaisiksi sentrifugoimalla ja poistamalla osa kasvatusmediumista. Solujen tuottamaan luminesenssia mitattiin 12 vuorokauden ajan.

Luminesenssimittaukset tehtiin 3-5 päivän ikäisistä nestekasvatuksista 2-3 biologisella replikaatilla ja kolmella teknisellä replikaatilla biologista replikaattia kohden. Soluja BG-11 mediumissa otettiin 200 µl, johon lisättiin dekanaalia konsentraatioon 0.01mM. Dekanaalin lisäyksen jälkeen mikrotiitterilevyä inkuboitii 15 minuuttia kasvatuskaapissa

5.4 Luminesenssimittaukset

Standardiolosuhteissa kasvaneiden *Synechocystis* $P_{psp}lux:n$ sekä $P_{psp}psbA2lux:n$ tuottamaa luminesenssia mitattiin aiemmin kuvatun protokollan mukaisesti.

$P_{sigB}lux:n$ ja $P_{sigD}lux:n$ $P_{psbA2}lux:n$ ja $wt:n$ tuottamaa luminesenssia mitattiin standardiolosuhteissa, kuumassa sekä kirrkaassa valossa. Mittauksia varten kaikkia kantoja kasvatettiin standardiolosuhteissa neljän päivän ikäisiksi. Luminesenssi standardiolosuhteissa mitattiin aiemman protokollan mukaan. Kasvuolosuhteiden muutoksen vaikutusta 15 minuutin inkubaation jälkeen mitattiin siirtämällä solut mikrotiitterilevyllä joko kuumaan tai kirrkaaseen valoon dekanaalin lisäyksen jälkeen. 30 minuutin, tunnin ja 24 tunnin vaikutuksen mittaamista varten kasvatukset siirrettiin joko kuumaan tai kirrkaaseen valoon. Solut siirrettiin mikrotiitterilevyille, dekanaali lisättiin 15 minuuttia ennen mitattavaa aikapistettä, ja inkubaatio tehtiin olosuhteissa joihin kasvatukset oli siirretty.

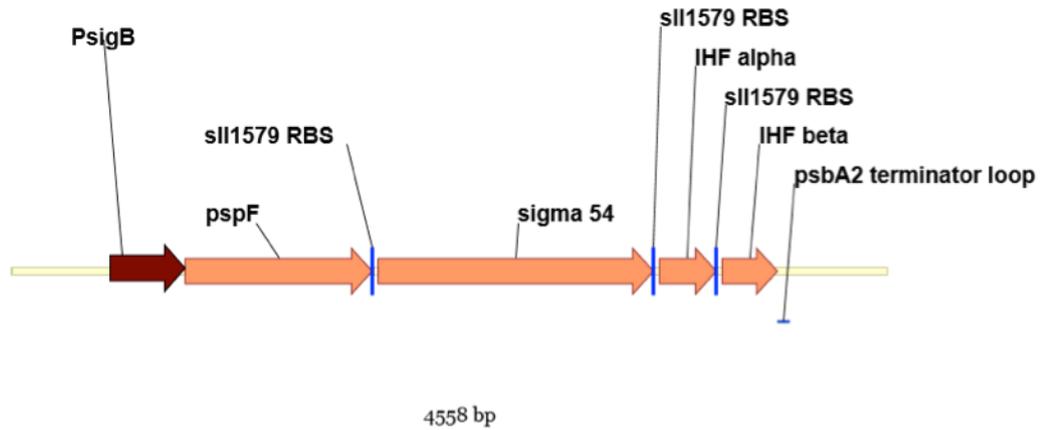
III. Tulokset

1 σ^{54} –välitteisen transkriptiosysteemin ja synteettisen *sigma54*-operonin suunnittelu

Työn ensimmäinen vaihe oli σ^{54} -välitteisen transkriptiosysteemin suunnittelu *Synechocystikseen*. Transkriptiosysteemiä varten suunniteltiin synteettinen operoni, joka sisältää *E. coli* σ^{54} :ää koodaavan geenin *rpoN* ja sen toimintaa aktivoivien tekijöiden geenit. Aktivaattoriproteiiniksi valittiin *E. coli* PspF, sillä puuttuvan R-domeenin vuoksi se on konstitutiivisesti aktiivinen. σ^{54} :n ja PspF:n vuorovaikutus vaatii IHF:n läsnäoloa, joten transkriptiosysteemiin vaadittiin myös IHF:n geenit. *E. coli* *pspF*, *rpoN*, *ihfA* ja *ihfB* sijoitettiin synteettiseksi *sigma54*-operoniksi. Geenit muokattiin siten, että *Synechocystiksessä* geeneissä harvoin esiintyviä kuuden nukleotidin ei sekvenssejä esiinny (Esa Tyystjärvi, henkilökohtainen keskustelu).

Synteettisen *sigma54*-operonin ekspressioon *Synechocystiksessä* vaadittiin *Synechocystiksessä* toimiva promoottori, joka olisi indusoitavissa kasvuolosuhteiden muutoksella.

Translaatiota varten geenien väliin sijoitettiin *Synechocystiksessä* toimivat ribosomin sitoutumiskohdat. Muokattujen geenien väliin sijoitettiin *Synechocystis*-peräisen geenin *sll1579* ribosomin sitoutumiskohta ja *psbA2*:n terminaatiosekvenssi. Lopullinen synteettinen operoni on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9 Sigma54-operoni ruskeanpunaisella nuolella merkityn P_{sigB} -operonin alaisuudessa. Operoni sisältää oransseilla nuolilla merkityt *E. coli* geenit *pspF*, *rpoN* (σ^{54}), *ihfA* ja *ihfB*. Geenien väliin on sijoitettu sinisin viivoin merkityt *sll1579:n* RBS:t, ja lopussa *psbA2:n* terminaatiosekvenssi (sininen vaakaviiva). Vaaleankeltaisella on merkitty operonin genomiin intergroitumiseen vaadittavat alueet.

2 *Synechocystis lux*-kantojen tuottama luminesenssi

σ^{54} -välitteiseen transkription toiminnan havaitsemiseksi asetettiin lusiferaasia tuottava reportterigeeni *luxCDABE* σ^{54} :lle ja bEBP PspF:lle spesifisen promoottorin P_{psp} alaisuuteen (*Synechocystis P_{psp}lux*). *Synechocystiksessä* ei ole aiemmin käytetty *luxCDABE*:ta reportterigeeninä, ja sen toiminta tuli verifioida *Synechocystiksessä*. Sen toimivuuden tutkimiseksi luotiin *Synechocystis P_{psbA2}lux*, jossa *luxCDABE* oli sijoitettu voimakkaan *Synechocystis*-peräisen promoottorin P_{psbA2} :n alaisuuteen. PSII-kompleksin D1-proteiinia koodaavan *psbA2:n* promoottorin P_{psbA2} :n tiedetään olevan voimakas *Synechocystiksen* promoottori, joka on aktiivinen normaaleissa kasvuolosuhteissa ja indusoituu voimakkaasti kirkkaassa valossa (Muramatsu, Hihara 2006)

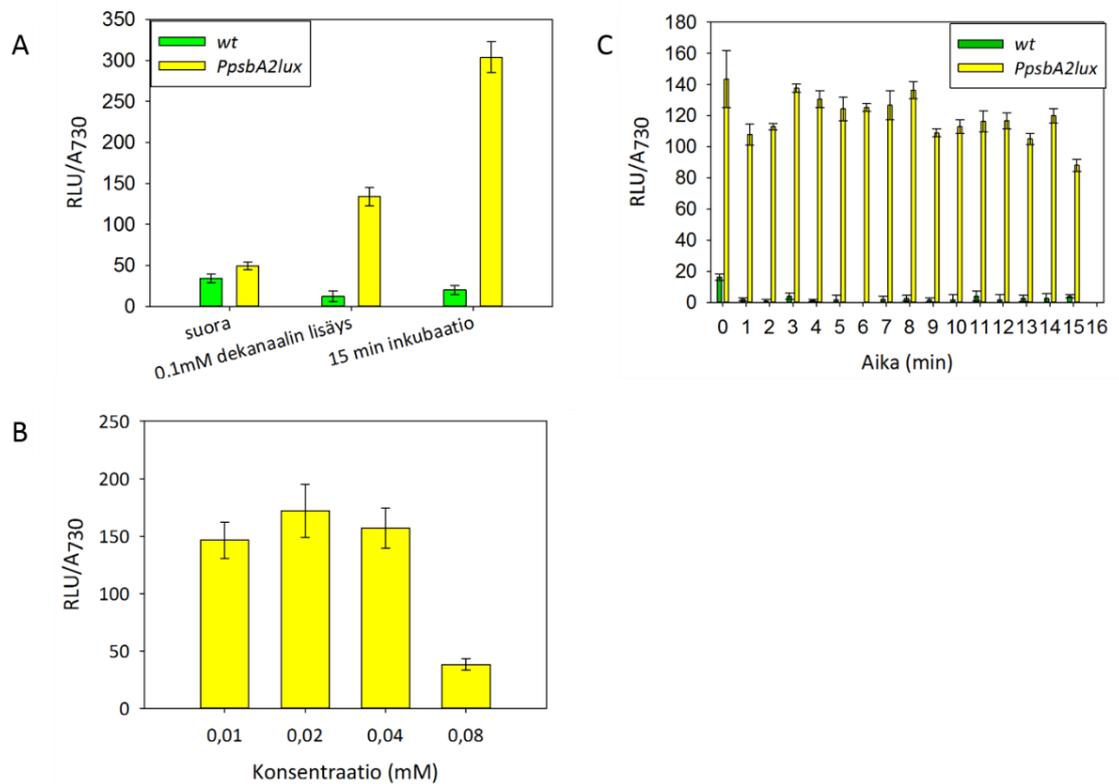
E. colissa luxCDABE tuotti paljain silmin pimeässä havaittavaa luminesenssia ilman substraatin lisäystä (kuva 10). *Synechocystis P_{psbA2}lux* tuotti sen sijaan hyvin niukasti taustasta eroavaa luminesenssia (kuva 11A).



Kuva 10. *LuxCDABE*:n sisältäviä *E. coli* TOP10-kasvustoja LB-maljalla kuvattuna valaistussa huoneessa (ylhäällä) ja pimeässä (alhaalla). Pimeässä luminesenssi kyetään havaitsemaan paljain silmin.

Lusiferaasin substraatin dekanaalin lisäys *Synechocystis P_{psbA2}lux*- soluihin voimisti signaalia kolminkertaiseksi, ja inkubaatio kasvatusolosuhteissa vielä kaksinkertaisti dekanaalin lisäyksen jälkeen saadun signaalin (kuva 11A). Dekanaalikonsentraation kaksin- ja nelinkertaistaminen voimisti luminesenssia vähäisissä määrin (kuva 11B). Luminesenssi pysyi stabiilina vähintään 15 minuuttia dekanaalin lisäyksen jälkeen (kuva 11C).

Solujen kasvuvaihe ei juurikaan vaikuttanut luminesenssiin. Luminesenssi kasvaa solumäärän noustessa, mutta suhteutettuna solujen määrää indikoivaan A_{730} :een luminesenssi pysyy suhteellisen samana ja jopa laskee tiheyden ollessa suuri. (Kuva



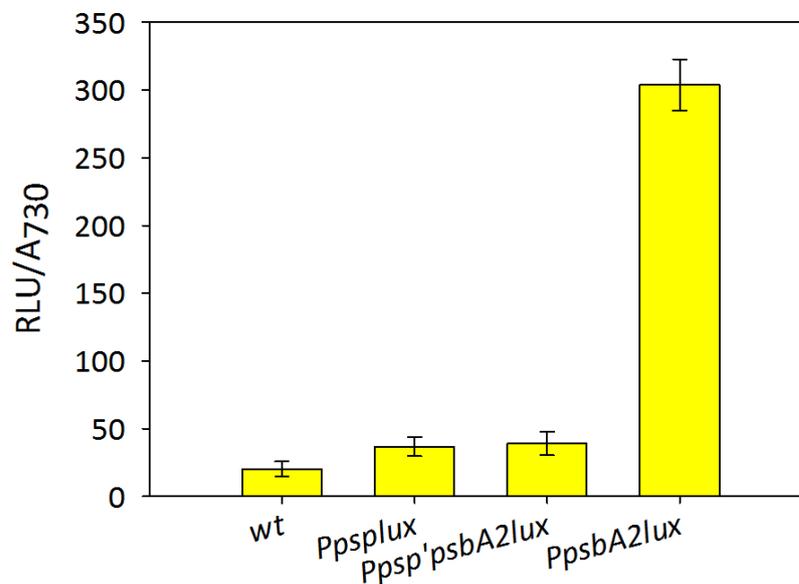
Kuva 11. *Synechocystis* villityypin (wt) ja *Synechocystis P_{psbA2lux}*:n tuottama luminesenssi mitattuna suoraan 200 μ l:sta soluja BG-11-mediumissa, 0.01 mM dekanalipitoisuudessa sekä 15 minuutin inkubaation jälkeen 0.01mM dekanalipitoisuudessa (A), *Synechocystis P_{psbA2lux}*:n tuottama luminesenssi 0.01mM, 0.02 mM, 0.04 mM sekä 0.08mM dekanalipitoisuudessa (B) ja *Synechocystis wt*:n ja *P_{psbA2lux}*:n tuottama luminesenssi mitattuna 1 minuutin välein 15 minuutin ajan 0.01mM dekanalini lisäyksen jälkeen (C).

3 *Synechocystis*seen insertoitu *luxCDABE* ei tuota luminesenssia *psp*-promoottorin alaisuudessa

Reportterigeenin luotettavuuden kannalta oli tärkeää, että *Synechocystis*in sigmafaktorit eivät tunnista *E. coli*n *P_{psp}*:tä. Tämän tutkimiseksi mitattiin *Synechocystis P_{psplux}*:n tuottamaa luminesenssia verrattuna villityyppiin ja

Synechocystis P_{psbA2} luxiin. *E. coli* ribosomin sitoutumiskohdan mahdollisen vaikutuksen vuoksi luotiin myös $P_{psp'psbA2}$ lux, jossa *E. coli*-peräinen RBS oli korvattu $psbA2$:n RBS:llä.

E. coli-peräinen σ^{54} -spesifinen promoottori ei toimi *Synechocystis*ksessä sellaisenaan. $P_{psp:n}$ alaisuudessa $luxCDABE$ ei tuottanut villityypistä eroavaa luminesenssia (kuva 12). *Synechocystis* $P_{psp'psbA2}$ lux tuotti samantasoista luminesenssia kuin *Synechocystis* P_{psp} lux (Kuva 12).



Kuva 12. *Synechocystis* wt, $P_{psp}lux:n$, $P_{psp'psbA2}lux:n$ sekä $P_{psbA2}lux:n$ tuottama luminesenssi 0.01mM dekanaalissa 15 minuutin inkubaatiolla. Mittaukset tehty kolmella biologisella toistolla ja kolmella teknisellä toistolla.

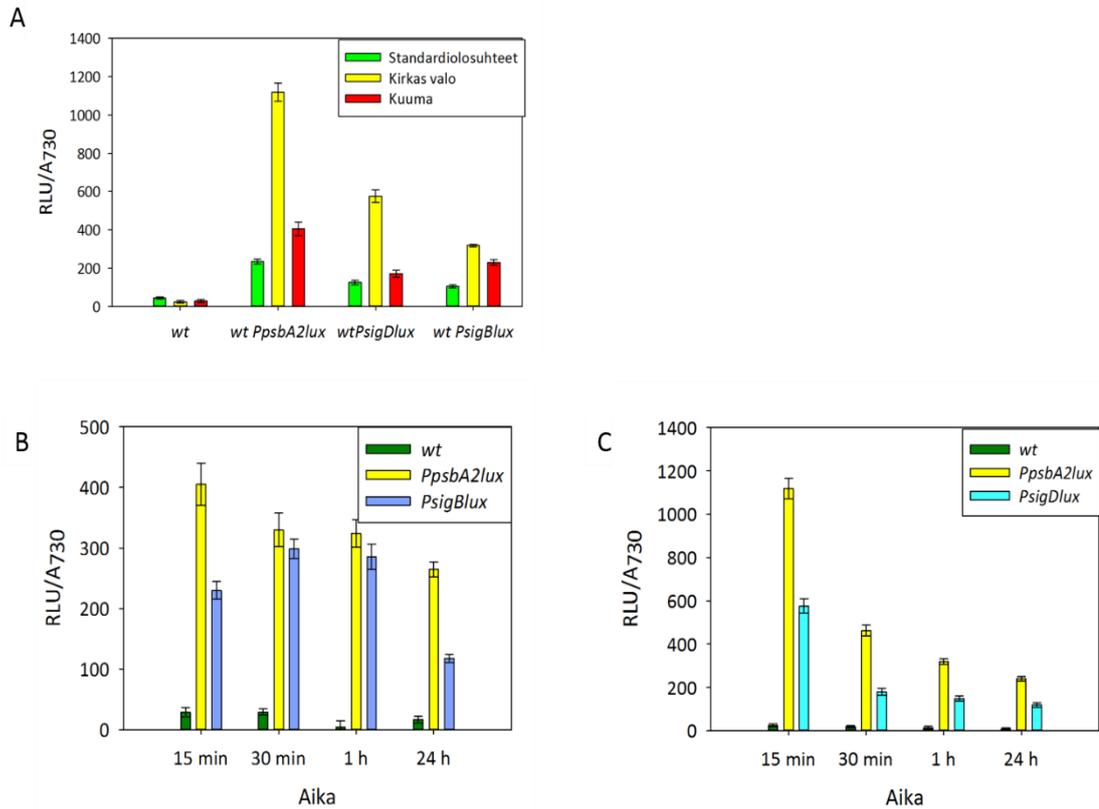
4 *Synechocystis*-promoottorit P_{sigB} ja P_{sigD} indusoituivat kuumassa ja kirkkaassa valossa

Synechocystis-peräisten promoottorien $P_{sigD:n}$ ja $P_{sigB:n}$ toimintaa ja indusoitumista tutkittiin luomalla *Synechocystis*-kannat $P_{sigD}lux$ ja $P_{sigB}lux$, joiden tuottamaa

luminesenssia mitattiin standardiolosuhteissa, kuumassa ja kirkkaassa valossa. P_{sigD} :n ja P_{sigB} :n toiminnan ymmärtäminen oli tutkimuksen kannalta keskeistä, sillä niitä oli tarkoitus käyttää sigma54-operonin ekspresion indusointiin. Muun muassa kuumassa indusoituvia geenejä säätelevä tyypin 2 sigmafaktori $sigB$ indusoituu kuumassa (Tuominen et al. 2003, Imamura et al. 2003), joten sen promoottorin oletettiin indusoituvan kuumassa. Samoin kirkkaassa valossa indusoituvan $sigD$:n (Imamura et al. 2003) promoottorin oletettiin indusoituvan kirkkaassa valossa. Promoottorien valinnassa otettiin huomioon $sigB$:n $sigD$:n alueella sijaitsevat ei-transloitavia RNA-molekyylejä koodaavat alueet (Kopf et al. 2015), sillä näillä sekvensseillä saattaa olla merkitystä promoottorin toiminnassa.

$P_{sigDlux}$ ja $P_{sigBlux}$ tuottivat villityypistä eroavan, mutta matalan luminesenssisignaalin standardiolosuhteissa (kuva 13A). P_{sigD} indusoitui selkeästi kirkkaassa valossa; $P_{sigDlux}$:n tuottama luminesenssi nelinkertaistui standardiolosuhteisiin verrattuna. Indusoituminen tapahtui nopeasti; korkein luminesenssi tuottui 15 minuutin inkubaation jälkeen, ja se laski jo 30 minuutin kuluttua noin puoleen. Vuorokauden kirkkaassa valossa kasvun jälkeen luminesenssi oli lähellä standardiolosuhteissa saatuja lukemia. (13B)

P_{sigB} indusoitui jossain määrin sekä kuumassa että kirkkaassa valossa, ja indusoituminen ei ollut yhtä voimakasta kuin P_{sigD} :n. Pidempään korkeassa lämpötilassa inkuboidessa $P_{sigBlux}$:n tuottama luminesenssi oli korkeimmillaan 30 minuutin ja tunnin inkubaation jälkeen. Vuorokauden kuumakasvatuksen jälkeen luminesenssi laski samalle tasolle kuin standardiolosuhteissa. (Kuva 13C)



Kuva 13. *Synechocystis* wt:n, wt $P_{psbA2lux}$:n, $P_{sigDlux}$:n sekä $P_{sigBlux}$:n tuottama luminesenssi 15 minuutin inkubaation jälkeen standardiolosuhteissa, kuumassa sekä kirkkaassa valossa (A), *Synechocystis* wt:n, $P_{sigDlux}$:n ja $P_{psbA2lux}$:n tuottama luminesenssi kirkkaassa valossa 15, minuutin, puolen tunnin, tunnin ja vuorokauden inkubaation jälkeen (B) ja *Synechocystis* wt:n, $P_{sigBlux}$:n ja $P_{psbA2lux}$:n tuottama luminesenssi kuumassa 15 minuutin, puolen tunnin, tunnin ja vuorokauden inkubaation jälkeen (C).

5 Neutraalin kohdan määrittäminen *Synechocystiksen* genomissa

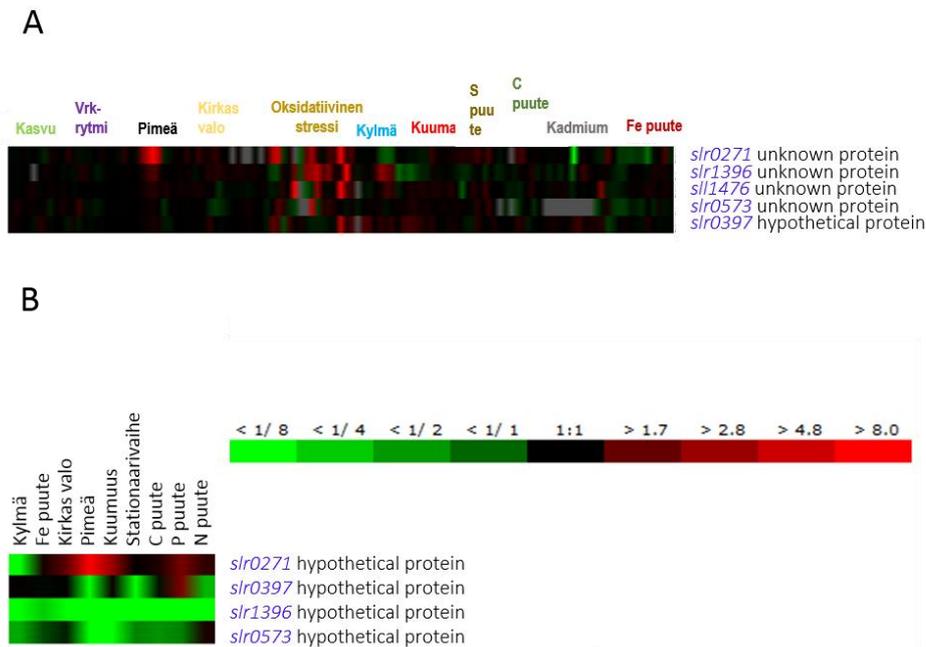
σ^{54} - välitteiseen transkriptiosysteemiin vaadittiin kaksi neutraalia kohtaa, joihin sijoittaa *sigma54*-operoni ja reportterigeeni *luxCDABE*. *PsbA1* on vain anaerobisissa olosuhteissa ekspressoituvaa geeni (Salih, G.F. & Jansson, C. 1997) , joka sopi neutraaliksi kohdaksi standardiolosuhteissa, kuumassa ja kirkkaassa valossa.

Reportterigeeni *luxCDABE* sijoitettiin *psbA1:n* sijaintiin. *Sigma54*-operonin insertioon valittiin neutraali kohta tutkimalla Pinton et al (2015) löytämiä neutraaleja kohtia. Mielenkiinnon kohteena olivat standardiolosuhteissa, kuumassa ja kirkkaassa valossa neutraalit kohdat, sillä *sigma54*-operoni sijoitettiin kirkkaassa valossa indusoituvan P_{sigD} :n ja kuumassa indusoituvan P_{sigB} :n alaisuuteen.

CyanoEXpressin mikrosirudata indikoi, että Pinton et al (2015) standardiolosuhteissa neutraaleiksi olettamien geenien *slr1476*, *slr0271*, *slr0523*, *slr1396* sekä *slr0397* ekspressiotasot eroavat vähän standardiolosuhteista kuumassa ja kirkkaassa valossa. (Kuva 14A)

CyanoEXpressin RNA-seq-datan mukaan vain *slr0397*:n ekspressio ei juurikaan muutu kirkkaassa valossa tai kuumassa. *Slr0271*:n ekspressio laski kuumassa, *slr1396*:n ekspressio kasvoi sekä kuumassa että kirkkaassa valossa, ja *slr0571*:n ekspressio kasvoi kuumassa. (Kuva 14B)

Hakkilan et al (2013) mikrosirudatan perusteella *slr0271*:n ($p=0.048$) ja *slr1396*:n ($p=0.001$) ekspressio kirkkaassa valossa erosi tilastollisesti merkitsevästi standardiolosuhteiden ekspressiosta (taulukko 6). Kuumassa yhdenkään geenin ekspressio ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi standardiolosuhteisiin verrattuna (korjattu p -arvo > 0.5 , taulukko 7).



Kuva 14. Cyanobase- palvelusta peräisin olevaa mikrosirudataa (A) ja RNA-seq-dataa (B) *Synechocystiksen* geenien *slr0271*, *slr1396*, *slr0573* ja *slr0397* ekspressiosta eri kasvuolosuhteissa. Vihreä väri merkitsee standardiolosuhteita korkeampaa ekspressiota, kun taas punainen merkitsee vähäisempää. Mielenkiinnon kohteena olivat ekspressiotason muutokset kuumassa ja kirrkaassa valossa.

Taulukko 6. Mikrosirudataa geenien *slr1476*, *slr0573*, *slr1396*, *slr0271* ja *slr0397* ekspressiotason muutoksista kirrkaassa valossa verrattuna standardiolosuhteisiin.

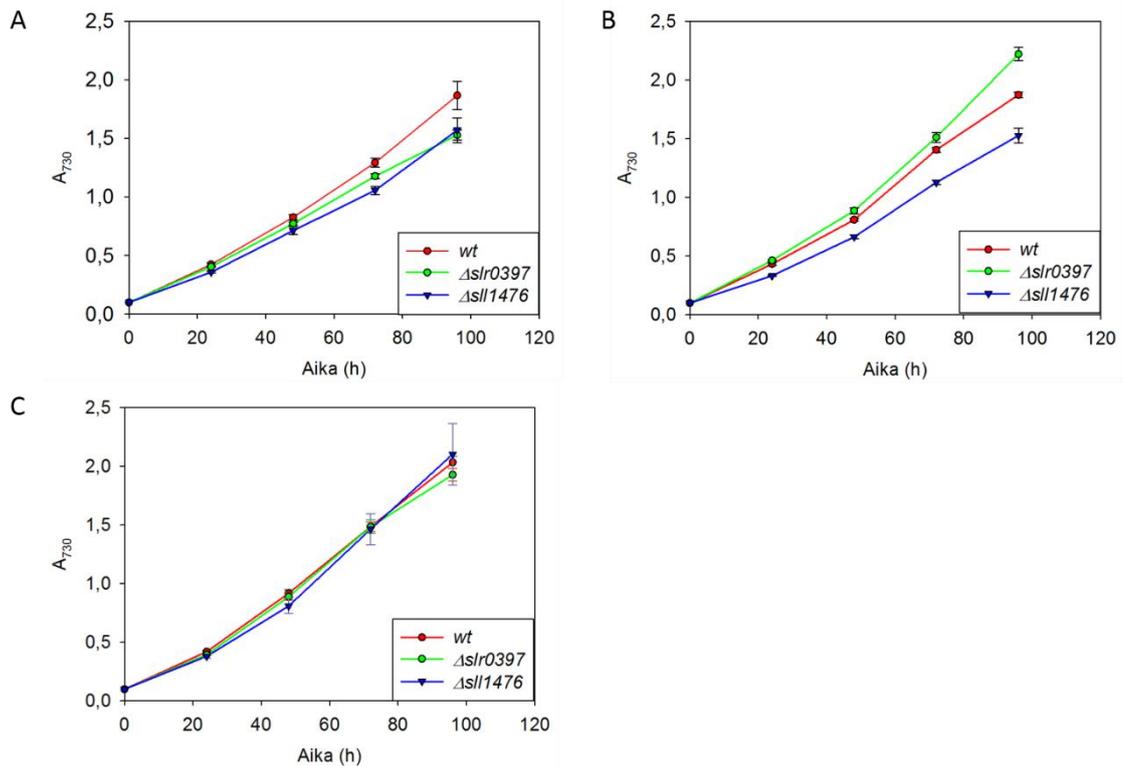
Geeni	log2 kirkas valo/std.olosuhteet	korjattu p-arvo
<i>slr1476</i>	0.096087	0.566283
<i>slr0573</i>	-0.36492	0.133684
<i>slr1396</i>	-1.74565	0.001014
<i>slr0271</i>	0.332323	0.048145
<i>slr0397</i>	-0.29137	0.111139

Taulukko 7. Mikrosirudataa geenien *sll1476*, *slr0573*, *slr1396*, *slr0271* ja *slr0397* ekspressiotason muutoksista kuumassa verrattuna standardiolosuhteisiin.

Geeni	log2 kuuma/std.olosuhteet	korjattu p-arvo
<i>sll1476</i>	0.986215	0.11946
<i>slr0573</i>	0.231612	0.302696
<i>slr1396</i>	0.321652	0.635448
<i>slr0271</i>	0.967457	0.079284
<i>slr0397</i>	0.503228	0.151423

Synechocystis- mutantit joista oletetut neutraalit kohdat *slr0397* ja *sll1476* oli inaktivoitu keskeyttämällä kanamysiiniresistenssiä koodaavalla kasetilla (*Synechocystis* Δ *slr0397* ja *Synechocystis* Δ *sll1476*) kasvoivat hieman villityyppiä hitaammin standardiolosuhteissa (15A), mutta ero oli hyvin pieni. Kuumassa molemmat mutantit kasvoivat villityypin tavoin (15C). Kirkkaassa valossa Δ *slr0397* kasvoi hieman villityyppiä nopeammin ja Δ *sll1476* hitaammin (Kuva 15B).

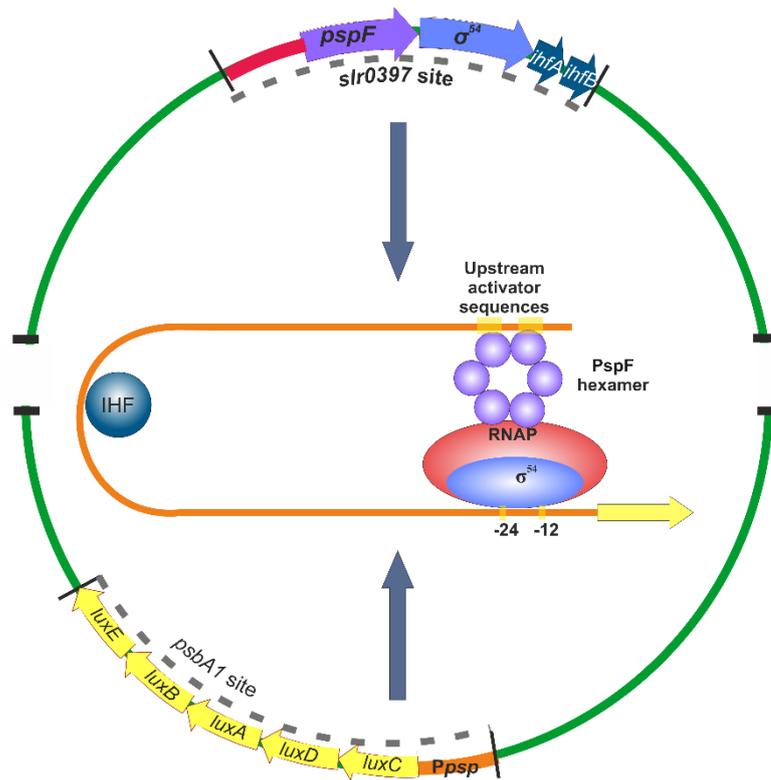
Δ *slr0397* on fenotyypiltään villityypin kaltainen. Δ *sll1476*:ssä oli havaittavissa muutoksia: maljalla solut olivat tiukemmin kiinnittyneitä toisiinsa ja kasvusto oli huomattavasti viskoosimpaa kuin villityyppi.



Kuva 15. *Synechocystis* villityypin (wt), $\Delta slr0397$:n ja $\Delta sl11476$:n kasvu standardiolosuhteissa (A), kirkaassa valossa (B) ja kuumassa (C). Soluja kasvatettiin 30 ml:ssa BG-11 mediumia ilman antibiootteja. Mittaukset tehtiin kolmella biologisella replikaatilla.

6 Suunniteltu konstrukti σ^{54} -välitteiseen transkriptioon *Synechocystis*kssä

Lopullinen malli *Synechocystis*kssä toimivasta σ^{54} -välitteisestä transkriptiosta on esitetty kuvassa 16. Synteettinen sigma54-oproni on P_{sigD} :n alaisuudessa *Synechocystis*ksen genomissa kohdassa *slr0397*. Reporterigeeni *luxCDABE* on P_{psp} :n alaisuudessa *psbA1*:n sijainnissa.



Kuva 16. Skemaattinen kuva suunnitellusta σ^{54} -välitteisestä transkriptiosysteemistä ja reportterigeenistä Synechocystiksessä. Synechocystiksen slr0397-geenin kohdalle integroitu synteettinen sigma54-operoni P_{sigD} -promoottorin alaisuudessa tuottaa vaadittavat komponentit σ^{54} -välitteiseen transkription aloitukseen. σ^{54} , PspF-heksameeri ja IHF sitoutuvat psbA1-geenin kohdalle integroidun luxCDABE:n eteen sijoitettuun psp-promoottoriin, ja transkription toimiessa reportterigeeni tuottaa lusiferaasia, jonka katalysoima bioluminesenssi voidaan havaita.

IV. Tulosten tarkastelu

1 *slr0397* on neutraali kohta *Synechocystiksen* genomissa

Neutraalien kohtien löytäminen geenien insertiota varten on keskeinen osa *Synechocystiksen* geneettisessä modifikaatiossa. Vieraan DNA:n insertio genomiin vaikuttaa paitsi itse *Synechocystiksen* geenien sekvensseihin, myös DNAn topologiaan ja mahdollisiin sääteleviin alueisiin. Voidaan jopa ajatella, että todellisia neutraaleja kohtia ei ole, ja käytettävät ”neutraalit kohdat” tulee testata niissä kasvatusolosuhteissa, joita tullaan käyttämään. Tässä kokeessa kriteereinä neutraaleille kohdille olivat inaktivaatiokantojen muuttumattomuus standardiolosuhteissa, kuumassa ja kirkaassa valossa, sillä *sigma54*-operoni sijoitettiin sekä kuumassa induoituvan promoottorin että kirkaassa valossa induoituvan promoottorin alaisuuteen. Uuden neutraalin kohdan löytämiseksi tutkimuksessa hyödynnettiin merkittävästi Pinton et al. (2015) tutkimia neutraaleja kohtia.

Δslr0397:n ja villityypin väliset erot kasvunopeudessa olivat vähäisiä standardiolosuhteissa, kirkaassa valossa ja kuumassa, ja sen fenotyyppi oli samankaltainen villityypin kanssa. Voidaan siis olettaa, että itse geeni ei ole solun kasvamiselle ja selviämiselle välttämätön näissä olosuhteissa. *Slr0397* on siis tässä tutkimuksessa käytettyjen kriteerien perusteella neutraali.

Sll1476 vaikutti mikrosirudatan perusteella neutraalilta kohdalta: sen ekspressio oli kauttaaltaan vähäistä eivätkä muutokset ekspressiotasossa olleet kovin voimakkaita kuumassa tai kirkaassa valossa. Kasvattaessa *Synechocystis wt*:n ja *Δsll1476*:n välillä oli havaittavissa selkeä ero fenotyypissä: maljalla sen muodostama kasvusto oli viskoosimpaa, ja neste kasvatuksessa se muodosti villityyppiä herkemmin aggregaatteja. Ero viittaa geenin mahdolliseen rooliin bakteerin pintarakenteen

muodostuksessa. Kirkkaassa valossa kasvu oli myös hitaampaa kuin villityypin. *Sll1476* ei näiden kokeiden perusteella täyttänyt neutraaleille kohdille asetettuja kriteerejä.

2 *Lux*-operonin toiminta *Synechocystiksessä*

LuxCDABE on paljon käytetty bioluminesenssia tuottava reportterigeeni, joka tuottaa *E. colissa* voimakkaan signaalin. Sen etu on signaalin voimakkuus ja mittauksen yksinkertaisuus; solujen tuottamaa luminesenssia voidaan havaita suoraan ilman ylimääräisiä reagensseja tai muita toimenpiteitä. *Synechocystiksessä* on käytetty aiemmin pelkkää lusiferaasia tuottavaa reportterigeeniä *luxAB* (Kunert et al. 2000, Muramatsu, Hihara 2006), ja tässä työssä kokeiltiin *luxCDABE*:n toimivuutta *Synechocystiksessä*.

Tässä työssä todettiin, että *luxCDABE* tuotti hyvin heikosti luminesenssia *Synechocystiksessä* voimakkaankin promoottorin P_{psbA2} :n alaisuudessa. Todennäköisintä on, että *luxCDABE* ei tuota riittävästi substraattia, jotta havaittavaa luminesenssia syntyisi. Lusiferaasin substraatin dekanaalin lisääminen kasvattikin signaalia huomattavasti. Dekanaalia on käytetty aiemmin *Synechocystiksessä*, jossa on ollut reportterigeeninä *luxAB*. Inkubaatio kasvatusolosuhteissa dekanaalin lisäyksen jälkeen voimisti signaalia entisestään. Lusiferaasin katalysoima valontuottoreaktio on happea kuluttava reaktio, ja signaalin voimistuminen voi liittyä lisääntyneeseen hapen määrään.

Substraatin lisäyksen jälkeen luminesenssi jäi edelleen suhteellisen alhaiseksi verrattuna *E. colin* tuottamaan luminesenssiin. Ero johtuu todennäköisesti eroista solutiheydessä ja ekspressiotehokkuudessa.

Koska *luxCDABE*:n tuottama luminesenssi jäi dekanaalin lisäyksenkin jälkeen suhteellisen alhaiseksi, se ei mahdollisesti ole soveltuva reportterigeeni *Synechocystikseen*. Sen herkkyys ja dynaaminen on näiden tulosten valossa huono. Aiemmin käytetyn *luxAB*:n käyttö on järkevämpää kuin *luxCDABE*:n, ja joissain tapauksissa GFP ja YFP voivat olla toimivia reportterigeenejä.

3 *Synechocystis*-peräisten promoottorien P_{sigD} ja P_{sigB} toiminta

Synechocystiksen vaihtoehtoiset sigmafaktori *sigB* indusoituu kuumassa ja *sigD* kirkkaassa valossa (Imamura et al. 2003). Sigmafaktoreita koodaavien geenien *sigB* ja *sigD* promoottorien oletetaan säätelevän geenien indusoitumista edellä mainituissa olosuhteissa. *SigB*:n ja *sigD*:n promoottorit P_{sigB} ja P_{sigD} eivät ole kuitenkaan hyvin tunnettuja, eikä niiden tarkkaa pituutta tiedetä. Tässä työssä ne määritettiin kokeellisesti valitsemalla *sigB*:n ja *sigD*:n ylävirrasta sekvenssi siten, että kaikki transkriptionaaliset yksiköt sisältyvät siihen perustuen Kopf et al. tutkimukseen (2015).

Synechocystis $P_{sigDlux}$ indusoitui selkeästi kirkkaassa valossa; luminesenssi kasvoi noin kolminkertaiseksi verrattuna standardiolosuhteisiin 15 minuutin inkubaatiossa. Indusoituminen oli myös nopeaa ja suhteellisen lyhytaikaista. 15 minuutin inkuboinnin jälkeen signaali oli korkeimmillaan, ja se putosi alle kolmasosaan huipusta jo puolessa tunnissa. P_{sigD} toimii näiden seikkojen valossa kirkkaassa valossa indusoituvana *Synechocystis*-promoottorina.

Valolla indusoitavat promoottorit ovat olleet mielenkiinnon kohteena kehitettäessä geeniteknologisia sovelluksia vierasperäisten geenien ekspressioon *Synechocystiksessä* (Abe et al. 2014, Albers, Peebles 2017, Englund, Liang & Lindberg 2016). P_{psbA2} on tunnettu valolla indusoituvana promoottori, joskin sen tehokkuus

saattaa laskea siirrettäessä pois alkuperäisestä lokaatiosta (Albers, Peebles 2017). Lisäksi se on aktiivinen myös standardiolosuhteissa, minkä vuoksi se ei sovellu käytettäväksi silloin, kun vieräspäristä geeniä ei haluta ekspressoitavan jatkuvasti (Englund et al. 2016). P_{sigD} on $P_{psbA2:n}$ ohella ollut tutkimuksen kohteena kirkkaalla valolla indusoitavana promoottorina (Albers, Peebles 2017), jolloin $P_{sigD:n}$ *alaisuudessa* havaittiin nousua YFP-reportterigeenien transkripteissa, mutta ei YFP-reportterigeenin tuottamaa fluoresenssia. Tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että P_{sigD} on mahdollisesti tehokkaasti kirkkaassa valossa indusoitava, standardiolosuhteissa vähän ekspresoituva promoottori. Käyttämämme promoottori erosi pituudeltaan Albersin ja Peeblesin (2017) käyttämän promoottorin pituudesta. Tarkan promoottorialueen määrittäminen ja toiminnan optimoiminen vaatii laajempaa promoottorialueen tutkimusta.

P_{sigB} ei ollut tässä tutkimuksessa tehdyissä mittauksissa yhtä voimakas promoottori kuin P_{sigD} . *SigB* indusoitui kuumassa, mutta *Synechocystis P_{sigBluxin}* tuottama luminesenssi oli korkeampaa kirkkaassa valossa kuin kuumassa. Kuuma kaksinkertaisti luminesenssisignaalin standardiolosuhteisiin verrattuna. P_{sigB} indusoitui hitaammin kuin P_{sigD} ; korkein luminesenssisignaali saavutettiin puolessa tunnissa ja oli miltei samalla tasolla vielä tunnin inkubaation jälkeen. Vuorokaudessa ekspresio väheni huomattavasti.

Lämpötilan muutoksella indusoitavien promoottorien tutkimus ja käyttö *Synechocystiksessä* in toistaiseksi harvinaista. Kuumassa ja korkeassa indusoituvan *sigB:n* promoottori P_{sigB} on kuitenkin potentiaalisesti käyttökelpoinen promoottori vieraiden geenien ekspressiossa, sillä standardiolosuhteissa *sigB:tä* transkriptoidaan hyvin pieniä määriä, ja kuuma- ja suolakäsittelyssä ekspresio kasvaa monikertaisesti (Tuominen et al. 2003). P_{sigB} on toistaiseksi huonosti karakterisoitu promoottori, ja sen alueella sijaitsee useita transkription aloituskohtia ei-koodaaville transkripteille, joiden toimintaa ei täysin ymmärretä (Kopf et al. 2015). Tämän tutkimuksen valossa $P_{sigB:tä}$ on mahdollista käyttää kuumassa indusoitavana promoottorina, mutta sen toiminnan tarkempi ymmärrys vaatii lisätutkimuksia.

4 σ^{54} ja *Synechocystis* tulevaisuudessa

Erikoistyön puitteissa ehdittiin kehittämään *Synechocystis*-kanta, joissa oli synteettinen *sigma54*-operoni integroituna *slr0397*:n kohtaan kromosomissa P_{sigB} :n ja P_{sigD} :n alaisuudessa ja $P_{psp luxCDABE psbA1:n}$ kohdassa. Transformoituneet pesäkkeet eivät kuitenkaan ehtineet valikoitua riittävän pitkälle, jotta niitä olisi voitu kasvattaa luminesenssimittauksia varten. Tämän vuoksi σ^{54} -välitteisen transkription toimivuutta ei ehditty tutkimaan.

Tässä työssä todettiin, että *luxCDABE* ei ole kovin tehokas reportterigeeni *Synechocystiksessä*. σ^{54} -välitteisen transkription taso voi olla niin alhainen, että havaittavaa luminesenssia ei tuotu. Voi olla, että transkriptiotehokkuuden tutkimukseen tarvitaan jokin muu reportterigeeni.

Reportterigeenin avulla ei voida tutkia RNAP:n ja σ^{54} :n välistä vuorovaikutusta, mikäli σ^{54} :n sitoutuminen ei johda transkription initiaatioon. σ^{54} :n RNAP:iin sitoutumisen vaikutusta ei tiedetä; se voi olla joko neutraali tai haitata solun kasvua ja elinkykyä. σ^{54} :n sitoutumista voidaan mahdollisesti tutkia σ^{54} -spesifisellä vasta-aineella. *Synechocystiksen* RNAP:n eristämiseen ja siihen sitoutuneiden sigmafaktorien on kehitetty menetelmä. RNAP, johon on lisätty histidiinihantä (RNAP-His) eristetään pull down–menetelmällä, ja siihen sitoutuneet sigmafaktorit voidaan määrittää western blotilla (Koskinen et al. 2016).

5 Loppupäätelmät

σ^{54} -välitteisen transkription rakentaminen pitää sisällään useita vaiheita: synteettisen operonin suunnittelu, neutraalien kohtien valinta sekä reportterijärjestelmän suunnittelu.

Synteettisen operoniin vaaditaan vierasperäiset geenit sekä muita transkriptiossa ja translaatiossa tarpeellisia elementtejä. Tärkeäksi seikaksi projektissa nousikin sopivan *Synechocystis*-peräisen promoottorin valinta. *Synechocystiksen* promoottorit eivät ole selkeästi määriteltyjä, ja niiden valinta tehtiinkin arvioimalla ja kokeellisesti määrittelemällä. Toiminnan testaamiseen sopi *lux*-reportterigeeni, ja saatujen tulosten perusteella P_{sigD} ja P_{sigB} ovat niille spesifisissä olosuhteissa indusoituvia promoottoreita. P_{sigD} :n ja P_{sigB} :n tarkkoja promoottorisekvenssejä ei tunneta, mutta niiden voidaan olettaa sijaitsevan valitsemillamme alueilla.

LuxCDABE:n toiminnasta *Synechocystiksessä* ei ole aiempaa tutkimusdataa, ja aiemmin on käytetty lusiferaasia koodaavaa geeniä *luxAB*. Tässä tutkimuksessa todettiin, että *luxCDABE* ei kykene tuottamaan kunnolla luminesenssia edes voimakkaan promoottorin alaisuudessa *Synechocystiksessä*. Substraatin lisäys tuottaa havaittavan luminesenssin, joskin dynaaminen alue on jää pieneksi. Signaalin voimakkuutta ja siten dynaamista aluetta kasvattaa inkubaatio kasvatusolosuhteissa substraatin lisäyksen jälkeen.

Synechocystiksen muokkaaminen integroimalla DNA:ta genomiin vaatii neutraalin kohdan. Tässä tutkimuksessa kyettiin verifioimaan, että Pinto et al (2015) löytämistä neutraaleista kohdista *slr0397*:n inaktivointi ei johda merkittäviin muutoksiin solun kasvussa standardiolosuhteissa, kuumassa tai kirkkaassa valossa. *Slr0397* on täten hyvä kohde vieraan DNA:n integraatioon. Toisen tutkitun neutraaliksi oletetun kohdan, *sl1476*:n, inaktivointi sen sijaan johti solun pintarakenteen muutoksiin, joten sen käyttö vieraan DNA:n intergraatioon ei ole suositeltavaa.

Itse σ^{54} -välitteisen transkription toimivuutta ei ole vielä tutkittu. Systemin suunnittelun ja rakennuksen aikana tutkitut osa-alueet kuitenkin antavat uutta informaatiota ja tuovat lisää työkaluja *Synechocystiksen* tutkimukseen ja geneettiseen modifikaatioon.

Kiitokset

Isot kiitokset ohjaajalleni Kaisa Hakkilalle, tutkimusryhmän johtajalle Taina Tyystjärvelle ja sig-tutkimusryhmälle. Kiitokset myös Esa Tyystjärvelle, joka auttoi geenisekvenssien optimoinnissa. Haluan kiittää myös Marko Virtaa Helsingin yliopistosta *E. coli pTetlux*-kannan toimittamisesta käyttöömme. Kiitän Paula Tamagninin ryhmää Porton yliopistosta *Synechocystis*-kantojen toimittamisesta.

Lähteet

- Abe, K., Miyake, K., Nakamura, M., Kojima, K., Ferri, S., Ikebukuro, K. & Sode, K. 2014, "Engineering of a green-light inducible gene expression system in *Synechocystis* sp. PCC6803", *Microbial Biotechnology*, vol. 7, no. 2, pp. 177-183.
- Albers, S.C. & Peebles, C.A. 2017, "Evaluating Light-Induced Promoters for the Control of Heterologous Gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803", *Biotechnology progress*, vol. 33, no. 1, pp. 45-53.
- Al-Haj, L., Lui, Y.T., Abed, R.M., Gomaa, M.A. & Purton, S. 2016, "Cyanobacteria as Chassis for Industrial Biotechnology: Progress and Prospects", *Life (Basel, Switzerland)*, vol. 6, no. 4, pp. E42.
- Baldwin, T.O., Christopher, J.A., Raushel, F.M., Sinclair, J.F., Ziegler, M.M., Fisher, A.J. & Rayment, I. 1995, "Structure of bacterial luciferase", *Current opinion in structural biology*, vol. 5, no. 6, pp. 798-809.
- Berla, B.M., Saha, R., Immethun, C.M., Maranas, C.D., Moon, T.S. & Pakrasi, H.B. 2013, "Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities", *Frontiers in microbiology*, vol. 4, pp. 246.
- Bordes, P., Wigneshweraraj, S.R., Schumacher, J., Zhang, X., Chaney, M. & Buck, M. 2003, "The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: identifying a surface that binds sigma 54", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 5, pp. 2278-2283.
- Brissette, J.L., Russel, M., Weiner, L. & Model, P. 1990, "Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 3, pp. 862-866.
- Brissette, J.L., Weiner, L., Ripmaster, T.L. & Model, P. 1991, "Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon", *Journal of Molecular Biology*, vol. 220, no. 1, pp. 35-48.
- Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y. & Gralla, J.D. 2000, "The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54} (σ^N) Transcription Factor", *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 15, pp. 4129-4136.

- Burrows, P.C., Severinov, K., Ishihama, A., Buck, M. & Wigneshweraraj, S.R. 2003, "Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 32, pp. 29728-29743.
- Bush, M. & Dixon, R. 2012, "The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of σ^{54} -Dependent Transcription", *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, vol. 76, no. 3, pp. 497-529.
- Camsund, D. & Lindblad, P. 2014, "Engineered Transcriptional Systems for Cyanobacterial Biotechnology", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 2, pp. 10.3389/fbioe.2014.00040.
- Darwin, A.J. 2005, "The phage-shock-protein response", *Molecular microbiology*, vol. 57, no. 3, pp. 621-628.
- Doucleff, M., Pelton, J.G., Lee, P.S., Nixon, B.T. & Wemmer, D.E. 2007, "Structural Basis of DNA Recognition by the Alternative Sigma-Factor, σ^{54} ", *Journal of Molecular Biology*, vol. 369, no. 4, pp. 1070-1078.
- Dworkin, J., Jovanovic, G. & Model, P. 1997, "Role of upstream activation sequences and integration host factor in transcriptional activation by the constitutively active prokaryotic enhancer-binding protein PspF", *Journal of Molecular Biology*, vol. 273, no. 2, pp. 377-388.
- Elderkin, S., Jones, S., Schumacher, J., Studholme, D. & Buck, M. 2002, "Mechanism of action of the Escherichia coli phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF", *Journal of Molecular Biology*, vol. 320, no. 1, pp. 23-37.
- Englund, E., Liang, F. & Lindberg, P. 2016, "Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803", *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 10.1038/srep36640.
- Fassler, J.S. & Gussin, G.N. 1996, "Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies", *Methods in enzymology*, vol. 273, pp. 3-29.
- Gunnelius, L., Hakkila, K., Kurkela, J., Wada, H., Tyystjärvi, E. & Tyystjärvi, T. 2014, "The omega subunit of the RNA polymerase core directs transcription efficiency in cyanobacteria", *Nucleic acids research*, vol. 42, no. 7, pp. 4606-4614.

- Guo, Y., Lew, C.M. & Gralla, J.D. 2000, "Promoter opening by sigma(54) and sigma(70) RNA polymerases: sigma factor-directed alterations in the mechanism and tightness of control", *Genes & development*, vol. 14, no. 17, pp. 2242-2255.
- Hakkila, K., Antal, T., Gunnelius, L., Kurkela, J., Matthijs, H.C., Tyystjärvi, E. & Tyystjärvi, T. 2013, "Group 2 sigma factor mutant DeltasigCDE of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals functionality of both carotenoids and flavodiiron proteins in photoprotection of photosystem II", *Plant & Cell Physiology*, vol. 54, no. 11, pp. 1780-1790.
- Harley, C.B. & Reynolds, R.P. 1987, "Analysis of *E. coli* promoter sequences", *Nucleic acids research*, vol. 15, no. 5, pp. 2343-2361.
- Imamura, S. & Asayama, M. 2009, "Sigma factors for cyanobacterial transcription", *Gene regulation and systems biology*, vol. 3, pp. 65-87.
- Imamura, S., Yoshihara, S., Nakano, S., Shiozaki, N., Yamada, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Asayama, M. & Shirai, M. 2003, "Purification, characterization, and gene expression of all sigma factors of RNA polymerase in a cyanobacterium", *Journal of Molecular Biology*, vol. 325, no. 5, pp. 857-872.
- Joly, N., Engl, C., Jovanovic, G., Huvet, M., Toni, T., Sheng, X., Stumpf, M.P. & Buck, M. 2010, "Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology", *FEMS microbiology reviews*, vol. 34, no. 5, pp. 797-827.
- Jovanovic, G., Dworkin, J. & Model, P. 1997, "Autogenous control of PspF, a constitutively active enhancer-binding protein of *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, vol. 179, no. 16, pp. 5232-5237.
- Jovanovic, G., Engl, C., Mayhew, A.J., Burrows, P.C. & Buck, M. 2010, "Properties of the phage-shock-protein (Psp) regulatory complex that govern signal transduction and induction of the Psp response in *Escherichia coli*", *Microbiology (Reading, England)*, vol. 156, no. Pt 10, pp. 2920-2932.
- Jovanovic, G. & Model, P. 1997, "PspF and IHF bind co-operatively in the *psp* promoter-regulatory region of *Escherichia coli*", *Molecular microbiology*, vol. 25, no. 3, pp. 473-481.
- Jovanovic, G., Weiner, L. & Model, P. 1996, "Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia*

- coli stress-induced psp operon", *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 7, pp. 1936-1945.
- Kopf, M., Klähn, S., Scholz, I., Hess, W.R. & Voss, B. 2015, "Variations in the non-coding transcriptome as a driver of inter-strain divergence and physiological adaptation in bacteria", *Scientific reports*, vol. 5, pp. 9560.
- Koskinen, S., Hakkila, K., Gunnelius, L., Kurkela, J., Wada, H. & Tyystjärvi, T. 2016, "In vivo recruitment analysis and a mutant strain without any group 2 sigma factor reveal roles of different sigma factors in cyanobacteria", *Molecular microbiology*, vol. 99, no. 1, pp. 43-54.
- Kunert, A., Hagemann, M. & Erdmann, N. 2000, "Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB", *Journal of microbiological methods*, vol. 41, no. 3, pp. 185-194.
- Kuznedelov, K., Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Dove, S.L., Rogulja, D., Nickels, B.E., Hochschild, A., Heyduk, T. & Severinov, K. 2002, "A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the sigma subunit in promoter recognition", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 295, no. 5556, pp. 855-857.
- Lehtinen, J., Nuutila, J. & Lilius, E.M. 2004, "Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability", *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, vol. 60, no. 2, pp. 165-172.
- Lonetto, M., Gribskov, M. & Gross, C.A. 1992, "The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships", *Journal of Bacteriology*, vol. 174, no. 12, pp. 3843-3849.
- Meighen, E.A. 1993, "Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 7, no. 11, pp. 1016-1022.
- Merrick, M.J. 1993, "In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N)", *Molecular microbiology*, vol. 10, no. 5, pp. 903-909.
- Morett, E. & Segovia, L. 1993, "The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains", *Journal of Bacteriology*, vol. 175, no. 19, pp. 6067-6074.

- Mukherjee, K. & Chatterji, D. 1997, "Studies on the omega subunit of Escherichia coli RNA polymerase--its role in the recovery of denatured enzyme activity", *European journal of biochemistry*, vol. 247, no. 3, pp. 884-889.
- Muramatsu, M. & Hihara, Y. 2006, "Characterization of high-light-responsive promoters of the psaAB genes in Synechocystis sp. PCC 6803", *Plant & Cell Physiology*, vol. 47, no. 7, pp. 878-890.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. & Koonin, E.V. 1999, "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes", *Genome research*, vol. 9, no. 1, pp. 27-43.
- Paget, M.S. 2015, "Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution", *Biomolecules*, vol. 5, no. 3, pp. 1245-1265.
- Pinto, F., Pacheco, C.C., Oliveira, P., Montagud, A., Landels, A., Couto, N., Wright, P.C., Urchueguia, J.F. & Tamagnini, P. 2015, "Improving a Synechocystis-based photoautotrophic chassis through systematic genome mapping and validation of neutral sites", *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, vol. 22, no. 6, pp. 425-437.
- Quintana, N., Van der Kooy, F., Van de Rhee, M.D., Voshol, G.P. & Verpoorte, R. 2011, "Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 91, no. 3, pp. 471-490.
- Rappas, M., Bose, D. & Zhang, X. 2007, "Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking sigma54-dependent gene transcription", *Current opinion in structural biology*, vol. 17, no. 1, pp. 110-116.
- Rappas, M., Schumacher, J., Beuron, F., Niwa, H., Bordes, P., Wigneshweraraj, S., Keetch, C.A., Robinson, C.V., Buck, M. & Zhang, X. 2005, "Structural insights into the activity of enhancer-binding proteins", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 307, no. 5717, pp. 1972-1975.
- Rappas, M., Schumacher, J., Niwa, H., Buck, M. & Zhang, X. 2006, "Structural basis of the nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF", *Journal of Molecular Biology*, vol. 357, no. 2, pp. 481-492.
- Rodriguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J., Philippe, H. & Lang, B.F. 2005, "Monophyly of

primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes", *Current biology : CB*, vol. 15, no. 14, pp. 1325-1330.

Saecker, R.M., Record, M.T., Jr & Dehaseth, P.L. 2011, "Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase - promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis", *Journal of Molecular Biology*, vol. 412, no. 5, pp. 754-771.

Schneider, G.J. & Hasekorn, R. 1988, "RNA polymerase subunit homology among cyanobacteria, other eubacteria and archaebacteria", *Journal of Bacteriology*, vol. 170, no. 9, pp. 4136-4140.

Schumacher, J., Joly, N., Rappas, M., Zhang, X. & Buck, M. 2006, "Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation", *Journal of structural biology*, vol. 156, no. 1, pp. 190-199.

Tuominen, I., Tyystjärvi, E. & Tyystjärvi, T. 2003, "Expression of primary sigma factor (PSF) and PSF-like sigma factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803", *Journal of Bacteriology*, vol. 185, no. 3, pp. 1116-1119.

Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S. & Yokoyama, S. 2002, "Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution", *Nature*, vol. 417, no. 6890, pp. 712-719.

Weiner, L., Brissette, J.L. & Model, P. 1991, "Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on sigma 54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms", *Genes & development*, vol. 5, no. 10, pp. 1912-1923.

Wigneshweraraj, S.R., Fujita, N., Ishihama, A. & Buck, M. 2000, "Conservation of sigma core RNA polymerase proximity relationships between the enhancer-independent and enhancer-dependent sigma classes", *The EMBO journal*, vol. 19, no. 12, pp. 3038-3048.

Williams, J.G.K. 1988, [85] *Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in Synechocystis 6803*, Academic Press.

Wosten, M.M. 1998, "Eubacterial sigma-factors", *FEMS microbiology reviews*, vol. 22, no. 3, pp. 127-150.

Yang, Y., Darbari, V.C., Zhang, N., Lu, D., Glyde, R., Wang, Y., Winkelman, J., Gourse, R.L., Murakami, K.S., Buck, M. & Zhang, X. 2015, "Structures of the RNA

polymerase- σ^{54} reveal new and conserved regulatory strategies", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 349, no. 6250, pp. 882-885.

Zhang, N. & Buck, M. 2015, "A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase", *Biomolecules*, vol. 5, no. 2, pp. 1012-1019.

Liitteet

Liite 1. Poistetut sekvenssit ja kodonitaulukko

Taulukko 8. *Synechocystiksessä* harvinaiset kuuden nukleotidin sekvenssit, jotka poistettiin *E. coli*-peräisistä geeneistä

cgcgcg	agcgcg	tcacgc
cacgcg	acgcgg	tcgca
gcgcg	tcgcg	tcgtg
acggt	ggcgcg	ttcacg
tacgcg	tcgcgg	gtcgac
gtatac	atcgcg	tcacga
acgcg	gcgcgg	cttgcg
aacgcg	gacgcg	gttcgc
ctcgcg	accgcg	cacaag
tcgcg	ttcga	gacgtc
ttcgcg	gtcgcg	ctcacg
agcgcg	ggcgcc	

Taulukko 9. *Synechocystiksen* käyttämät kodonit eri aminohapoille

aminohappo	kodoni
Fenyylialaniini	TTT TTC
Leusiini	CTT CTC CTA CTA CTG
Isoleusiini	ATT ATC ATA
Metioniini	ATG

Valiini	GTT GTC GTA GTG
Seriini	TCT TCC TCA TCG
Prolini	CCT CCC CCA CCG
Treoniini	ACT ACC ACA ACG
Alaniini	GCT GCC GCA GCG
Tyrosiini	TAT TAC
Histidiini	CAT CAC
Glutamiini	CAA CAG
Aspargiini	AAT AAC
Lysiini	AAA AAG
Aspartaatti	GAT GAC
Glutamaatti	GAA GAG
Kysteiini	TGT TGC
Arginiini	AGA AGG
Glysiini	GGT GGC GGA GGG
Tryptofaani	TGG

Liite 2. *Sigma54*-operonin *E. coli* *rpoN:n*, *pspF:n*, *ihfA:n* sekä *ihfB:n* sekvenssit ja muokatut sekvenssit. Erot sekvensseissä on merkitty vihreällä ja aloituskodoni sinisellä. Rinnastukseen käytettiin Clustal-ohjelmaa.

```

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : ATCGCAGAATACAAAGATAATTTACTTGGTGAGGCGAACAGCTTTCTCGAAGTGTGGAACAGGTTTCGCATCTCGCACC : 80
Optimoidut sekvenssit : ATCGCAGAATACAAAGATAATTTACTTGGTGAGGCGAACAGCTTTCTCGAAGTGTGGAACAGGTTTCGCATCTCGCACC : 80

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GCTGGACAAACCGGTGCTCATCATCGGCGAACGCGCACCGGTAAGAGCTGATTGCCAGCCGCTGCATTATCTCTCTCT : 160
Optimoidut sekvenssit : GCTGGACAAACCGGTGCTCATCATCGGCGAACGCGCACCGGTAAGAGCTGATTGCCAGCCGCTGCATTATCTCTCTCT : 160

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : CCCGTTGGCAAGGGCCGTTTATTTCCCTTAAGTGCAGCGGCGTTAAATGAAAATCTGCTGGATCCGAACCTGTTGGTCCAC : 240
Optimoidut sekvenssit : CCCGTTGGCAAGGGCCGTTTATTTCCCTTAAGTGCAGCGGCGTTAAATGAAAATCTGCTGGATCCGAACCTGTTGGTCCAC : 240

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GAAGCGGGGGCGTTTACCGGTGCGCAAAAACGTCATCCAGGGAGCTTTGAACGTGCCGACGGCGGTACGCTATTTCTTGA : 320
Optimoidut sekvenssit : GAAGCGGGGGCGTTTACCGGTGCGCAAAAACGTCATCCAGGGAGCTTTGAACGTGCCGACGGCGGTACGCTATTTCTTGA : 320

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : TGAACTCGTACGGCACCGATGATGGTGCAGGAGAAATTTATGCGCGTATTGAGTACGGTGAACCTGGAGCGGCTGGGGC : 400
Optimoidut sekvenssit : TGAACTCGTACGGCACCGATGATGGTGCAGGAGAAATTTATGCGCGTATTGAGTACGGTGAACCTGGAGCGGCTGGGGC : 400

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GCAGCCAGCCATTGCAGGTGAATGTGCGGTTGGTATGCGCGACGAATGCCGATCTCCGGCGATGGTCAATGAAGGCAC : 480
Optimoidut sekvenssit : GCAGCCAGCCATTGCAGGTGAATGTGCGGTTGGTATGCGCGACGAATGCCGATCTCCGGCGATGGTCAATGAAGGCAC : 480

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : TTTGCGCTGACCTGCTCGACCGACTGCGTCTTTGATGTTGTACAACCTGCCACCCTGGCGAGCGGAAAGCGACATGAT : 560
Optimoidut sekvenssit : TTTGCGCTGACCTGCTCGACCGACTGCGTCTTTGATGTTGTACAACCTGCCACCCTGGCGAGCGGAAAGCGACATGAT : 560

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GTTGATGGCAGAACACTTTGCCATCCAGATGTGTGCGGAAATCAAGTGCCTCTGTCTCCCGGGTTTACGGAGCGCGCTG : 640
Optimoidut sekvenssit : GTTGATGGCAGAACACTTTGCCATCCAGATGTGTGCGGAAATCAAGTGCCTCTGTCTCCCGGGTTTACGGAGCGCGCTG : 640

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GGAAACATTGCTGAATATCGTTGCGCGGAAATATTCGTGAATTGAAAACCTGGTGAACCTTCCTGTATCGCCAC : 720
Optimoidut sekvenssit : GGAAACATTGCTGAATATCGTTGCGCGGAAATATTCGTGAATTGAAAACCTGGTGAACCTTCCTGTATCGCCAC : 720

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GGCACCAGCATTATCCGCTTGATGACATCATTATGATCCCTTTAAACGGCGTCCGCTGAAGACGCTATCCGCGTTTC : 800
Optimoidut sekvenssit : GGCACCAGCATTATCCGCTTGATGACATCATTATGATCCCTTTAAACGGCGTCCGCTGAAGACGCTATCCGCGTTTC : 800

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GAAACCACCTCCTTCCAACACTGCCCTGGATTTACGTGAGTTTCAGATGCAGCAGGAAAAGAGTTGCTGCAACTCA : 880
Optimoidut sekvenssit : GAAACCACCTCCTTCCAACACTGCCCTGGATTTACGTGAGTTTCAGATGCAGCAGGAAAAGAGTTGCTGCAACTCA : 880

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GTTTGCAACAAGGAAATATAACCAGAAGCGCGGCTGAATTAAGGGTTAACTATCATCAGTCCGCGCGTTGTTG : 960
Optimoidut sekvenssit : GTTTGCAACAAGGAAATATAACCAGAAGCGCGGCTGAATTAAGGGTTAACTATCATCAGTCCGCGCGTTGTTG : 960

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : AAAAAGCACCAGATTTAGATGCAAGCAAGTTTGAACCTCGCTTAGTCAGCAACTGGCGATGACGCTCAGCTACAACA : 1040
Optimoidut sekvenssit : AAAAAGCACCAGATTTAGATGCAAGCAAGTTTGAACCTCGCTTAGTCAGCAACTGGCGATGACGCTCAGCTACAACA : 1040

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GGCAATTGCTGTTGACGCTGTCCACGCTGGAACCTCAACAGGAGCTGCAGCAGGCGCTGGAGAGTAATCCACTGCTTG : 1120
Optimoidut sekvenssit : GGCAATTGCTGTTGACGCTGTCCACGCTGGAACCTCAACAGGAGCTGCAGCAGGCGCTGGAGAGTAATCCACTGCTTG : 1120

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : AGCAATCGACACTCATGATGAAATCGACACTCACGAAACGCCAGACAGCGAAACGCTGGACACCGCTGACGCGCTCGAA : 1200
Optimoidut sekvenssit : AGCAATCGACACTCATGATGAAATCGACACTCACGAAACGCCAGACAGCGAAACGCTGGACACCGCTGACGCGCTCGAA : 1200

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : CAAAAAGAGATGCCGGAAGAGCTGCCGCTCGACGCCAGTTGGGACACCATCTATACAGCCGTTACGCGTCCGGCACCAG : 1280
Optimoidut sekvenssit : CAAAAAGAGATGCCGGAAGAGCTGCCGCTCGACGCCAGTTGGGACACCATCTATACAGCCGTTACGCGTCCGGCACCAG : 1280

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : CGGTGACTACATTGACGACGAACCTGCCGCTATCAAGGCGAAACGACGACGACCTTGACGAGATTACCTGATGTGGCAGG : 1360
Optimoidut sekvenssit : CGGTGACTACATTGACGACGAACCTGCCGCTATCAAGGCGAAACGACGACGACCTTGACGAGATTACCTGATGTGGCAGG : 1360

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : TCGAGCTGACACCGTTTTCCGACACTGACCGCGCTATCGCCACCTCCATCGTTGATGCGCGTTGATGATACCGGTTATCTC : 1440
Optimoidut sekvenssit : TCGAGCTGACACCGTTTTCCGACACTGACCGCGCTATCGCCACCTCCATCGTTGATGCGCGTTGATGATACCGGTTATCTC : 1440

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : ACCGTCCTGGAAGATATCTCGAAGCATGGGCGATGAAGAGATCGACATCGATGAAGTTGAAGCCGCTCCTTAAGCG : 1520
Optimoidut sekvenssit : ACCGTCCTGGAAGATATCTCGAAGCATGGGCGATGAAGAGATCGACATCGATGAAGTTGAAGCCGCTCCTTAAGCG : 1520

*           *           *           *           *
E.coli-peräiset geenit : GATCCAACGGTTTGACCGGTCGGTGTGGCGGAAAGATCTGCGTGACTGCCTGCTGATCCAACCTCTCCAATTGATA : 1600
Optimoidut sekvenssit : GATCCAACGGTTTGACCGGTCGGTGTGGCGGAAAGATCTGCGTGACTGCCTGCTGATCCAACCTCTCCAATTGATA : 1600

```

* 1620 * 1640 * 1660 * 1680
 E.coli-peräiset geenit : AGACCACGCCGTGGCTGGAAGAGGCCGGCTGATCATTAGCGATCATCTCGATCTGTTAGCCAATCACGACTTCGGCACT : 1680
 Optimoidut sekvenssit : AGACCACGCCGTGGCTGGAAGAGGCCGGCTGATCATTAGCGATCATCTCGATCTGTTAGCCAATCACGACTTCGGCACT : 1680

* 1700 * 1720 * 1740 * 1760
 E.coli-peräiset geenit : TTAATGCGCGTCACCGCTCTGAAAGAAGATGTGCTGAAAGAAGCCGTCATCTGATCCAGTCGCTCGATCCACGCCCGG : 1760
 Optimoidut sekvenssit : TTAATGCGCGTCACCGCTCTGAAAGAAGATGTGCTGAAAGAAGCCGTCATCTGATCCAGTCGCTCGATCCACGCCCGG : 1760

* 1780 * 1800 * 1820 * 1840
 E.coli-peräiset geenit : TCAGTCGATCCAGACCGGTGAGCCGGAATATGTCATCCAGATGTGTTGGTGCCTAAGCATAACGCCACTGGACGGTGG : 1840
 Optimoidut sekvenssit : TCAGTCGATCCAGACCGGTGAGCCGGAATATGTCATCCAGATGTGTTGGTGCCTAAGCATAACGCCACTGGACGGTGG : 1840

* 1860 * 1880 * 1900 * 1920
 E.coli-peräiset geenit : AACTCAACAGCGACAGCATTCCCGCTCTGCAAAATCAACCAGCACTACGCCATGTCGAATAACACACGTAACGATGGC : 1920
 Optimoidut sekvenssit : AACTCAACAGCGACAGCATTCCCGCTCTGCAAAATCAACCAGCACTACGCCATGTCGAATAACACACGTAACGATGGC : 1920

* 1940 * 1960 * 1980 * 2000
 E.coli-peräiset geenit : GACAGCCAGTTTATCCGACGAATCTGCAGGATGCCAAATGGTTGATTAAGAGTCTGGAAAGCCGTAACGATACGCTACT : 2000
 Optimoidut sekvenssit : GACAGCCAGTTTATCCGACGAATCTGCAGGATGCCAAATGGTTGATTAAGAGTCTGGAAAGCCGTAACGATACGCTACT : 2000

* 2020 * 2040 * 2060 * 2080
 E.coli-peräiset geenit : GCGCGTGAGTCGCTGTATTGTTGAACAGCAGCAAGCCTTCTTTGAGCAAGCGGAAGAATATATGAAACCGATGGTACTGG : 2080
 Optimoidut sekvenssit : GCGCGTGAGTCGCTGTATTGTTGAACAGCAGCAAGCCTTCTTTGAGCAAGCGGAAGAATATATGAAACCGATGGTACTGG : 2080

* 2100 * 2120 * 2140 * 2160
 E.coli-peräiset geenit : CCGACATCGCCAGCGCTCGAAATGCAATCAGCATATCTCGCGTGACCACGCAAAAGTACCTGCATAGTCCACG : 2160
 Optimoidut sekvenssit : CCGACATCGCCAGCGCTCGAAATGCAATCAGCATATCTCGCGTGACCACGCAAAAGTACCTGCATAGTCCACG : 2160

* 2180 * 2200 * 2220 * 2240
 E.coli-peräiset geenit : GGCATTTTGAACGAAGTATTTTTCTCCAGTTACGTCAATACCGAGGGCGGGCGGAAGCCATCCACGGCGATTTCG : 2240
 Optimoidut sekvenssit : GGCATTTTGAACGAAGTATTTTTCTCCAGTTACGTCAATACCGAGGGCGGGCGGAAGCCATCCACGGCGATTTCG : 2240

* 2260 * 2280 * 2300 * 2320
 E.coli-peräiset geenit : TGCGCTGGTGAAGAAATTAATCGCGGGGAAAACCCAGCGAAACCGTTGAGCGACAGCAAGTTAACCTCTTGTCTGTC : 2320
 Optimoidut sekvenssit : TGCGCTGGTGAAGAAATTAATCGCGGGGAAAACCCAGCGAAACCGTTGAGCGACAGCAAGTTAACCTCTTGTCTGTC : 2320

* 2340 * 2360 * 2380 * 2400
 E.coli-peräiset geenit : AACAAGGTATCATGGTGGCAGCCGCACTGTTGCGAAATACCGGAGTCTTTATCCATTCGCGCGTCAACACGGTAAA : 2400
 Optimoidut sekvenssit : AACAAGGTATCATGGTGGCAGCCGCACTGTTGCGAAATACCGGAGTCTTTATCCATTCGCGCGTCAACACGGTAAA : 2400

* 2420 * 2440 * 2460 * 2480
 E.coli-peräiset geenit : CAGCTCGTTGATCGCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTGATAAGCTTGGGCTTAGCAAGCGGGATGC : 2480
 Optimoidut sekvenssit : CAGCTCGTTGATCGCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTGATAAGCTTGGGCTTAGCAAGCGGGATGC : 2480

* 2500 * 2520 * 2540 * 2560
 E.coli-peräiset geenit : CAAAGAACTGGTTGAACTGTTTTCGAAGAGATCCGTCGCGCTCTGAAAAACGGCGAAGAGTAACTCTCTGGTTTTG : 2560
 Optimoidut sekvenssit : CAAAGAACTGGTTGAACTGTTTTCGAAGAGATCCGTCGCGCTCTGAAAAACGGCGAAGAGTAACTCTCTGGTTTTG : 2560

* 2580 * 2600 * 2620 * 2640
 E.coli-peräiset geenit : GTAACCTCGATCTGCGTGATAAGAATCAACGCCCGGACGTAACCCGAAAAACGGGCGAGGATATCCCATTAACAGCACGG : 2640
 Optimoidut sekvenssit : GTAACCTCGATCTGCGTGATAAGAATCAACGCCCGGACGTAACCCGAAAAACGGGCGAGGATATCCCATTAACAGCACGG : 2640

* 2660 * 2680 * 2700 * 2720
 E.coli-peräiset geenit : CGCGTGGTGACCTTCGCCCCGGCAGAAGTTAAAAAGCCGGTTCGAAAAACGCTTCGCCAAAGACGAGTAAATGACCAA : 2720
 Optimoidut sekvenssit : CGCGTGGTGACCTTCGCCCCGGCAGAAGTTAAAAAGCCGGTTCGAAAAACGCTTCGCCAAAGACGAGTAAATGACCAA : 2720

* 2740 * 2760 * 2780 * 2800
 E.coli-peräiset geenit : GTCGGAATTGATAGAAAGCTTTGCCACCCAGCAATCCACATCCCGCCAAGACGGTTGAAGATGCAGTAAAAGAGATGC : 2800
 Optimoidut sekvenssit : GTCGGAATTGATAGAAAGCTTTGCCACCCAGCAATCCACATCCCGCCAAGACGGTTGAAGATGCAGTAAAAGAGATGC : 2800

* 2820 * 2840 * 2860 * 2880
 E.coli-peräiset geenit : TGGAGCATATGGCCGACTCTTGGCAGGGGAGCGTATTGAAATCCGCGGTTTCGGCAGTTTCTCTTTGCACTACCCG : 2880
 Optimoidut sekvenssit : TGGAGCATATGGCCGACTCTTGGCAGGGGAGCGTATTGAAATCCGCGGTTTCGGCAGTTTCTCTTTGCACTACCCG : 2880

* 2900 * 2920 * 2940 * 2960
 E.coli-peräiset geenit : GCACCAGTACCGGACGTAATCCGAAGACTGGCGATAAAGTAGAACTGGAAGGAAAAATACGTTCTCCTCTTTAAACCTGG : 2960
 Optimoidut sekvenssit : GCACCAGTACCGGACGTAATCCGAAGACTGGCGATAAAGTAGAACTGGAAGGAAAAATACGTTCTCCTCTTTAAACCTGG : 2960

* 2980 *
 E.coli-peräiset geenit : TAAAGAACTGCGCGATCGCGCAATATTTACGGTTAA : 2997
 Optimoidut sekvenssit : TAAAGAACTGCGCGATCGCGCAATATTTACGGTTAA : 2997

Liite 3. Käytetyt sekvenssit.

Taulukko 10. Käytettyjen promoottorien sekvenssit promoottorin säätelemän geenin aloituskodoniin asti

Promoottori	Sekvenssi
<i>P_{psp}</i> (199 emäsparia)	5'-CCTCACCAAGTAAATTATCTTTGTATTCTGCCATGATGAAATTCGCCACT GTTAGTGTAATTCGCTAACTCATCCTGGCATGTTGCTGTTGATTCTTCAATCA GATCTTTATAAATCAAAAAGATAAAAAATTGGCCGCAAATGTATTAAACAGTT CAGCAGGACAATCCTGAACGCAGAAATCAAGAGGACAACATT-3'
<i>P_{psbA2}</i> (87 emäsparia)	5'-GCTTTACAAACTCTCATTAACTCTTTAGACTAAGTTTAGTCAGTTCCAA TCTGAACATCGACAAATACATAAGGAATTATAACCAA-3'
<i>P_{psp'}psbA2</i> (214 emäsparia)	5'-CCTCACCAAGTAAATTATCTTTGTATTCTGCCATGATGAAATTCGCCACT TGTTAGTGTAATTCGCTAACTCATCCTGGCATGTTGCTGTTGATTCTTCAATC AGATCTTTATAAATCAAAAAGATAAAAAATTGGCACGCAAATGTATTAAACAG TTCAAGTTTAGTCAGTTCCAATCTGAACATCGACAAATACATAAGGAATTATA ACCAA-3'
<i>P_{sigB}</i> (402 emäsparia)	5'-GCTAGCTCCACTGAGTTAATCAACCAGAGGAAAAAGTCAAGGAGGTAACACTAT CCGCCTGGAAAACGGCTTGCCAGCTTGACAAAAAATATGTTGGGTTAACCCACT GTGCCATTGGTAATCCTTCATCTTGGCCCTTGTTGAATCCCTAATGATTGTC TCATGGTGATATTGATTTTTGGGTATCTTTTAGCTATGCGGCTGTAGGAGCGTG GTATTGGTTTCGGCGGTAACGCCAGCCTAGAACCAAAAAATTATTATTTATTC CCGAACCTTGTCACCATTTGCGGCGTCTAAAGGCCCACTCGTTAGGACACGGTGTA AAAAAATTGACGACTGCACTACCCTATTCTCCACCATCAATGACTTAGTCTAAGA CATTTTTGGGAAA-3'
<i>P_{sigD}</i> (284 emäsparia)	5'-GCTAGCCGTTTTTATTGCCTTCTAACCCAGACGATAGCCTCTGGAGGAGTAT GTGCTTCACAAAAAATTTACAAAATTAAGAATTGTTTAGTATTATTAGTGGAT TGATCCAGTCATTCCCATCAATCGTCCGTTTCCAGTTGCCAAACGCCCAT CGGACAGGCATTATCCGTCAATTTACCTAGCCAGTCCGTCTCGAATATTACTAACA TGGCGTTCCTGGGTTTATTGGTCTACCACTGTGATTCTTCCACTGAAATCCCTAA TCCAAG-3'

Taulukko 11. Sekvenssit, joita käytettiin sigma54-operonin ja reportterigeenin insertioon *Synechocystiksen* genomiin

Geeni	Sekvenssi
<p><i>psbA1'</i> (500 emäsparia) <i>psbA1'</i> (500 emäsparia)</p>	<p>5'-TGGCTTGATCTGGCATTACGAGAAAAATTTTTATTTTTAATGATTTAT TTTTTCCTATTAATAATCTTTTTTTACCTTTGGAAACCAACTGCAATCTGAGA AACCATCTTGTTTTTTAAAGAAAATATTATAATCTGAAATCAAGGGAAGTT AATCAATGCCAATAATTATCTCGCATTATTAATCCCCCTTATCTATCTGGTT GAGTTGGATTTAGCTGATAGTTTATCACCAAAAATAACAAGCAAAATCAAATCC AAGCTTAAACCCAAAATCTTACTTGTAAATTATTCTGCTATGACTACTACCCAA TTAGGATTACAGGAACAAAGCCTGTGGTCACGGTTCTGTTGTTGGATTACTAG CACTTCTAATCGCCTTACATCGGCTGGTTGGGGTGTGATGATCCCCACTT TGTTAACCGCTACCACCTGTTTTATTATCGCTTTCATCGCCGCTCCCCGGTG GATATTGATGGCATTGCGGAGCCCAT-3'</p> <p>5'-TCAACCTCAACGGTTTTAACTTCAACCAATCCATTCTGGATGCCCAAGGC CGTCCCGTGAGCACCTGGGCGGATGTGATTAACCGTGCCAACATTGGTTTTGA GGTGATGCACGAACGCAACGTTCAAAATTTCCCTTGGATTTAGCTCCGGTG ATGCCCAAATGGTGGCCCTGAACGCCCCCGCCATTGAAGGCTAGTGCCATTGC CATAACTGCTTCGGTTAGACTTCGTTTCATTTGGTTAATCAAGGGCACTCTC GCAATGGGGTGCCTTTTATGGTCCAAGGTTAAAGTTAAGCCAGTAAAGTTAA GTCTATTTCTAGGGTGAATGTAATGAATCAATTTAGGGACTGGGGTTTTTCC ACTGATTGGTGGCAAGCAAAAAAGGGGAATATTGGGTTACTGGGCAACAAT TCTCTCCGTTGGATTTGACTGTTACCGGTTTATACTCCTACTAATTTACAGT TACTAGCTGAACAAAATCAGTGGATT-3'</p>
<p><i>slr0397'</i> (500 emäsparia) <i>slr0397'</i> (500 emäsparia)</p>	<p>5'-GCCGTTTCTCGACGGGGCAGATGGGATAGTTCCTTAACTTTATTGAGTAA TGCTTTGCCGTTAGTGCGGTGGAGGCGTTTGGCATAGGATTATTTTTCCGT TGAATGATGCTTGATTGCGGGGACTGTTTTTTTTCAAAGTCTACATAAGATA AAATATAACATCAAACCTTAGCTGAAAAACTTTTTTTTTCAACTTTTTGATTA TTTAGCCGAGGAATTTTTCCCTGAAAAAATCAAGCCTTGACCTCTGGCGAG TTTTGTCTAAAGATTTTTGGCCGCCATGGAGCAATGATGAGTTAGGTTTGGG CAATACAAGCTAGCTACGGGTTACCTTTCCGAAAACCAACGAATTTTTGCC AGATTAGCGCCAAAATTAAGCGGAGCAGTGGGTCAAAATATATTTATCTCAGG GGGAATCATTGCTTTAAATCAATTCGCTATCCTATGCATGTCATGTGTTTATT AACATCCCCTGTTCCCAAGATTTT-3'</p> <p>5'-ATAAACCCAAAAAATGCTGGCTTTGTTGCCCTGTCAACCAAAGTTCCCAA TAGTCTTCCCAATTCTGCTCAAATCGAGTTAACTGGGCAAATATCTATGGA TTACTCCTTCCCATTTCTCATCAACAATTAACCAAATGACCCTGATGGAAGGA AGATCGACCCAGTGAATGACTACAATAATGGTCAACCTGGCCATTTACTAGG TAAACCTAATTTAACCGAGGAAATAATCTCCATGGCTCAAGATTCTCCATCTT CCCTCTCCAAAGAAGCCCTAACCATTGCCCATCTCCAGGGGGTGCAGGAGCGA CGGCAGGAAGAGCGGATGTTGGCCTTTGCCAAGTGTTCGATATGGAAGGGGA ATTGGTGGGGGTATCCTTCGACTTAACTCGCAACGGTATCTGTGTGAGCGTTC CCAATGATTGGCCCCAGGACACGGATTTTACCGTCAAGCTCCGGCGCATGGAC AATGAAGCTTTACCCACCATCACCAT-3'</p>

