

**Związki Polifluoroalkilowe (PFAS)** to grupa syntetycznych związków chemicznych szeroko stosowanych w przemyśle i produktach konsumenckich. Cechują się wyjątkową stabilnością chemiczną, przez co są trudne do rozkładu, co powoduje ich długotrwałą obecność w środowisku i bioakumulację w organizmach.

## 1. Charakterystyka PFAS

- 1) PFAS zawierają atomy fluoru przyłączone do łańcucha węglowego, tworząc bardzo stabilne wiązania węgiel-fluor (C-F).
  - a. **Stabilność chemiczna:** Wiązania C-F są jednymi z najsilniejszych wiązań kowalencyjnych, co czyni PFAS odpornymi na rozkład biologiczny i chemiczny.
  - b. **Właściwości hydrofobowe i lipofobowe:** PFAS odpychają wodę i tłuszcze, co jest przydatne w produktach przemysłowych.
  - c. **Zastosowanie w przemyśle:** Są szeroko stosowane w produktach takich jak odzież, naczynia kuchenne, farby, środki gaśnicze.

## 2. Problemy środowiskowe i zdrowotne PFAS

- 1) PFAS są znane jako „wieczne chemikalia” (ang. *forever chemicals*) ze względu na ich trudność w rozkładzie i trwałość w środowisku.
  - a. **Bioakumulacja:** PFAS kumulują się w tkankach organizmów, przez co mogą przenikać przez łańcuch pokarmowy.
  - b. **Wpływ na zdrowie:** Badania wskazują na ich powiązania z zaburzeniami hormonalnymi, problemami immunologicznymi oraz zwiększonym ryzykiem nowotworów.
  - c. **Zanieczyszczenie środowiska:** PFAS występują w wodach gruntowych, rzekach oraz organizmach żywych, co sprawia, że stanowią zagrożenie dla ekosystemów.

## 3. Degradacja PFAS przez mikroorganizmy

- 1) Badania nad mikroorganizmami zdolnymi do degradacji PFAS koncentrują się na wykorzystaniu bakterii i grzybów.
- 2) Przykłady mikroorganizmów:
  - a. **Bakterie glebowe:** Bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, które są w stanie częściowo przekształcać PFAS.
  - b. **Grzyby glebowe:** Grzyby z rodzaju *Phanerochaete*, które posiadają enzymy (lakazy, peroksydazy) zdolne do degradacji związków organicznych.
  - c. **Konsorcja mikrobiologiczne:** Różne mikroorganizmy mogą działać synergicznie, umożliwiając etapowy rozkład PFAS.

**Enzymy Potencjalnie Uczestniczące w Degradacji PFAS** to grupa enzymów, które mogą rozkładać trwałe wiązania węgiel-fluor (C-F) w PFAS. Badania nad tymi enzymami koncentrują się na ich zdolności do transformacji lub częściowej degradacji PFAS.

#### 1. Dehalogenazy

- 1) **Charakterystyka:** Dehalogenazy są enzymami zdolnymi do usuwania atomów halogenów (np. fluoru) z cząsteczek organicznych. Ich prosta struktura i nieskomplikowane centrum aktywne sprawiają, że są obiecujące dla degradacji PFAS.
- 2) **Przykład:** Dehalogenazy haloalkanowe, takie jak *DhaA* z *Xanthobacter autotrophicus*, są stosowane do rozkładu pochodnych PFAS.

#### 2. Oksydoreduktazy (np. Peroksydazy i Lakazy)

- 1) **Charakterystyka:** Oksydoreduktazy katalizują reakcje redoks, które mogą rozkładać stabilne wiązania w związkach organicznych. Działają w obecności reagentów, takich jak nadtlenuk wodoru.
- 2) **Przykład:** Peroksydaza chrzanowa (HRP) i lakazy z grzybów, takich jak *Phanerochaete chrysosporium*, są stosowane w badaniach nad degradacją związków fluoroorganicznych.

#### 3. Hydrolazy Amidowe

- 1) **Charakterystyka:** Hydrolazy amidowe rozkładają wiązania amidowe w cząsteczkach, co jest przydatne w degradacji PFAS zawierających grupy amidowe.
- 2) **Przykład:** Amidohydrolazy mogą być stosowane do rozkładu pochodnych PFAS, które posiadają grupy amidowe, umożliwiając częściową degradację.

#### 4. Monooksygenazy i Dioksygenazy

- 1) **Charakterystyka:** Enzymy te katalizują reakcje wprowadzania tlenu do związków organicznych, co ułatwia rozkład struktury węglowej.
- 2) **Przykład:** Monooksygenazy podobne do P450 (cytochrom P450) są stosowane w modyfikacjach fluoroorganicznych związków, chociaż ich skuteczność jest ograniczona w pełnej degradacji PFAS.

#### 5. Projektowane Enzymy i Enzymy Syntetyczne

- 1) **Charakterystyka:** Enzymy modyfikowane genetycznie oraz enzymy syntetyczne są projektowane, aby rozkładać trwałe wiązania C-F. Dzięki inżynierii białek możliwe jest modyfikowanie miejsc aktywnych w celu poprawienia aktywności degradacyjnej.
- 2) **Zastosowanie:** Zastosowanie syntetycznych enzymów jest obiecującą metodą degradacji PFAS, szczególnie przy pochodnych związkach fluoroorganicznych.

**Dehalogenaza Haloalkanowa (DhaA)** jest enzymem odpowiedzialnym za usuwanie atomów halogenów z organicznych związków chemicznych. Enzym ten jest stosowany w badaniach nad biodegradacją i biotransformacją związków fluoro- i chloroorganicznych, które są trudne do rozkładu [jansson2004structural].

## 1. Opis Białka i Struktura

- 1) Dehalogenaza haloalkanowa (DhaA) pochodzi z bakterii *Xanthobacter autotrophicus*.
- 2) Enzym składa się z \*\*293 aminokwasów\*\* i ma masę cząsteczkową około 33 kDa [jansson2004structural].
- 3) Struktura przestrzenna DhaA należy do klasy  $\alpha/\beta$ -hydrolaz i zawiera charakterystyczny fałd  $\alpha/\beta$  z helisami i arkuszami  $\beta$ , które tworzą stabilny rdzeń białka [schindler2009chemical].
- 4) Struktura dzikiego typu DhaA jest dostępna w bazie danych PDB pod identyfikatorem \*\*4E46\*\*, co stanowi istotny punkt odniesienia w analizie mutantów tego enzymu [jansson2004structural].

## 2. Centrum Katalityczne

- 1) Centrum aktywne DhaA zawiera triadę katalityczną, typową dla enzymów z klasy  $\alpha/\beta$ -hydrolaz.
  - a. **Triada katalityczna** składa się z trzech kluczowych reszt aminokwasowych: seryny (Ser145), kwasu asparaginowego (Asp176) oraz histydyny (His272) [prokop2010structure].
  - b. W reakcji dehalogenacji seryna działa jako nukleofil, który atakuje substrat, inicjując reakcję rozszczepienia wiązania C-Hal (np. C-Cl lub C-F).
- 2) W centrum aktywnym występuje także kieszeń hydrofobowa, która stabilizuje hydrofobowe fragmenty substratu, ułatwiając jego wiązanie i rozkład [kalum2006substrate].

## 3. Kofaktory i Wymagania

- 1) Enzym nie wymaga dodatkowych kofaktorów, co czyni go stosunkowo łatwym do syntezy i użycia w systemach ekspresji heterologicznej, takich jak *E. coli* [jansson2004structural].
- 2) Optymalna aktywność DhaA występuje w obecności jonów sodu i potasu, które stabilizują strukturę białka i centrum aktywne.

## 4. Dostępne Mutanty DhaA

- 1) W celu zwiększenia aktywności i specyficzności DhaA dla różnych substratów, opracowano szereg mutantów tego enzymu.
  - a. **DhaA80 (mutacja T148L/W264F)**: Wykazuje wyższą specyficzność wobec związków chloroorganicznych i jest stabilniejsza termicznie niż typ dziki. Struktura tego mutantu jest dostępna w bazie PDB pod identyfikatorem \*\*7O8B\*\* [stsiapanava2010characterization].
  - b. **DhaA31 (mutacja T148L/Y273F)**: Zwiększona aktywność w dehalogenacji krótszych alkanów fluoroorganicznych [stsiapanava2010characterization].
  - c. **DhaA115 (mutacja T148L/W264F/L175A)**: Ta mutacja sprawia, że enzym jest bardziej stabilny i wykazuje zwiększoną aktywność w szerszym zakresie pH, co czyni go użytecznym do zastosowań przemysłowych [prokop2010structure].

**Podsumowanie:** Dehalogenaza haloalkanowa (DhaA) jest wszechstronnym enzymem stosowanym w biodegradacji związków halogenowych. Zarówno struktura dzikiego typu (4E46), jak i mutanty, takie jak DhaA80 (7O8B), stanowią cenne obiekty do badań mechanizmu działania tego enzymu oraz jego wykorzystania w zastosowaniach przemysłowych [jansson2004structural, schindler2009chemical, stsiapanava2010characterization].

**Protokół eksperymentalny: Pomiar efektywności pracy dehalogenazy haloalkanowej (DhaA) przy użyciu spektrofotometru.** Eksperyment umożliwia ocenę parametrów kinetycznych enzymu, takich jak  $V_{\max}$  i  $K_m$ , poprzez pomiar szybkości reakcji dehalogenacji halogenowanego substratu [damborsky2006haloalkane].

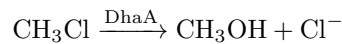
## 1. Cel eksperymentu

- 1) Ocena efektywności katalitycznej dehalogenazy haloalkanowej (DhaA) poprzez pomiar szybkości dehalogenacji substratu halogenowanego [stsiapanava2010characterization].
- 2) Uzyskanie parametrów kinetycznych enzymu, takich jak  $V_{\max}$  i  $K_m$  [chowdhury2009kinetic].

## 2. Wybór Substratu

- 1) Przykładowy substrat: chlorometan ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ) lub 1-chlorobutan, który ulega dehalogenacji przez enzym DhaA [damborsky2006haloalkane].

- 2) Reakcja:



- 3) Anion chlorkowy ( $\text{Cl}^-$ ) tworzy produkt, którego wzrost stężenia można monitorować spektrofotometrycznie [chowdhury2009kinetic].

## 3. Przygotowanie odczynników i roztworów

- 1) **Roztwór substratu:** Przygotowany w buforze fosforanowym o pH optymalnym dla działania enzymu (zwykle pH 7-8) [stsiapanava2010characterization].
- 2) **Roztwór enzymu:** Roztwór oczyszczonego enzymu DhaA w buforze, o stężeniu dostosowanym do widocznej zmiany absorbancji [damborsky2006haloalkane].
- 3) **Bufor reakcyjny:** Bufor fosforanowy o odpowiednim pH dla maksymalnej aktywności enzymu.

## 4. Ustawienie Spektrofotometru

- 1) Długość fali: Ustaw spektrofotometr na 240 nm, co odpowiada maksymalnej absorbancji anionu chlorkowego ( $\text{Cl}^-$ ) [chowdhury2009kinetic].

## 5. Procedura pomiarowa

- 1) **Przygotowanie próbki kontrolnej:** Zmieszaj substrat z buforem bez dodatku enzymu, aby wyeliminować absorbancję substratu.
- 2) **Przygotowanie próbki badanej:**
  - a. Do kuwety spektrofotometrycznej dodaj roztwór substratu i enzymu w buforze.
  - b. Dokładnie zmieszaj i natychmiast umieść w spektrofotometrze.
- 3) **Pomiar absorbancji:**
  - a. Mierz zmianę absorbancji co 15 sekund przez okres 5-10 minut.
  - b. Monitoruj zmniejszanie absorbancji substratu lub wzrost absorbancji produktu (anionu chlorkowego) [chowdhury2009kinetic].

## 6. Obliczenia

- 1) **Szybkość reakcji:** Oblicz początkową szybkość reakcji ( $V_0$ ) jako zmianę absorbancji w jednostce czasu ( $\Delta A/\Delta t$ ) [chowdhury2009kinetic].

- 2) **Parametry  $V_{\max}$  i  $K_m$** : Dla różnych stężeń substratu wykonaj wykres Lineweavera-Burka lub krzywą Michaelisa-Menten w celu obliczenia  $V_{\max}$  i  $K_m$ .

#### 7. Interpretacja wyników

- 1) Wyższe  $V_{\max}$  oznacza wyższą maksymalną szybkość reakcji, a niższe  $K_m$  wskazuje na wyższe powinowactwo enzymu do substratu [**stsiapanava2010characterization**].

#### 8. Kontrole i powtarzalność

- 1) Powtórz eksperyment dla różnych stężeń enzymu i w różnych warunkach pH oraz temperatury, aby ocenić stabilność i optymalne warunki aktywności enzymu [**damborsky2006haloalkane**].

**Ekspresja białka dehalogenazy haloalkanowej (DhaA) w *E. coli* z użyciem plazmidu pET-28a.** Ekspresję białka dzikiego typu DhaA oraz jego mutantów można przeprowadzić z użyciem szczepu *Escherichia coli* BL21(DE3) oraz wektora ekspresyjnego pET-28a, co umożliwia wysoką wydajność i kontrolowaną ekspresję białka [studier1990use].

### 1. Szczep *Escherichia coli* BL21(DE3)

- 1) **Genotyp:** BL21(DE3) zawiera insercję *T7 RNA polymerase* pod kontrolą promotora *lacUV5*, co pozwala na kontrolowaną ekspresję genów umieszczonych za promotorem *T7* na plazmidach pET [de1997engineering].
- 2) **Indukcja ekspresji:** Ekspresję można indukować za pomocą IPTG (izopropyl--D-tiogalaktopiranozydu), który odblokowuje promotor *T7*, inicjując produkcję białka [novagen1995].
- 3) **Zastosowania:** Dzięki niskiemu poziomowi proteaz oraz wysokiej wydajności translacji BL21(DE3) jest szeroko stosowany do ekspresji rekombinowanych białek w warunkach laboratoryjnych.

### 2. Wektor pET-28a dla ekspresji białka DhaA i jego mutantów

- 1) **Promotor T7:** pET-28a posiada promotor T7, który jest specyficznie aktywowany przez polimerazę T7, umożliwiając precyzyjną i wysoką ekspresję białka w szczepach zawierających *T7 RNA polymerase* (jak BL21(DE3)) [studier1990use].
- 2) **Znacznik His-tag:** pET-28a umożliwia fuzję białka z heksamerycznym znacznikiem histydynowym (His-tag) na końcu N- lub C-terminalnym, co ułatwia oczyszczanie białka za pomocą chromatografii na kolumnie niklowej [petersen1994purification].
- 3) **Miejsce MCS (Multiple Cloning Site):** Plazmid pET-28a posiada miejsce MCS, które umożliwia łatwe wstawienie genu kodującego DhaA lub jego mutanty.
- 4) **Selekcja antybiotykowa:** pET-28a zawiera gen oporności na kanamycynę, co ułatwia selekcję kolonii *E. coli* z plazmidem [novagen1995].

### 3. Procedura klonowania i ekspresji

- 1) **Klonowanie genu:** Gen kodujący białko DhaA (dzikie lub zmutowane) zostaje wstawiony do wektora pET-28a przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych i ligazy.
- 2) **Transformacja:** Zrekombinowany plazmid jest transformowany do szczepu *E. coli* BL21(DE3) za pomocą elektroporacji lub chemicznie kompetentnych komórek [sambrook1989molecular].
- 3) **Indukcja ekspresji:** Po uzyskaniu transformantów hodowlę wprowadza się do środowiska z IPTG, co indukuje ekspresję genu pod promotorem T7.
- 4) **Oczyszczanie białka:** Białko można łatwo oczyścić dzięki obecności znacznika His-tag za pomocą chromatografii afinacyjnej na kolumnie niklowej [petersen1994purification].

## Szczegółowy opis sekwencji w plazmidzie pET28a(+)

**1. Promotor T7**

- 1) Promotor T7 jest miejscem inicjacji transkrypcji przez polimerazę RNA T7, umożliwiając wysokopoziomową ekspresję genów.
- 2) **Lokalizacja:** complement(368..386) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

- 4) Szczegóły procesu transkrypcji:

- a. Ponieważ promotor T7 znajduje się na nici antysensownej (-), nie ta pełni funkcję matrycy dla procesu transkrypcji.
- b. Polimeraza RNA T7 odczytuje sekwencję tej nici matrycowej (antysensownej) w kierunku 3' → 5'.
- c. W wyniku transkrypcji syntetyzowane mRNA jest komplementarne do nici antysensownej i powstaje w kierunku 5' → 3'.
- d. Sekwencja mRNA jest identyczna (z wyjątkiem zamiany tyminy na uracyl) z nicią sensowną (+), która koduje białko.

- 5) **Inne promotory i miejsca inicjacji transkrypcji:**

5'	*	3'
T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	
T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGGAGA	
K11	AATTAGGGCACACTATAGGGAGA	
SP6	ATTTACGACACACTATAGAAGAA	
	bind-----	
	-----init	

**2. Operator lac**

- 1) Operator *lac* jest miejscem wiązania represora LacI, co hamuje transkrypcję w nieobecności induktora [Lewis2005].
- 2) **Lokalizacja:** complement(343..367) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5'-AATTGTGAGCGGATAACAATT-3'

**3. Miejsce wiązania rybosomu (RBS)**

- 1) RBS jest sekwencją umożliwiającą wiązanie rybosomu i inicjację translacji.
- 2) **Lokalizacja:** complement(306..328) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5'-AGGAGATATACAT-3'

**4. Miejsce startu translacji**

- 1) Kodon start (ATG) inicjuje translację białka.

2) **Lokalizacja:** complement(289) (na nici antysensownej, (-))

3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5' -ATG-3'

#### 5. Znaczniki His<sub>6</sub>-tag (sześciokrotny histydynowy tag)

1) Znacznik His<sub>6</sub> umożliwia oczyszczanie białka za pomocą chromatografii na kolumnie niklowej [Hochuli1988].

2) **Lokalizacje:**

- complement(140..157) (N-końcowy, (-))
- complement(270..287) (C-końcowy, (-))

3) **Sekwencja aminokwasowa:** HHHHHH

#### 6. Miejsce cięcia trombiny

1) Umożliwia specyficzne usunięcie znacznika His<sub>6</sub> przez enzym trombinę.

2) **Lokalizacja:** complement(243..260) (na nici antysensownej, (-))

3) **Sekwencja aminokwasowa:** LVPRGS

4) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5' -CTGGTGCCGCGCGCAGC-3'

#### 7. Region terminacji T7

1) Sekwencja terminacyjna zapewnia zakończenie transkrypcji przez polimerazę RNA T7 [Studier1990].

2) **Lokalizacja:** complement(26..73) (na nici antysensownej, (-))

3) **Sekwencja DNA (5' → 3'):**

5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

#### 8. Gen oporności na kanamycynę (Kan<sup>R</sup>)

1) Koduje aminoglikozydową fosfotransferazę, zapewniając oporność na kanamycynę [Reynolds1986].

2) **Lokalizacja:** 3995..4807 (na nici sensownej, (+))

3) **Sekwencja aminokwasowa:** MSHIQRETSCSRPRLNSNMDADLYGYKWARDNVGQSGATIYRLYGKPDAPFLKHGKGSVA...

#### 9. Region inicjacji replikacji (*ori*)

1) Region *ori* typu ColE1/pMB1/pBR322/pUC odpowiedzialny za replikację plazmidu [Sutcliffe1978].

2) **Lokalizacja:** complement(3285..3873) (na nici antysensownej, (-))

#### 10. Gen *lacI*

1) Koduje represor LacI, hamujący ekspresję genów pod kontrolą operatora *lac* [Lewis2005].

2) **Lokalizacja:** 773..1852 (na nici sensownej, (+))

3) **Sekwencja aminokwasowa:** VKPVTLYDVAEYAGVSYQTVSRVVNQASHVSAKTREKVEAAMAEL...



### 11. Gen *rop*

- 1) Koduje białko Rop, stabilizujące liczbę kopii plazmidu [Cesareni1982].
- 2) **Lokalizacja:** 2664..2852 (na nici sensownej, (+))
- 3) **Sekwencja aminokwasowa:**

VTKQEK TALNMARFIRSQTLTLLEKLNELDADEQADICESLHDADELYRSCLARFGDDGENL

### 12. Miejsce MCS (Multiple Cloning Site)

- 1) MCS zawiera wiele unikalnych miejsc cięcia dla enzymów restrykcyjnych, umożliwiając klonowanie genu *dhaA*.
- 2) **Lokalizacja:** Obejmuje region około complement (140..300) (na nici antysensownej, (-))
- 3) **Enzymy restrykcyjne i ich miejsca cięcia:**
  - **NcoI:** CCATGG
  - **EcoRI:** GAATTC
  - **HindIII:** AAGCTT
  - **BamHI:** GGATCC
- 4) **Sekwencje DNA w MCS (5' → 3'):**

5'-GGTACCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCC-3'

#### Wyjaśnienie orientacji nici:

W plazmidzie pET-28a promotor T7 jest zlokalizowany na nici antysensownej ((-)), co oznacza, że transkrypcja zachodzi w kierunku przeciwnym do sekwencji podanej w GenBanku. W praktyce oznacza to, że gen wstawiany do MCS powinien być w orientacji zgodnej z nicią sensowną ((+)), aby mRNA było poprawnie syntetyzowane.

Geny *lacI* i *rop* są zlokalizowane na nici sensownej ((+)), co jest typowe dla ich funkcji w regulacji ekspresji i replikacji plazmidu. Różnice w orientacji wynikają z konstrukcji plazmidu i funkcji poszczególnych elementów genetycznych.

#### Kolejne kroki:

Dzięki powyższym informacjom możemy zaprojektować wstawienie genu dehalogenazy haloalkanowej (*dhaA*) do plazmidu pET-28a, korzystając z odpowiednich miejsc restrykcyjnych w MCS i upewniając się, że gen jest wstawiony w poprawnej orientacji.

**Nić kodująca, nić matrycowa oraz indeksowanie w plazmidzie pET-28a: Przykład dla genu kanamycyny i regionu ekspresyjnego****1. Nić kodująca (+) i nić matrycowa (-)****1) Nić kodująca** (positive strand, +):

- a. Nić kodująca to ta, której sekwencja odpowiada mRNA (z uracyłem zamiast tyminy), dlatego jest określana jako nić +.
- b. W pET-28a pozycje nukleotydów są indeksowane względem tej nici, co umożliwia jednoznaczne określenie pozycji elementów na mapie plazmidu.
- c. Przykład: Gen kanamycyny (*KanR*), który jest skierowany na nici - (od 3' do 5' względem nici +), posiada pozycje opisane w odniesieniu do nici +.

**2) Nić matrycowa** (negative strand, -):

- a. Nić matrycowa jest komplementarna do nici kodującej i służy jako matryca podczas transkrypcji, umożliwiając syntezę mRNA.
- b. W przypadku genu na nici -, transkrypcja będzie przebiegać od wyższej do niższej pozycji (np. od pozycji 4807 do 3995 dla genu *KanR*), zachowując jednak kierunek od 5' do 3' na mRNA.

**2. Orientacja genów w plazmidzie pET-28a i przykład dla regionu ekspresyjnego**

- 1) W plazmidzie pET-28a, geny w regionie ekspresyjnym pod kontrolą promotora T7 są skierowane na nici +. Oznacza to, że polimeraza T7 będzie wiązać się z nicią + i syntetyzować mRNA komplementarne do nici matrycowej (-).
- 2) Geny kontrolowane przez promotor T7 (w regionie MCS) będą zatem transkrybowane w kierunku od 5' do 3' na nici +.
- 3) Przykład: Jeśli gen docelowy zostanie wstawiony między 100 a 200, będzie transkrybowany w kierunku od 5' (100) do 3' (200) na nici +.

**3. Podsumowanie: Indeksowanie i orientacja w pET-28a**

- 1) W plazmidzie pET-28a wszystkie pozycje nukleotydowe są indeksowane względem nici +, nawet jeśli dany gen znajduje się na nici -.
- 2) Transkrypcja dla genów na nici - (np. *KanR*) przebiega od wyższego do niższego indeksu, podczas gdy dla genów na nici + (np. w regionie MCS) transkrypcja przebiega od niższego do wyższego indeksu.
- 3) W ten sposób orientacja promotora oraz przypisanie nici kodującej/matrycowej wpływa na kierunek transkrypcji, ale zawsze odnosi się do ustalonego indeksowania względem nici +.