

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Vojtěch Kafka

Regulace mykobakteriální transkripce
Regulation of mycobacterial transcription

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2020

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Biology

Branch of study: Microbiology



Bc. Vojtěch Kafka

Regulation of mycobacterial transcription
Regulace mykobakteriální transkripce

DIPLOMA THESIS

Supervisor: Mgr. Libor Krásný, Ph.D

Prague, 2020

ABSTRAKT

RNA polymeráza (RNAP) je enzym katalyzující syntézu RNA řetězce a uplatňuje se jako hlavní enzym transkripce. RNAP u mykobakterií je odlišná od ostatních bakteriálních RNA polymeráz. Pro svoji funkci vyžaduje speciální transkripční faktory, jako jsou RbpA nebo CarD. Zároveň se na mykobakteriální RNA polymerázu váže malá RNA (sRNA) Ms1, která reguluje množství polymerázy v buňce.

V naší laboratoři byl také objeven protein MoaB2 jako nový vazebný partner interagující s mykobakteriální σ^A (gen *sigA*), podjednotkou RNAP, významnou pro rozpoznání počáteční sekvence promotoru a iniciaci transkripce. Funkce MoaB2 v regulaci transkripce a genové exprese je doposud neznámá.

Prvním cílem této diplomové práce je přispět k objasnění mechanismu, jakým Ms1 reguluje množství RNAP. Výsledky ukázaly, že tato regulace je na úrovni transkripce a to na úrovni ovlivnění aktivity promotorů řídících expresi *rpoB-rpoC*, které kódují katalytické podjednotky RNAP.

Druhým cílem této práce je charakterizovat interakce MoaB2 s proteiny transkripčního aparátu. Výsledky potvrdily interakci MoaB2 se σ^A a k této interakci není potřebná ani RNAP ani transkripční faktory RbpA a CarD. Role N-terminální domény σ^A pro interakci s MoaB2 nebyla prozatím potvrzena.

Shrnutě, tato práce významně přispívá k našemu pochopení mykobakteriálního transkripčního aparátu.

Klíčová slova:

RNA polymeráza, mykobakterie, Ms1, regulace transkripce, MoaB2, 6S RNA

ABSTRACT

RNA polymerase (RNAP) is the enzyme that catalyzes synthesis of RNA. Mycobacterial RNAP significantly differs from RNAPs from other bacterial species. It requires special transcription factors such as RbpA or CarD. Another difference is the presence of a small RNA (sRNA), Ms1, that binds to mycobacterial RNAP. Ms1 regulates the amount of RNAP in the cell.

In our laboratory we recently discovered MoaB2, a new binding partner of mycobacterial σ^A (encoded by *sigA*), an RNAP subunit, which is essential for recognition of the initial promoter sequence and initiation of transcription. The function of MoaB2 in the regulation of transcription and gene expression is still unknown.

The first aim of this Thesis is contribute to elucidation of the mechanism by which Ms1 affects the amount of RNAP. The experiments revealed that this regulation occurs at the level of transcription; Ms1 affects the activity of promoter(s) that drive the transcription of *rpoB-rpoC* that encode the two catalytic subunits of RNAP.

The second aim of this Thesis is to characterize the interactions of MoaB2 with protein of the transcription apparatus. The results confirmed the interaction of MoaB2 with σ^A and showed that neither RNAP nor transcription factors RbpA and CarD are required for this interaction. Finally, a role of the N-terminal domain of σ^A for the interaction with MoaB2 was not proven.

In summary, this work significantly contributes to our understanding of the mycobacterial transcription machinery.

Keywords:

RNA polymerase, mycobacteria, Ms1, transcription regulation, MoaB2, 6S RNA

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. srpna 2020

Bc. Vojtěch Kafka

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Liborovi Krásnému, Ph.D. za jeho odborné vedení, ochotu, vstřícnost při konzultacích a zejména trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále chci poděkovat Mgr. Jarmile Hnilicové, Ph.D., Mgr. Viole Vaňkové Hausnerové, Ph.D. a zejména pak Ing. Michaele Šikové, za uvedení do experimentálního výzkumu, cenné rady a příjemnou a trpělivou spolupráci při zpracování projektu. Také děkuji všem ostatním členům Laboratoře mikrobiální genetiky a genové exprese za jejich všestrannou pomoc. V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu během celého studia.

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
SEZNAM ZKRATEK	1
ÚVOD	3
1 TRANSKRIPCE	5
1.1 RNA POLYMERÁZA (RNAP).....	5
1.1.1 Podjednotky RNA polymerázy.....	6
1.2 FAKTOR SIGMA.....	10
1.2.1 Přehled faktorů sigma u <i>M. tuberculosis</i>	11
1.2.2 Faktor σ^A u mykobakterií.....	12
1.3 PROMOTOR.....	15
1.3.1 Sekvence promotoru.....	16
1.3.2 Promotor mykobakterií.....	19
1.4 MECHANISMUS TRANSKRIPCE.....	20
1.4.1 Iniciace transkripce.....	21
1.4.2 Elongace transkripce.....	23
1.4.3 Terminace transkripce.....	24
2 REGULACE TRANSKRIPCE	27
2.1 TRANSKRIPČNÍ FAKTORY.....	28
2.1.1 Proteinové transkripční faktory.....	29
2.1.2 Neproteinové transkripční regulátory.....	33
3 6S RNA	37
4 MS1	40
MATERIÁL A METODIKA	44
4.1 PŘÍSTROJE.....	44
4.2 CHEMIKÁLIE A ENZYMY.....	45
4.3 BAKTERIÁLNÍ KMENY.....	48
4.4 PRIMERY.....	50
4.5 VEKTORY.....	51
4.5.1 Plazmid pSM128.....	51
4.5.2 Plazmid pTet INT.....	51
4.6 KULTIVACE BAKTERIÍ.....	52
4.6.1 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	52
4.6.2 <i>Escherichia coli</i>	54
4.7 MĚŘENÍ OPTICKÉ DENZITY.....	55
4.8 PŘÍPRAVA GLYCERINOVÝCH KONZERV.....	55
4.9 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	56
4.10 HORIZONTÁLNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	57
4.11 ŠTĚPENÍ PLAZMIDŮ.....	58
4.12 TA KLONOVÁNÍ.....	59
4.13 IZOLACE DNA Z AGARÓZOVÉHO GELU.....	60
4.14 ČIŠTĚNÍ NK PŘES QIAGEN KOLONU.....	61
4.15 LIGACE.....	62
4.16 TRANSFORMACE DO BUNĚK <i>E. COLI</i>	63
4.17 IZOLACE DNA METODOU MINIPREP.....	64
4.18 RESTRIKČNÍ ANALÝZA.....	65
4.19 PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK <i>M. SMEGMATIS</i> MC ² 155.....	66
4.20 TRANSFORMACE DO BUNĚK <i>M. SMEGMATIS</i>	67
4.21 OPTIMALIZACE EXPRESE PRO SIGAC-FLAG A SIGA-FLAG.....	68
4.22 PRÁCE S PROTEINY.....	70

4.22.1	<i>Ko-Imunoprecipitace</i>	70
4.22.2	<i>Polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE)</i>	72
4.22.3	<i>SimplyBlue™ SafeStain barvení</i>	73
4.22.4	<i>Měření koncentrace proteinů</i>	74
4.22.5	<i>Western Blot</i>	75
4.22.6	<i>Rychlá amplifikace konců cDNA (RACE)</i>	78
4.22.7	<i>β-galaktosidázový test</i>	82
5	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	84
6	VÝSLEDKY	85
6.1	HLEDÁNÍ TRANSKRIPČNÍHO POČÁTKU MRNA RpoB-RPOC.....	85
6.2	PŘÍPRAVA BUNĚK <i>M. smegmatis</i> S INZERTY PROMOTORŮ GENU <i>RPOB</i>	86
6.3	TESTOVÁNÍ AKTIVITY PROMOTORŮ GENU <i>RPOB</i> V EXPONENCIÁLNÍ FÁZI RŮSTU.....	87
6.3.1	<i>Srovnání aktivity P_{rpoB} mezi kmeny <i>M. smegmatis</i> wt a ΔMsI</i>	87
6.3.2	<i>Efekt dvou Shine-Dalgarno sekvencí na aktivitu promotoru P_{rpoB}</i>	89
6.4	PŘÍPRAVA FLAG-ZNAČENÝCH PROTEINŮ.....	89
6.4.1	<i>Interakční partneři vybraných FLAG-značených proteinů u <i>M. smegmatis</i></i>	91
6.5	VÝSLEDEK OPTIMALIZACE EXPRESE MEZI SIGA-FLAG A SIGAC-FLAG.....	94
6.5.1	<i>Role N-terminální domény σ^A při interakci s <i>Moab2</i></i>	96
7	DISKUZE	97
8	ZÁVĚR	107
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	111

SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyselina
ATP	Adenosin-5'-trifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BL	linker transkripčního faktoru RbpA (<i>basic linker</i>)
bp	pár bazí (<i>base pairs</i>)
cAMP	Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CD	jádro transkripčního faktoru RbpA (<i>core domain</i>)
CarD	RNAP vazebný transkripční faktor
DBD	DNA-vazebná doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E	jádro RNAP
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
HK	enzym histidinová kináza
HYD	hydrolázová doména proteinu Rel _{MTB}
iNTP	iniciační nukleosid trifosfát
mRNA	mediátorová RNA
miRNA	mikro RNA
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
ncRNA	nekódující RNA (<i>non-coding RNA</i>)
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma)
NTP	Nukleosid 5'-trifosfát
NTT	N-terminální doména faktoru RbpA

OD	optická denzita
OH	hydroxylová skupina
ONPG	o-nitrofenyl-beta-D-galaktopyranosid
PAGE	Polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů
ppGpp	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
pppGpp	guanosin-5'-trifosfát-3'-difosfát
PNPáza	enzym polynukleotid fosforyláza
rRNA	ribozomální RNA
RBD	RNAP-vazebná doména
RbpA	RNAP-vazebný protein A
RID	N-terminální doména CarD
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza	enzym ribonukleáza
RNAP	holoenzym RNA polymerázy a faktoru σ
Rpc	uzavřený komplex transkripce
Rp _{itc}	iniciační komplex transkripce
Rp _o	otevřený komplex transkripce
RR	regulátor reakce
SDS	dodecylsírán sodný
SID	σ -interakční doména transkripčního faktoru RbpA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SYN	syntetázová doména proteinu Rel _{MTB}
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
tRNA	transferová RNA
wt	divoký kmen (<i>wild type</i>)

ÚVOD

Rod *Mycobacterium* tvoří více než 190 druhů, mezi něž řadíme původce vážných lidských onemocnění, včetně tuberkulózy způsobené *Mycobacterium tuberculosis* a malomocenství způsobené *Mycobacterium leprae*. Vysoký podíl lipidů a kyseliny mykolové v buněčné stěně mykobakterií způsobuje neúčinnost mnoha antibiotik působících na její syntézu. Rifampicin a isoniazid jsou dva nejúčinnější preparáty používané pro léčbu tuberkulózy. Rifampicin inhibuje bakteriální DNA-dependentní RNAP. Nárůst počtu rifampicin-rezistentních bakterií, představuje vážnou komplikaci při terapii tuberkulózy. Proto je vytvářeno úsilí pro identifikaci dalších inhibitorů založených na interakci s RNAP. Lepší pochopení mykobakteriálního transkripčního aparátu umožní doplnit informace potřebné pro výzkum nových, účinných antimykobakteriálních látek.

Základním předpokladem pro přežití mikroorganismů je schopnost adaptovat se na změnu prostředí, způsobenou např. nedostatkem živin, změnou teploty, buněčnou denzitou atd. Tato adaptace je závislá na změnách v genové expresi. Schopnost rychlé buněčné regulace je umožněna mimo jiné také díky nekódujícím RNA (sRNA) o délce 50 – 300 nt.

Jako první nekódující sRNA byla historicky objevena 6S RNA, která se váže na holoenzym RNAP (s navázaným faktorem sigma). Později byly homology 6S RNA identifikovány ve většině bakteriálních genomů, ale nikoli u mykobakterií. V případě *Mycobacterium smegmatis* byla však prokázána jiná nekódující sRNA – Ms1. Ms1 (délka ~300 nt) je vysoce abundantní během stacionární fáze růstu, kdy se váže na jádro RNAP, v čemž se liší od 6S RNA, která se váže na holoenzym obsahující σ^A .

Nedávno byl také objeven nový protein interagující s primárním faktorem sigma - σ^A (kódován *sigA*), podjednotkou RNAP. Protein MoaB2 (velikost 18 kDa) je přítomen a konzervován u všech druhů mykobakterií, včetně *M. tuberculosis* a *M. leprae*.

V této diplomové práci přispívám k objasnění: *i)* mechanismu regulace množství RNAP navázáním malé nekódující RNA Ms1, *ii)* charakterizují nově objevený protein MoaB2. Zjišťuji, zda MoaB2 vyžaduje N-terminální doménu pro interakci s mykobakteriální σ^A a zda v tomto procesu hrají roli esenciální transkripční faktory CarD a RbpA.

1 TRANSKRIPCE

Transkripce je enzymatický proces, při kterém dochází k přepisu genetické informace z DNA do molekuly RNA. U bakterií je tento proces zajišťován pomocí jediného druhu RNA polymerázy. Transkripční získané molekuly RNA jsou nezbytné pro zahájení proteosyntézy. Samotný proces transkripce probíhá ve třech krocích: iniciace, elongace a terminace.

1.1 RNA polymeráza (RNAP)

Bakterie jsou vybaveny pouze jednou formou DNA-dependentní RNA polymerázy (RNAP). RNAP byla poprvé objevena a izolována v letech 1955 – 1961 (Hurwitz, 2005). Jádro tohoto proteinového komplexu je složeno z 5 polypeptidových podjednotek ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , β' a ω) o celkové molekulové hmotnosti 400 kDa. Toto jádro enzymu RNAP (E) není schopné samo o sobě rozpoznat promotor. Proto dochází k interakci mezi RNAP (E) a podjednotkou σ a vzniklý komplex se označuje jako RNAP holoenzym. Tento komplex umožní rozpoznat specifickou promotorovou sekvenci, navázat se a zahájit transkripci (Murakami, 2015).

Katalytické centrum RNAP je u bakterií vysoce konzervované. Homology nacházíme také u eukaryot a archeí. Komplexy RNAP jsou u eukaryotních organismů tvořeny 12 a více podjednotkami s molekulovou hmotností více než 500 kDa (Cramer *et al.*, 2001; Vassylyev, 2009).

RNAP má strukturu krabího klepete (Murakami, 2015). Tato struktura je vytvářena mechanismem *self-assembly* (samouspořádávání). Základem je dimer podjednotek α , který představuje lešení. Na podjednotky α se vážou katalytické podjednotky β a β' , přičemž každá vytváří jedno rameno klepete. Klepeta svým uspořádáním formují hlavní kanál široký v průměru 27 Å (2,7 nm). Na zadní stěně hlavního kanálu se nachází aktivní místo enzymu. V aktivním centru RNAP nacházíme také dva ionty Mg^{2+} . Jeden z nich se váže na volnou formu nukleosid 5'-trifosfátu (NTP) a uplatňuje se při tvorbě kovalentních vazeb. Druhý iont Mg^{2+} má vliv na odštěpení pyrofosfátu (Gnatt *et al.*, 2001). Podjednotka ω se uplatňuje při vazbě podjednotky β'

na $\alpha_2\beta$ a za zvýšené teploty chrání RNAP před denaturací. Pro bakteriální buňku však není podjednotka ω esenciální. (Periago *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2003)

Kromě hlavního kanálu nacházíme na RNAP také sekundární kanál a RNA *exit* kanál. Sekundárním kanálem vnikají do aktivního místa iniciační nukleosid trifosfáty (iNTP) nutné pro syntézu RNA (Zhang *et al.*, 2015). Tento kanál prochází skrz celou molekulu RNAP a od DNA vazebného kanálu je oddělen mostovým helixem (*bridge helix*) a spouštěcí smyčkou (*trigger loop*, Epshtein *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). RNA *exit* kanál je od hlavního kanálu oddělen víčkem. Výstupním RNA kanálem odchází přeepsaná RNA. Víčko RNAP se pravděpodobně podílí na rozpletení DNA:RNA hybridní molekuly a tak na udržení její stálé délky (Gnatt *et al.*, 2001; Vassylyev *et al.*, 2007).

1.1.1 Podjednotky RNA polymerázy

První 3D struktura RNAP bakterií byla získána z *Thermus aquaticus*. Krystalická struktura RNAP byla později získána u *E. coli*, *M. smegmatis* a *M. tuberculosis* (Vassylyev *et al.*, 2002; Murakami, 2013; Kouba *et al.*, 2018; Boyaci *et al.*, 2018).

Podjednotka α vytváří homodimer v jádře RNAP. Její molekulová hmotnost je 36 kDa (složena přibližně z 329 AMK); (Burgess *et al.*, 1969). Rozděluje se na dvě domény propojené linkerem. N-koncová doména je zodpovědná za dimerizaci monomerů a zajišťuje vazbu s podjednotkami β a β' (Hayward *et al.*, 1991; Gourse *et al.*, 2000). C-koncová doména se účastní rozpoznání a vazby na promotor. Některé promotory tvořené AT bohatou oblastí, nazývanou *upstream element*, interagují s C-terminální doménou a podílejí se na iniciaci transkripce (Ross *et al.*, 2001). Obě podjednotky α jsou kódovány genem *rpoA* a sekvenčně jsou totožné. Vzájemně se však liší interakcí s podjednotkami β (Minakhin *et al.*, 2001).

Podjednotka β má přibližnou molekulovou hmotnost 150 kDa, podjednotka β' 155 kDa (podjednotka β je složena z 1342 AMK, podjednotka β' z 1407 AMK). Obě podjednotky jsou kódovány geny *rpoB* a *rpoC* a jsou cílovým místem účinku některých antibiotik (např. rifampicin); (Gentry *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Morse *et al.*, 2002).

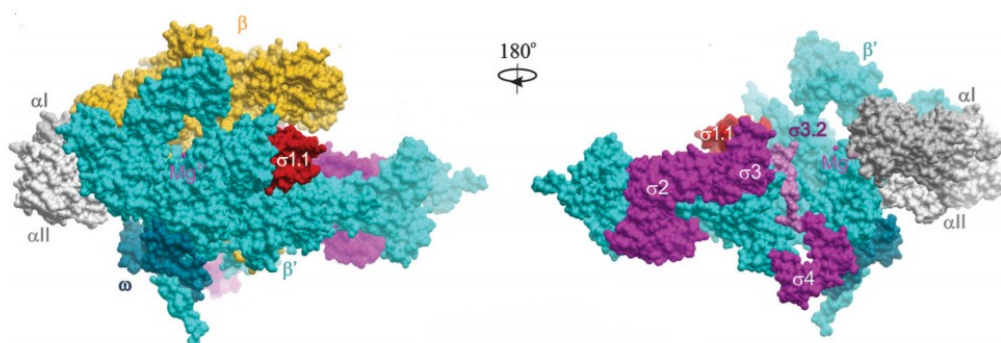
Podjednotka ω s molekulovou hmotností 10 kDa (složená přibližně z 90 AMK) je nejmenší podjednotkou RNAP. Pro bakteriální buňku není tato podjednotka esenciální a transkripce může probíhat i bez její přítomnosti. Je kódována genem *rpoZ*. Tento gen je ve stejném operonu jako gen *spoT*, který kóduje enzym SpoT. Enzym SpoT se může zapojovat do syntézy alarmonu ppGpp i jeho hydrolýzy (Vrentas *et al.*, 2005; Gunnelius *et al.*, 2014). Podjednotka ω se podílí na stringentní odpovědi buňky. Bylo zjištěno, že podjednotka ω je u *E. coli* důležitá pro navázání alarmonu ppGpp na RNAP *in vitro*. Interakcí alarmonu ppGpp s RNAP dochází k zvýšenému rozpadu otevřených komplexů a tím k inhibici iniciace transkripce (Ross *et al.*, 2013). Mimo jiné podjednotka ω chrání RNAP před denaturací za zvýšené teploty a pomáhá RNAP se adaptovat na stres, zejména pak během stacionární fáze růstu. Chrání podjednotku β' a napomáhá jejímu správnému složení při navazování na podjednotku $\alpha 2$ (Ghosh *et al.*, 2003). I přesto, že není tato podjednotka esenciální pro bakteriální transkripci, v poslední době se zjišťuje, že u *M. tuberculosis* je nepostradatelná pro správné složení jádra RNAP (Mao *et al.*, 2018).

Podjednotka σ je esenciální podjednotkou, v případě bakteriální buňky nezbytnou k vytvoření holoenzymu RNAP a rozpoznání specifické promotorové sekvence při iniciaci transkripce. Volná podjednotka σ , která nevytváří holoenzym RNAP je autoinhibována přítomností anti-sigma faktorů (Paget *et al.*, 2015). Transkripčním faktorům a jejich regulaci se věnuji v kapitole: 2.1

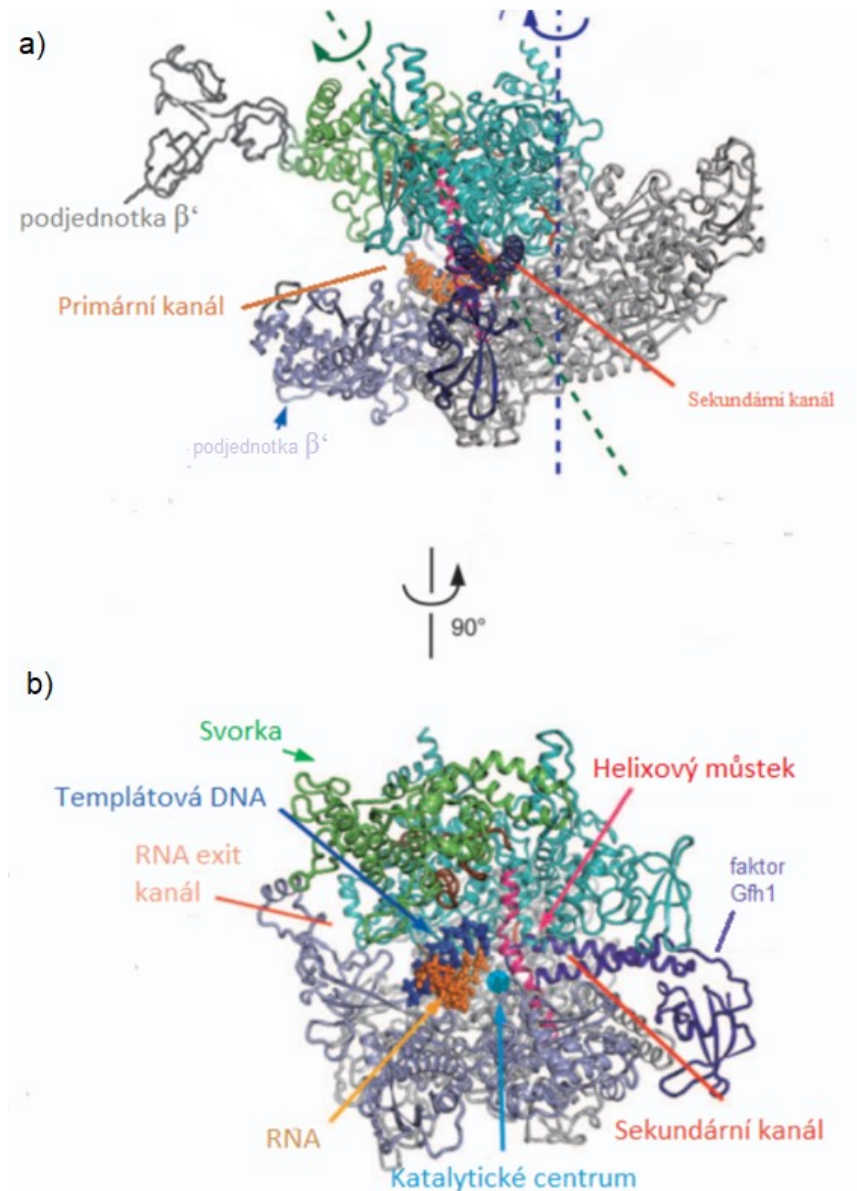
Transkripční faktory

Existuje velký počet druhů podjednotek σ . Jejich počet a zastoupení se liší u jednotlivých bakterií (Paget *et. al.*, 2015). Rozdílná genová exprese faktorů sigma závisí na různých existenčních podmínkách buňky. U *M. tuberculosis* je kódováno celkem 13 faktorů σ . Primární faktor σ^A je esenciální pro růst buněk u všech mykobakterií (Sachdeva *et al.*, 2010). Podrobnosti o faktoru σ^A uvádím v kapitole:

1.2.2 Faktor σ^A u mykobakterií



Obrázek 1 Struktura RNAP holoenzymu: Molekulární struktura RNAP holoenzymu s navázaným σ^A u *T. thermophilus*. Šedou a bílou barvou jsou znázorněny podjednotky α RNAP. Žlutou barvou podjednotka β a modrou barvou β' . Tmavě modře pak podjednotka ω . Světle fialovou barvou je znázorněna přítomnost Mg^{2+} iontu. Červená barva znázorňuje doménu 1.1 σ^{70} (modelována podle struktury holoenzymu *E. coli*). Otočením o 180° je světle fialovou barvou znázorněna oblast σ 3.2 a tmavě fialovou další domény faktoru σ , obklopující RNA exit kanál. Převzato a upraveno z: (Jookyung a Borukhov, 2016).



Obrázek 2: Elongační komplex RNAP u *T. thermophilus*: Schematické znázornění RNAP u *T. thermophilus* s navázaným faktorem Gfh1 (proteinový inhibitor transkripce). **A)** Primární a sekundární kanál RNAP je znázorněn oranžově, podjednotky β a β' světle fialově a šedě **B)** Po otočení strukturu o 90° kolem svislé osy pozorujeme: tmavě modře znázorněnou templátovou DNA, světle oranžově – RNA, červeně – helixový můstek, katalytické centrum RNAP je znázorněno světle modře, svorka-zeleně a transkripční inhibitor Gfh1 fialově. Převzato a upraveno z: (Tagami *et al.*, 2011).

Kromě hlavních podjednotek, které jsou u bakterií vysoce konzervované pro všechny druhy, se u některých druhů setkáváme i s jinými podjednotkami. U některých gram-pozitivních bakterií nacházíme navíc podjednotku δ (kódovaná genem *rpoE*) nebo podjednotku ε (kódovaná genem *rpoY*).

Podjednotka δ se uplatňuje při regulaci iniciace transkripce. Mění afinitu RNAP vůči koncentraci iNTP (Rabatinová *et al.*, 2013).

Funkce podjednotky ε není doposud prozkoumána. Předpokládá se, že by mohla plnit úlohu v ochraně podjednotky β' před inhibiční vazbou některých bakteriofágových proteinů (Keller *et al.*, 2014; Weiss a Shaw 2015).

1.2 Faktor sigma

Přítomnost faktorů σ je esenciální pro vytvoření holoenzymu RNAP a rozpoznání specifické promotorové sekvence. Faktory sigma se podílí na tvorbě uzavřených komplexů, svou přítomností stabilizují otevřený komplex, interagují s transkripčními aktivátory a v počáteční fázi transkripce stimuluje tvorbu nového vlákna RNA a ovlivňují *promotor escape* (Paget *et al.*, 2015). Elongační fáze transkripce je zahájena disociací faktoru σ z RNAP. Nové studie však ukazují, že primární faktor σ je schopný se připojit k elongačnímu komplexu i v průběhu elongace a ovlivnit transkripci (Goldman S. R. *et al.*, 2015).

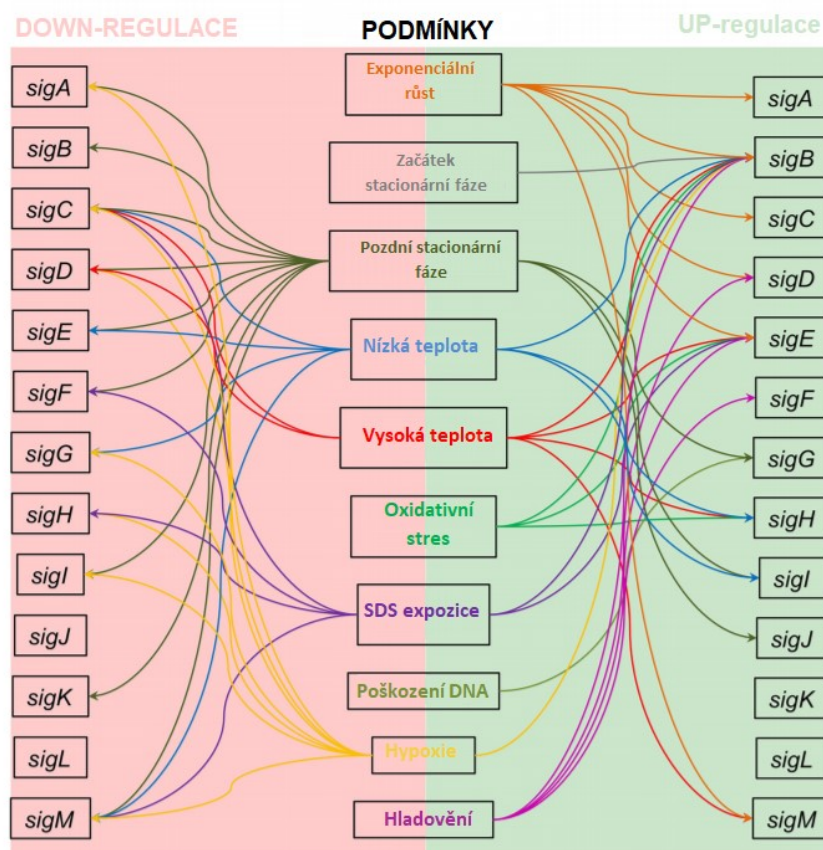
Faktory σ rozdělujeme do dvou rodin. První rodinou jsou faktory sigma 70 (σ^{70}), pojmenované podle 70 kDa velkého primárního faktoru z *E. coli*. Druhou rodinu tvoří faktory sigma 54 (σ^{54}), které jsou pojmenovány podle 54 kDa velkého nitrogen regulačního faktoru z *E. coli*. Obě rodiny se mezi sebou strukturně liší a pro tvorbu otevřených komplexů využívají odlišné mechanismy (Sachdeva *et al.*, 2010).

Nejpočetnější skupinu faktorů sigma řadíme do rodiny faktorů σ^{70} . Tato rodina je zodpovědná za rozpoznání většiny promotorových sekvencí. Faktory σ^{70} jsou složeny ze čtyř konzervovaných oblastí (označované jako oblast: 1, 2, 3 a 4). Do první třídy řadíme esenciální *housekeeping* faktory σ , které jsou složeny ze všech čtyř konzervovaných domén. Druhou třídu tvoří neesenciální faktory, které postrádají doménu 1.1. Třetí třídu zastupují faktory σ , které mají konzervovanou oblast 2 – 4. Čtvrtou třídou jsou faktory σ (někdy označované jako extracytoplazmatické faktory σ), které jsou tvořeny pouze doménou 2 a 4 a jsou zodpovědné za regulaci genů, které reagují na signály z extracytoplazmatického prostředí (Lin *et al.*, 2019).

Druhou skupinu faktorů sigma tvoří faktor σ^{54} , k jehož expresi dochází, pokud bakterie rostou při nízké koncentraci dusíku. Tento faktor nevykazuje žádnou sekvenční podobnost s faktorem σ^{70} . Na rozdíl od faktoru σ^{70} potřebuje pro navázání na RNAP přítomnost aktivátoru Crl, který díky své specificky konzervované sekvenci umožní vytvoření otevřeného komplexu (Browning a Busby, 2004). U bakterií bohatých na G+C báze, gram-pozitivních bakterií a cyanobakterií však nejsou známi zástupci z rodiny σ^{54} (Sachdeva *et al.*, 2010).

1.2.1 Přehled faktorů sigma u *M. tuberculosis*

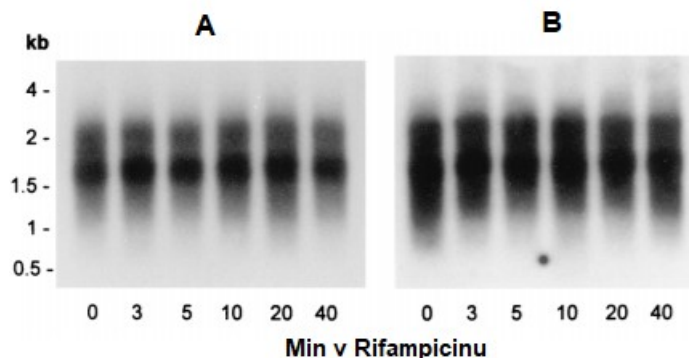
M. tuberculosis kóduje celkem 13 faktorů σ . Faktory σ^A , σ^B a σ^F řadíme do třídy 1,2 a 3 z rodiny faktorů σ^{70} . Zbývající 10 faktorů σ řadíme do čtvrté třídy. Alternativní faktory sigma zprostředkovávají reakce na nedostatek živin, teplotní stres, oxidační stres, povrchové napětí atd. a výrazně ovlivňují schopnost virulence. Jedná se zejména o faktory σ^C , σ^D , σ^E , σ^G , σ^H , σ^M atd. (Lin *et al.*, 2019). Aktivaci jednotlivých faktorů za různých růstových podmínek uvádím na **Obrázku 3**.



Obrázek 3: Účast faktorů σ při regulaci růstových podmínek u *M. tuberculosis*: Schéma uvádí přehled faktorů sigma, které se zapojují do regulace genové exprese u *M. tuberculosis* při různých růstových podmínkách: exponenciální a stacionární fáze růstu, reakce na mírný šok nebo tepelný šok při teplotě 45 °C, oxidační stres, expozice SDS (dodecylsíránem sodným), poškození molekuly DNA, hypoxii a hladovění buňky. Faktory σ , které byly za různých podmínek *up*-regulovány, se nachází na pravé straně schématu, naopak *down*-regulované na levé straně. Pokud se stresovými podmínkami není spojen některý z faktorů sigma, znamená to, že jeho exprese se za těchto podmínek nezměnila nebo nebyla doposud studována. Upraveno a převzato z: (Flentie *et al.*, 2016).

1.2.2 Faktor σ^A u mykobakterií

Primární faktor σ^A je esenciální pro buněčný růst. Tento faktor je kódován genem *sigA*. K jeho expresi dochází během všech fází růstu. Hu a Coates měřili stabilitu transkriptů *sigA* (**Obrázek 4**) a dospěli k závěru, že *sigA* mRNA je při optimálních růstových podmínkách velmi stabilní, bez výrazného rozpadu i po 40 minutách od přidání rifampicinu (Hu a Coates, 1999). I za stresových podmínek si buňky udržují hladinu σ^A na konstantní úrovni. U *M. smegmatis* bylo během pozdní stacionární fáze pozorováno menší množství holoenzymu RNAP složeného z faktoru σ^A . Tento jev byl způsoben poklesem celkového množství σ^A v buňkách. Naopak v časně stacionární fázi nebyl tento pokles pozorován (Hnilicová *et al.*, 2014).



Obrázek 4: Poločas rozpadu *sigA* transkriptů: Ke stanovení poločasu rozpadu *sigA* transkriptů byla celková buněčná RNA izolována z kultur: **A** – exponenciální fáze růstu (4 dny) a **B** – stacionární fáze (40 dnů). Iniciace transkripce byla v různých časových intervalech (0, 3, 5, 10, 20 a 40 min) inhibována přidáním 100 $\mu\text{g/ml}$ rifampicinu a vzorky byly analyzovány metodou Northern blot. Bez ohledu na jednotlivé fáze růstu byl poločas rozpadu *sigA* mRNA velmi stabilní, bez výrazného rozpadu i po 40 minutách od přidání rifampicinu (Hu a Coates, 1999).

Faktor σ^A je složen ze čtyř domén, přičemž každá z nich se dále dělí na další subdomény. Subdoména 1.1 se označuje jako N-terminální. Faktor σ^A vykazuje sekvenční homologii s faktorem σ^B , až na ~150 aminokyselin dlouhou N-terminální doménu, která je u mykobakterií jedinečná (Hubin *et al.*, 2017). Sekvenčně se tato doména liší od *T. thermophilus*, *E. coli* i *B. subtilis*. U *B. subtilis* je N-terminální doména strukturně podobná doméně *E. coli* a obě se liší od této domény z *Thermotoga maritima* (Zachrdla *et al.*, 2017).

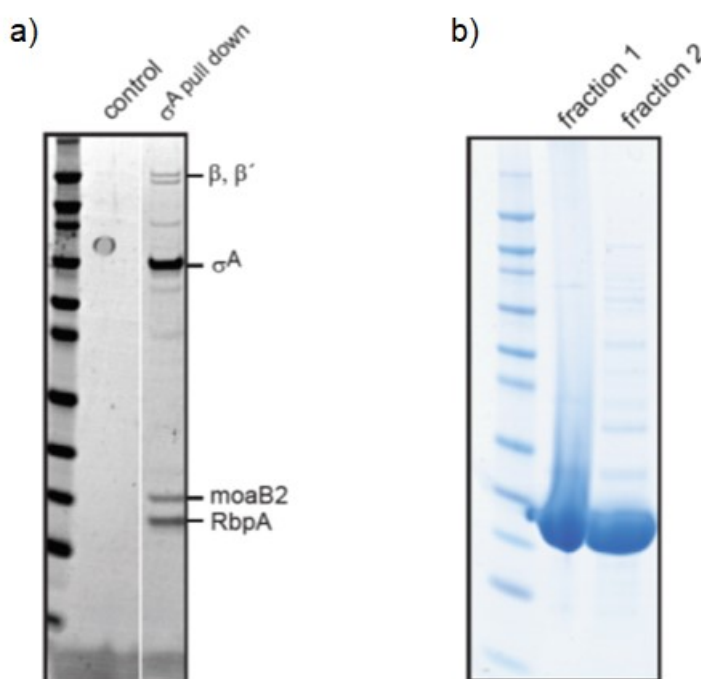
U *M. smegmatis* se N-terminální doména svou flexibilitou a rozložením náboje podobá podjednotce δ u *B. subtilis* (Motácková *et al.*, 2010). Při studiu struktury RNAP byla zjištěna přítomnost taxonomicky specifické inserce ~100 aminokyselin u podjednotky β -RNAP (Lane a Darst 2010). 3D struktura σ^A -N-terminální domény z *M. smegmatis* či jiné mykobakterie však není známa. Stejně tak funkce N-terminální domény nebyla doposud zjištěna. Předpokládá se, že se váže do DNA kanálu v holoenzymu RNAP a brání nespecifické iniciaci transkripce.

Další studie faktoru σ^A , provedené v naší laboratoři, objevily nového interakčního partnera – protein MoaB2 (nepublikovaná data). První předběžný experiment byl založen na použití protilátky namířené proti endogenní σ^A , druhý experiment pak na použití FLAG-značené σ^A . Pomocí imunoprecipitační metody byla získána σ^A u *M. smegmatis*. Pomocí metody SDS-PAGE byly jednotlivé proteiny rozděleny na

základě jejich molekulové hmotnosti a identifikovány hmotností spektrometrií (Obrázek 5a).

Vzhledem k tomu, že byl protein MoaB2 při prvních experimentech bez ohledu na přístup vždy stažen s faktorem σ^A , jedná se pravděpodobně o nového interakčního partnera σ^A a/nebo RNAP. Mimo to se podařilo purifikovat MoaB2 o konečné koncentraci $>1\text{mM}$. Díky tomu bude možné stanovit strukturu tohoto neznámého proteinu použitím metody nukleární magnetické rezonance (Obrázek 5b).

Přehled dosavadních znalostí o MoaB2 uvádím v následující kapitole.



Obrázek 5: Nový interakční partner MoaB2: (A) SDS-PAGE gel získaný imunoprecipitací FLAG-značené σ^A : RNAP (podjednotky β a β'), FLAG-značená σ^A , transkripční faktor RbpA a nový protein MoaB2. Jako kontrola byl použit kmen bez FLAG-značky (B) Purifikace nadexprimované MoaB2 u *M. smegmatis*: SDS-PAGE gel znázorňuje frakce purifikovaného proteinu MoaB2

1.2.2.1 MoaB2

MoaB2 je protein o velikosti 18 kDa. Na základě sekvenční homologie bylo zjištěno, že MoaB2 vykazuje podobnost s molybdopterin biosyntetickým proteinem (Bader *et al.*, 2004).

M. tuberculosis se musí adaptovat na podmínky hypoxie v hostitelském organismu. Molybdopterin tvoří komplexy s molybdenem, které jsou známé jako kofaktory

molybdenu. Redoxní vlastnosti těchto komplexů jsou využívány pro katalýzu redoxních reakcí při metabolismu dusíku, síry, uhlíku a anaerobní respiraci. (Williams *et al.*, 2011). Díky kofaktorům molybdenu může v infikované tkáni *M. tuberculosis* využívat dusičnany jako zdroj dusíku a energie.

U *E. coli* nacházíme celkem pět operonů, které se zapojují do biosyntézy kofaktorů molybdenu (*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog*). Operony *moa*, *mod*, *moe* jsou exprimovány konstitutivně a jejich transkripce je regulována faktory, jako je kyslík, molybden a další (Shi a Xie, 2011).

V mykobakteriálním genomu nacházíme homologní geny pro biosyntézu kofaktorů molybdenu, avšak jejich biochemická aktivita není doposud identifikována. Lokusy *moa* a *mod* jsou u mykobakterií společně uspořádány na chromozomu. Avšak lokusy pro ostatní geny v mykobakteriálních genomech jsou rozptýleny. Předpokládá se, že pro gen *moa* je u *M. tuberculosis* a *M. bovis* společný lokus, který pravděpodobně vytváří operon, protože geny *moaABCD* jsou společně ve shluku a uspořádání těchto genů je podobné jako u *E. coli* (Shi a Xie, 2011).

Enzymy s obsahem molybdenu se zapojují do syntézy biotinu. Acetyl-CoA je enzym, který se podílí na syntéze dlouhých řetězců mykolových kyselin (Shi a Xie, 2011). Mykolové kyseliny jsou dlouhé mastné kyseliny v buněčné stěně mykobakterií, které jsou jednou z příčin vysoké rezistence mykobakterií k antibiotikům a tedy důležitým faktorem virulence (Gygli *et al.*, 2017).

MoaB2 je přítomen a konzervován ve všech druzích mykobakterií, včetně *M. leprae* (Williams *et al.*, 2011). Interakce s primárním faktorem σ^A naznačuje novou, doposud neznámou funkci tohoto proteinu.

1.3 Promotor

Pro iniciaci transkripce je nutné, aby holoenzym RNAP rozpoznal specifickou promotorovu sekvenci. Jedná se o sekvenci DNA, která se nachází před genem proti směru transkripce. Promotor je složen z několika sekvenčních elementů: oblast -10 a -35 (číselné hodnoty vyjadřují počet nukleotidů od transkripčního počátku v oblasti +1), dále rozšířenou oblast -10, diskriminátor a UP element. Pro regulaci genové

exprese je důležitá různá afinita RNAP k různým sekvencím promotorů. Afinita RNAP k promotoru ovlivňuje, jaká bude celková aktivita promotoru příslušného genu. Avšak pokud dochází během transkripce k vytvoření nestabilního otevřeného komplexu, je iniciace transkripce závislá na koncentraci iNTP. Čím vyšší je koncentrace iNTP, tím větší je pravděpodobnost, že bude transkripce zahájena. Z toho vyplývá, že i přes vysokou afinitu mezi RNAP a promotorem, je nízká koncentrace iNTP limitující pro vytvoření stabilních komplexů a celková aktivita promotoru je tedy nízká (Browning a Busby, 2016).

1.3.1 Sekvence promotoru

Sekvence promotorů se může u různých bakterií lišit od konsensní sekvence. Jednotlivé sekvenční elementy popisují na modelovém organismu bakterie *E. coli*, u kterého byla zjištěna většina znalostí o transkripci.

1) Oblast -10

Je tvořena sekvencí 5'-TATAAT-3' v oblasti -12 a -7 proti směru transkripce. Oblast -10 se také nazývá jako TATA. Jedná se o AT bohatou oblast, která interaguje s doménou 2.3 a 2.4 podjednotky σ při iniciaci transkripce (Haugen *et al.*, 2008; Ruff *et al.*, 2015). Dochází zde k počátečnímu rozpletení DNA a tvorbě transkripční bubliny.

2) Mezerník (*spacer*)

Spacer odděluje oblast -10 a -35. Jeho délka je přibližně 17 – 19 pb (Ruff *et al.*, 2015). Počet nukleotidů je závislý na vzdálenosti mezi doménou 4 a doménou 2 faktoru σ (Murakami *et al.*, 2002)

3) Oblast -35

Je tvořena konsensus sekvencí 5'-TTGACA-3' v oblasti -35 a -30 proti směru transkripce. Interaguje s doménou 4.2 podjednotky σ . V této oblasti dochází k ohybu DNA přibližně o 36° (Haugen *et al.*, 2008; Zuo a Steitz, 2015)

Na promotoru popisujeme také další sekvenční elementy, které nejsou nezbytné k rozpoznání specifické promotorové sekvence a nevyskytují se u všech promotorů. Jejich přítomnost však ovlivňuje iniciaci transkripce.

4) Rozšířená oblast -10

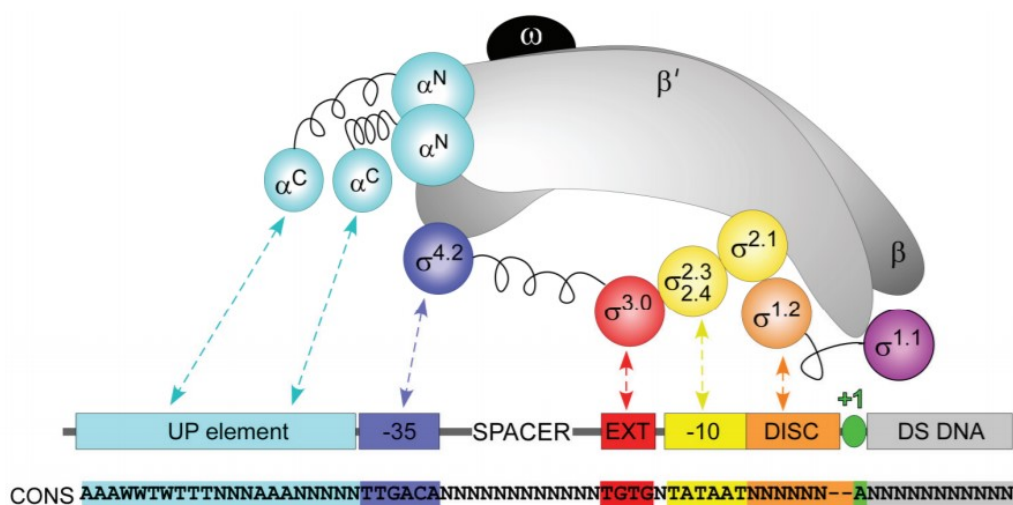
Je tvořena sekvencí 5'-TGX-3'. Tato 4 bp dlouhá oblast interaguje s doménou 3 podjednotky σ (Barne *et al.*, 1997; Dehaseth *et al.*, 1998). Rozšířená oblast -10 má pravděpodobně vliv na dobu existence otevřeného komplexu DNA a RNAP (Haugen *et al.*, 2006).

5) Diskriminátor (oblast -10 a +1)

Jedná se o G+C bohatou oblast v pozici -10 a +1. Dochází zde k interakci s doménou 1.2 podjednotky σ (Haugen *et al.*, 2008). Tato oblast má vliv na stabilitu (destabilizuje) otevřeného komplexu DNA a RNAP, zejména u ribozomálních promotorů, které slabě interagují s podjednotkou σ . Tato slabá interakce je jednou z příčin nestabilních otevřených komplexů u těchto promotorů (Pemberton *et al.*, 2000).

6) UP element

AT bohatá oblast v pozici -60 a -40 (Haugen *et al.*, 2008). C-terminální domény podjednotky α interagují s touto oblastí, což vede ke zvýšení promotorové aktivity zvýšením afinity RNAP k promotoru (Grainger a Busby, 2008).

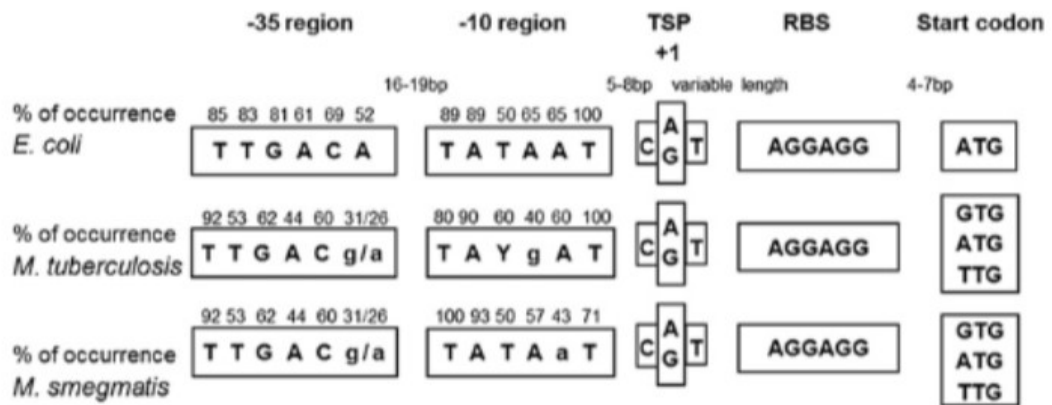


Obrázek 6: Modelové znázornění interakce RNAP s jednotlivými elementy promotoru: Model znázorňuje interakci holoenzymu RNAP + σ^{70} a promotorové sekvence DNA. Struktura RNAP: Šedě jsou znázorněny podjednotky β a β' , světle modře podjednotky α (α^C -terminální doména, α^N -terminální doména), černou barvou podjednotka ω . Jednotlivé domény faktoru σ jsou znázorněny tmavě modře, červeně, žlutě, oranžově, a fialově. Domény interagují s promotorovou sekvencí DNA, složenou z: UP element (světle modře), -35 oblast (tmavě modře), mezerák (spacer), rozšířená oblast -10 (červeně), oblast -10 (žlutě), diskriminátor (oranžově), transkripční počátek +1 (zeleně), DS DNA (downstream DNA- transkribovaná DNA). Optimální konsensus promotorové sekvence je označen jako CONS. Převzato z (Ruff *et al.*, 2015).

1.3.2 Promotor mykobakterií

Transkripce většiny promotorů, identifikovaných u *M. smegmatis* a *M. tuberculosis*, podobně jako u jiných bakterií (Krásný *et al.*, 2008) začíná purinovou bází. V pozici +1 se můžou vyskytovat i thymidin nebo cytosin (Foot *et al.*, 2013). Specifické báze mohou mít vliv na zvýšení promotorové aktivity. Bylo zjištěno, že nahrazením báze v pozici +1 za jakýkoliv purinový zbytek vedl k dvojnásobnému zvýšení aktivity promotorů u mykobakterií (Agarwal *et al.*, 2006).

Obecně je struktura promotoru mykobakterií podobná promotoru *E. coli*; existují však rozdíly. Homologie oblasti -35 mezi mykobakteriemi je relativně malá. Také motiv TTGACA, který se vyskytuje v této oblasti u mnoha jiných bakterií, se u mykobakterií částečně liší. U *M. smegmatis* se jako optimální sekvence v oblasti -35 jeví motiv TTGCGA, protože vykazuje největší promotorovou aktivitu. Bylo zjištěno, že oblast -35 není esenciální pro správnou funkci promotoru. U promotorů, které však tuto oblast postrádají, je předpokládána existence kompenzačních mechanismů, v rámci kterých se zapojují jiné transkripční faktory. Přítomnost transkripčního faktoru RbpA ruší nutnost sekvenčně specifických interakcí mezi doménou 3 a 4 podjednotky σ a promotoru DNA *upstream* před oblastí -10. To má za následek, že RNAP se u *M. tuberculosis* stává hyperaktivním enzymem s promiskuitním výběrem promotorů (Ayyappasamy *et al.*, 2018). Přibližně 10 bp od transkripčního počátku +1 byla identifikována konzervovaná hexamerická sekvence, která odpovídá TATA boxu jiných bakterií. I přesto, že nacházíme podobnosti ve struktuře promotoru mezi mykobakteriemi a *E. coli*, jsou mykobakteriální promotory sekvenčně variabilnější. Příčinou může být bohatší zastoupení G+C bází v mykobakteriálním genomu, ale také větší počet faktorů sigma, které umožňují rozpoznávat specifické promotorové sekvence (Agarwal *et al.*, 2006; Foot *et al.*, 2013).

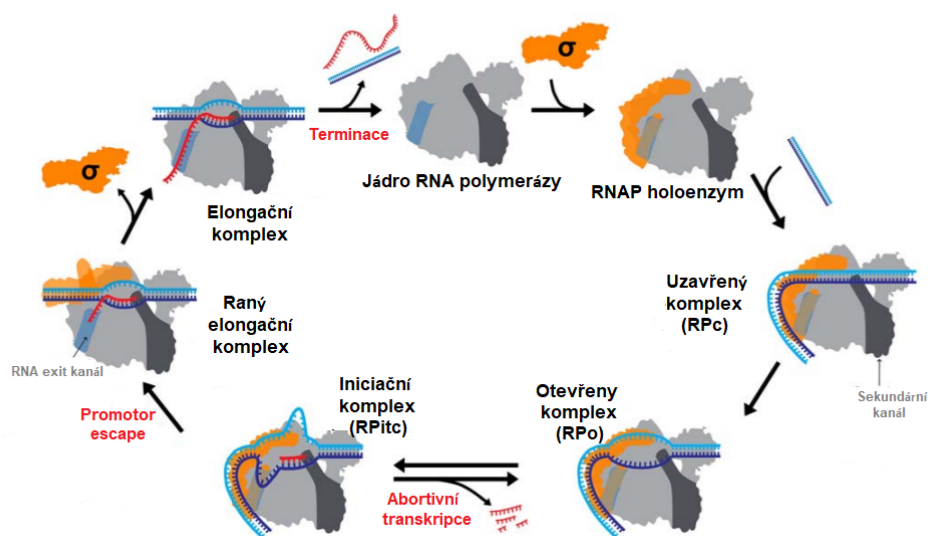


Obrázek 7: Porovnání konsensus promotorové sekvence *E. coli* a mykobakterií: Oblast -35 u *E. coli* je tvořena konzervovanou hexamerickou sekvencí TTGACA. V případě mykobakterií však žádné konzervované sekvence v této oblasti nenacházíme. Motiv TTGCGA u *M. smegmatis* vykazuje největší promotorovou aktivitu. Avšak u *M. tuberculosis* je velmi málo promotorových sekvencí obsahujících konzervovanou -10 oblast a tento motiv. Region -10 je konzervovaná oblast u mykobakterií. Nejčastěji se nachází na transkripčním počátku +1 (TSP) u *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* purinová báze- guanin (G). Ribozom-vazebné místo (RBS) je oblast dlouhá přibližně 6 – 8 bp, bohatá na adenin (A) a guanin (G). Nejfrekventovanějším startovacím kodonem u *E. coli* i mykobakterií je ATG kodon. Přibližně 1/3 proteinů u *M. tuberculosis* je translatována z kodonu GTC. Setkáváme se také s TTG kodonem a dalšími. Převzato z: (Foot *et al.*, 2013).

1.4 Mechanismus transkripce

Transkripcí vzniká nové vlákno RNA, které se označuje jako primární transkript. Nejčastěji jsou přepisovány molekuly mRNA, které dále slouží k proteosyntéze na ribozomech. Transkripcí však vznikají i nekódující proteiny (tRNA, rRNA, atd.), které jsou pro buňku nezbytné.

Mechanismus transkripce můžeme rozdělit do třech stupňů: iniciace, elongace a terminace.



Obrázek 8: Schéma mechanismu transkripce: Interakcí RNAP s podjednotkou σ je vytvořen RNAP holoenzym. Uzavřený komplex (RP_c) vzniká vazbou RNAP na specifickou promotorovou sekvenci. Po izomerizaci vláknů DNA je vytvořen otevřený komplex (RP_o). Iničiační komplex (RP_{itc}) produkuje krátké abortivní transkripty RNA. Po přerušení kontaktu RNAP s promotorem (promotor *escape*) vzniká raný elongační komplex. Nově syntetizované vlákno RNA odchází RNA *exit* kanálem a podjednotka σ disociuje a nastává elongační fáze transkripce. Ta je přerušena specifickou sekvencí DNA- terminátor a transkripce je ukončena. Upraveno a převzato z: (Alhadid *et al.*, 2017).

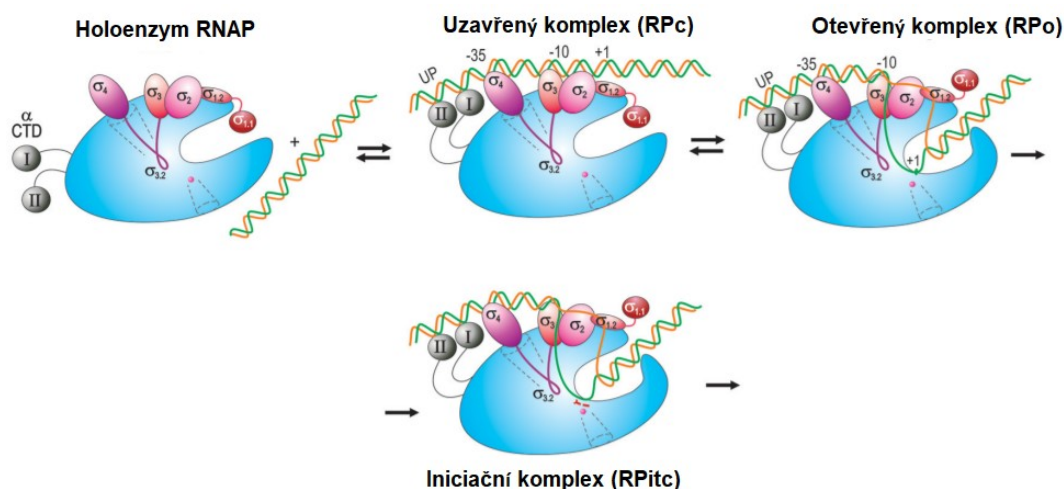
1.4.1 Iničiace transkripce

Iničiace neboli zahájení transkripce je započato navázáním podjednotky σ na jádro RNA a vytvoření holoenzymu RNAP. Holoenzym RNAP následně rozpoznává specifické promotorové sekvence a začíná se formovat tzv. uzavřený komplex (RP_c) (Glyde *et al.*, 2018). Prostřednictvím domény 2.4 a domény 4.2 se podjednotka σ váže do oblasti -35 a -10 od transkripčního počátku +1. Pokud jsou přítomny další sekvenční elementy (rozšířená oblast -10, UP element) promotoru, dochází k jejich vazbě přes jednotlivé domény podjednotky σ . Uzavřený komplex RNAP je tvořen dvouvláknovou DNA, která je obklopena RNAP od oblasti -55 do +1. Kinetické změny vedou k izomerizaci vláknů DNA a vytvoření otevřeného komplexu. Dvouvláknová DNA se ohne a je postupně rozpletena v pozici -11 a +2 (Gries *et al.*, 2010) a vznikne transkripční bublina o velikosti 12 – 14 nukleotidů (Tsujikawa *et al.*, 2002; Bae *et al.*, 2015).

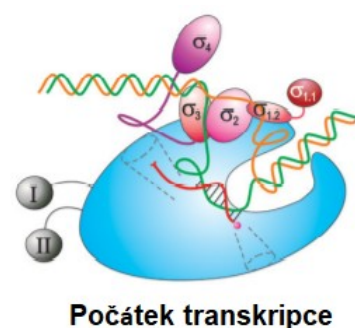
Navázáním iničiačního nukleosidtrifosfátu je zahájena transkripce. Na některých promotorech vznikají během počátečních fází transkripce tzv. abortivní transkripty,

dlouhé přibližně 2 – 12 nukleotidů (Lee a Borukhov, 2016). Abortivní iniciace transkripce byla prokázána nejen u bakterií, ale také u eukaryotních buněk a bakteriofágů *in vitro* (Hsu *et al.*, 1995), později také u *E. coli* za *in vivo* podmínek (Goldman *et al.*, 2009). Transkript, tvořený 4 – 5 nukleotidy, je v kontaktu s doménou 3 podjednotky σ , která uzavírá RNA *exit* kanál (Basu *et al.*, 2014; Zuo a Steitz, 2015). Poté, co má transkript velikost přibližně 12 a více nukleotidů, dochází k přerušení kontaktu mezi jádrem RNAP a promotorem (Revyakin *et al.*, 2006). Tento děj označujeme jako promotor *escape*. (Winkelman *et al.*, 2015). Velikost diskriminátoru a sekvence nově syntetizované RNA ovlivňují délku vlákna RNA potřebnou k jeho uvolnění z promotoru. Také mají vliv, jak často bude docházet k abortivní iniciaci transkripce (Henderson *et al.*, 2017; Heyduk a Heyduk 2018).

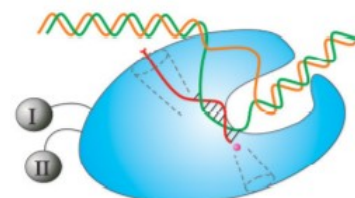
Downstream DNA, tvořící transkripční bublinu, se postupně hromadí v RNAP mechanismem nazývaným *scrunching* (zasouvání). Následně podjednotka σ disociuje z jádra RNAP a pokračuje elongační fáze transkripce (Winkelman *et al.*, 2015; Lee & Borukhov 2016). K disociaci podjednotky σ napomáhá také vznikající vlákno RNA (Barvík *et al.*, 2017). K zahájení transkripce se jako substrát nemusí uplatňovat pouze iNTP. V závislosti na různých růstových podmínkách může být transkripce a následná genová exprese iniciována pomocí oligonukleotidů o délce 2 – 5 bází nazývaných jako nanoRNA (Mechold *et al.*, 2007; Goldman *et al.*, 2011; Vvedenskaya *et al.*, 2012). Jako iniciační substráty mohou také sloužit např. FAD, NAD⁺, NADH nebo koenzym A (Bird *et al.*, 2016).



Obrázek 9: Iniciační fáze transkripce: Holoenzym RNAP je znázorněn modrou barvou. Na svém jádře má navázané jednotlivé domény podjednotky σ (znázorněné oranžovou, růžovou a červenou barvou). Podjednotky α , tvořené N-terminální a C-terminální doménou jsou znázorněny šedě. Při tvorbě uzavřeného komplexu (RPc) je RNAP v kontaktu s vláknem DNA (templátové vlákno- zeleně, netemplátové- oranžově). Izomerizací DNA vlákna vzniká otevřený komplex (RPO) a následuje tvorba iniciačního komplexu (RPitc) spojená se syntézou krátkých transkriptů. Přerušovanou čarou jsou znázorněny jednotlivé kanály RNAP, růžovou kuličkou- katalytické centrum RNAP tvořené Mg^{2+} . Upraveno a převzato z: (Lee a Borukhov, 2016).



Počátek transkripce



Elongační komplex

1.4.2 Elongace transkripce

Poté, co podjednotka σ disociuje z jádra RNAP, dochází k vytvoření elongačního komplexu. Tento komplex se dále posouvá po řetězci DNA a podle principu komplementarity je syntetizováno nové vlákno RNA. V aktivním centru RNAP jsou vytvářeny fosfodiesterové vazby mezi 3' OH skupinou ribózy a α -fosfátem příchozího NTP. (Steitz *et al.*, 1994). Nově syntetizované vlákno RNA se postupně uvolňuje z elongačního komplexu a opouští RNAP přes RNA kanál (Vassilyev, 2009). Stabilita elongačního komplexu je podpořena zúžením hlavního kanálu. Toto zúžení pozitivně ovlivňuje interakce mezi RNAP a nukleovými

Obrázek 10: Elongační fáze transkripce: V počátečních fázích transkripce dochází k postupné syntéze nascentní RNA (znázorněna červeně). Poté co transkript dosahuje velikost 12 a více nukleotidů následuje promotor *escape*. Elongační komplex vzniká disociací podjednotky σ z RNAP a vznikající vlákno RNA opouští jádro RNAP prostřednictvím RNA *exit* kanálu. Upraveno a převzato z: (Lee a Borukhov, 2016).

kyselinami (Vassilyev *et al.*, 2007). Tímto způsobem dochází k syntéze RNA vlákna dlouhého až tisíce nukleotidů, dokud není stabilita elongačního komplexu narušena na terminátorech (Vassilyev, 2009).

Důležitou úlohu v elongační fázi plní transkripční regulátory nazývané jako elongační faktory. Tyto faktory mohou ovlivňovat rychlost probíhající transkripce, případně i její pozastavení nebo úplné zastavení. (Yang *et al.*, 2009). Některé elongační faktory se vážou do sekundárního kanálu RNAP.

Elongační faktory mohou být proteiny, nekódující RNA (např. 6S RNA, Ms1 objevená u mykobakterií), malé peptidy, aminokyseliny atd. (Borukhov *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2009). Příkladem jsou: Gre faktory (GreA, GreB), Nus faktory atd. (Borukhov *et al.*, 2005). Podrobněji se regulaci transkripce věnuju v kapitole: *2 Regulace transkripce*

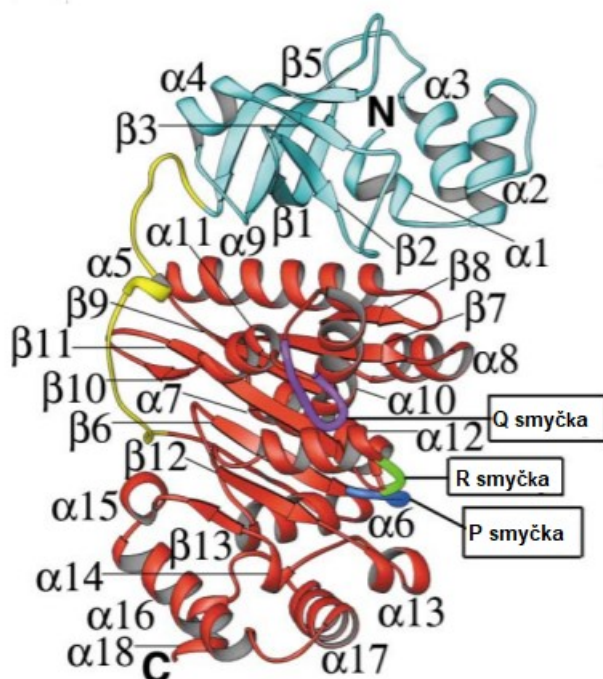
1.4.3 Terminace transkripce

Terminací transkripce rozumíme její ukončení. RNAP rozpozná specifickou sekvenci DNA označovanou jako terminátor, která ukončí syntézu nově vznikající vlákna RNA. Rozeznáváme dva způsoby, kterými je transkripce ukončena. Terminace závislá nebo nezávislá na proteinu Rho.

1.4.3.1 Rho-závislá terminace

Rho-závislá terminace je závislá na přítomnosti faktoru Rho. Tento protein je složen z šesti podjednotek uspořádaných do kruhu (Kriner a Groisman, 2017). Na C-terminální doménu faktoru Rho se váže adenosintrifosfát (ATP), který poskytuje energii nutnou k translokaci podél vlákna RNA (Richardson, 2003). Po vazbě N-terminální domény faktoru Rho na specifickou sekvenci RNA bohatou na cytosin (dlouhou přibližně 40 nukleotidů) začne Rho faktor za spotřeby ATP putovat po vlákně až k RNAP, kde naruší stabilitu elongačního komplexu. K rozpadu elongačního komplexu dochází pravděpodobně mechanickým vytažením RNA (Park a Roberts, 2006). Druhou možností je přímá vazba proteinu Rho na RNAP, nicméně tento způsob terminace transkripce je méně účinný (Epshtein *et al.*, 2010).

Regulace faktorem Rho je založena na kompetici s transkripčními faktory NusA a NusG o vazebné místo na RNA. Pokud dochází k navázání faktoru NusA, snižuje se aktivita RNAP, což může vést k ukončení transkripce (Michiel *et al.*, 2005). Naopak faktor NusG urychluje uvolnění syntetizovaného vlákna RNA z elongačního komplexu a následné působení faktoru Rho na RNAP, což vede k terminaci transkripce (Cardinale *et al.*, 2008).



Obrázek 11: Struktura a topologie proteinu Rho: Struktura znázorňuje orientaci N-terminální (N-znázorněna azurově) a C-terminální domény (C-znázorněna červeně) proteinu Rho. N-terminální doména je složena ze spirálovité struktury a OB-subdomény. OB domény jsou složeny přibližně ze 70 – 150 aminokyselin a vážou se na jednovláknovou DNA. Tyto domény jsou známé díky své vazbě na oligonukleotid/ oligosacharid a účastní se kontroly poškození DNA jako jednovláknové vazebné proteiny (Flynn a Zou, 2010). Žlutou barvou je znázorněn *linker*, který propojuje C-terminální a N-terminální doménu. C-terminální doména je složena z RecA ATP-vazebného záhybu a menší spirálovité subdomény. Smyčky R (zeleně) a Q (fialově) jsou zapojeny do asociace s RNA. P smyčka (modře) je nezbytná pro vazbu ATP a hydrolýzu. Upraveno a převzato z: (Skordalakes *et al.*, 2003).

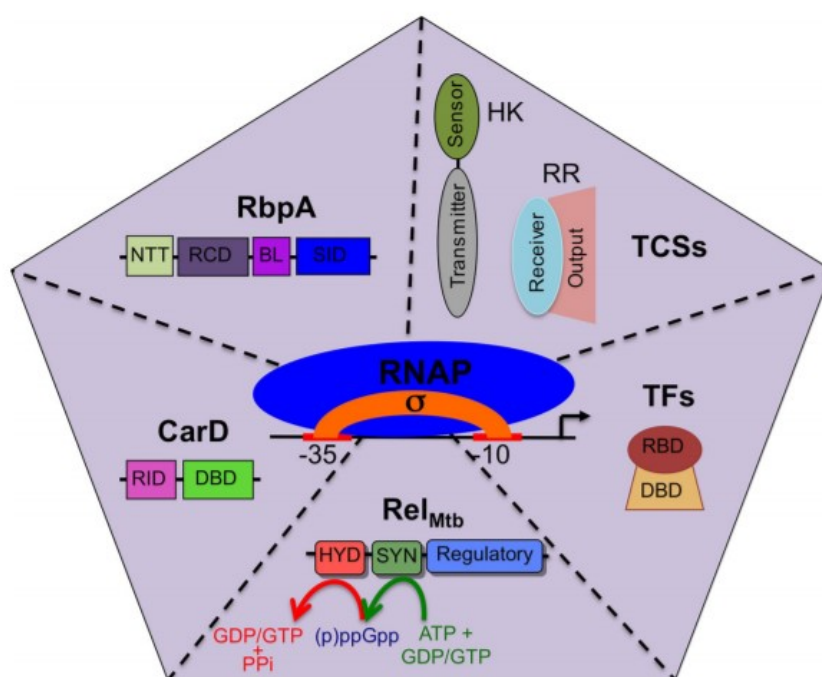
1.4.3.2 Rho-nezávislá terminace

Druhým způsobem ukončení transkripce je Rho-nezávislá terminace, která nevyžaduje přítomnost faktoru Rho. Činnost RNAP je zastavena vytvořením terminační vlásenky bohaté na G+C. Za invertovanou vlásenkou následuje uracilová oblast (U-oblast) dlouhá přibližně 7 – 9 nukleotidů. V blízkosti oblasti G+C můžeme

nacházet také oblast A, která podporuje terminaci transkripce (Heinet *et al.*, 2014). Délka a tvar vlásenek se může u jednotlivých bakteriálních druhů lišit (Mitra *et al.*, 2009). Terminační vlásenka je po navázání skládána v RNA kanálu. Mezi uracilem nově syntetizovaného vlákna RNA a adeninem v DNA se vytváří pouze dva vodíkové můstky. Snížená celková pevnost těchto interakcí pak vede k destabilizaci elongačního komplexu, disociaci RNAP a terminaci transkripce (Michiel *et al.*, 2005; Hein *et al.*, 2014).

2 REGULACE TRANSKRIPCE

Nezbytnou schopností bakterií, nutnou pro přežití, je schopnost adaptovat se na podmínky vnějšího prostředí. Tato schopnost je umožněna díky regulaci na úrovni genové exprese. Jedná se o mechanismy, které vedou k syntéze a expresi genů ve správnou dobu a na správném místě. Regulace exprese jednotlivých genů probíhá na všech stupních genové exprese: transkripci a potranskripční modifikaci, translaci a potranslační modifikaci. U prokaryotických organismů převažuje regulace na úrovni iniciace transkripce (Paul *et al.*, 2004). V této fázi buňka rozhoduje, zda bude zahájena transkripce a tedy jestli bude příslušný gen přepisován do vlákna mRNA a podstoupí do další fáze genové exprese – translace. Na regulaci transkripce se podílejí proteinové a neproteinové transkripční faktory, které dále obecně charakterizují.



Obrázek 12: Schéma RNAP: Schéma RNAP a 6 různých typů faktorů, které regulují aktivitu RNAP v závislosti na různých podmínkách prostředí u *M. tuberculosis*. **CarD** – esenciální faktor transkripce, který interaguje s RNAP skrze *RID* doménu a s řetězcem DNA pomocí domény *DBD*. **RbpA** – esenciální faktor transkripce složený z: *NTT* (N-terminální doména), *RDC* (základní doména), *BL* (linker) a *SID* (σ -interakční doména). **Rel_{Mtb}** – při stringentní odpovědi buňky, složený z domény *HYD* – (p)ppGpp hydrolázová doména a domény *SYN* – (p)ppGpp syntetázová doména. **TFs** – transkripční faktor, složený z: *RBD* (RNAP-vazebná doména) a *DBD* (DNA-vazebná doména). **TCSs** – dvoukomponentový regulační systém *M. tuberculosis*: *HK* (histidinová kináza reagující na specifické změny podmínek v prostředí) a *RR* (regulátor odpovědi, který svou vazbou na DNA aktivuje transkripci specifického regulonu). Převzato z: (Flentje *et al.*, 2016).

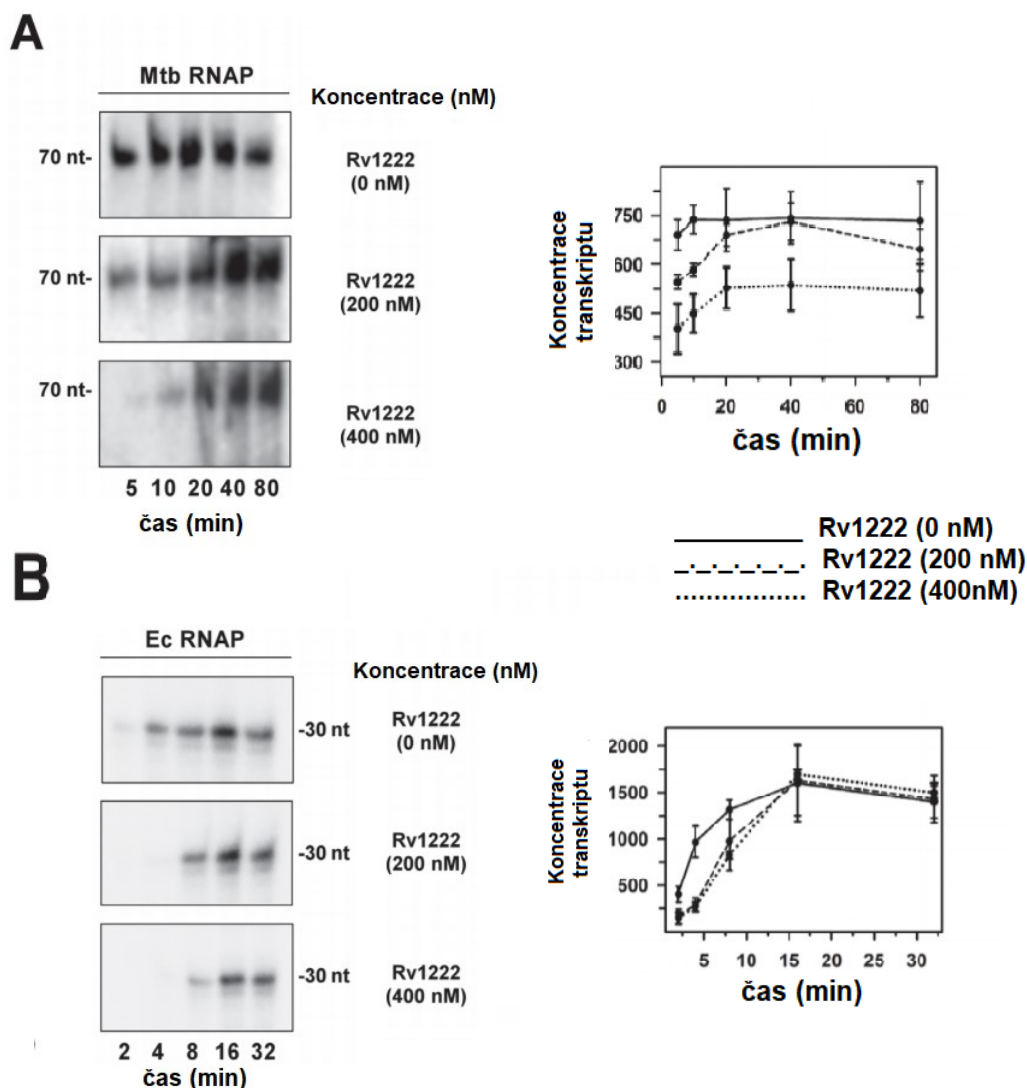
2.1 Transkripční faktory

Jako transkripční faktory označujeme proteiny se schopností regulovat transkripci DNA. Transkripční faktory dělíme na aktivátory a represory. Aktivátor interaguje se specifickou sekvencí a zvyšuje transkripci genu řízenou tímto promotorem. Případně může interagovat s RNAP a měnit její vazebnou preferenci k příslušným promotorům (Lee *et al.*, 2012). Naopak represor se váže na regulační oblast DNA, tzv. operátor (oblast mezi promotorem a počátkem transkripce) a blokuje transkripci. Vazba represoru brání navázání RNAP, případně dochází k vytvoření simultánní vazby represoru a RNAP, ale transkripce je inhibována v iniciační fázi a k expresi genu nedochází (Rojo, 2001).

Funkce některých transkripčních faktorů v regulaci genové exprese je známá, avšak je patrné, že stále existuje mnoho neznámých transkripčních faktorů, které vyvolávají zájem o jejich studium. Studie z roku 2018 objevily u *M. tuberculosis* nový transkripční faktor Rv1265, který interaguje s malou nekódující RNA Mcr11. Exprese Mcr11 reaguje na zvýšené hladiny cAMP během infekce způsobené *M. tuberculosis*. Genová regulace tohoto mechanismu však nebyla doposud známá. Nový transkripční faktor Rv1265 se váže na ATP i DNA a reguluje svou vlastní expresi i expresi Mcr11 (Girardin *et al.*, 2018).

Avšak aby byla bakteriální buňka schopná reagovat na náhlé podněty z okolního prostředí, je nutné regulovat interakci transkripčních faktorů s RNAP. Transkripční aktivita původního faktoru sigma je inhibována na základě složitých regulačních kaskád. Koncentrace faktorů σ ovlivňují: *i)* anti- σ faktory a *ii)* adaptérové proteiny. Adaptérový protein se váže na faktor sigma a způsobuje jeho proteolýzu. Anti- σ faktor se váže na faktor σ a autoinhibuje jeho transkripci (Treviño *et al.*, 2013).

Např. nový anti- σ faktor u *M. tuberculosis* s názvem Rv1222 působí jako inhibitor transkripce během promotor *escape* a prodlužování řetězce nově vznikajícího transkriptu. Rv1222 současně interaguje s RNAP a vláknem DNA. Touto interakcí dochází k ukotvení RNAP na vlákno DNA a zpomalení syntézy nově vznikajícího vlákna mRNA (Rudra *et al.*, 2015).



Obrázek 13: Transkripční faktor Rv1222 inhibuje transkripci *in vivo* i *in vitro*: Po vytvoření otevřeného komplexu během transkripce byl do reakční směsi přidán protein Rv1222. Reakce byly zastaveny v různých časových intervalech po iniciaci transkripce (přidáním nukleosidtrifosfátu). **(A)** Pokud nebyl Rv1222 přítomný v reakční směsi (0 nM), transkript byl nasycen RNAP_{MTB} během 5 min. Po přidání 200nM Rv1222 se však doba nutná k nasycení prodloužila na 20 min. Při koncentraci 400 nM Rv1222 a čase 80 min nebyl transkript nasycen. Na základě intenzity proužků získaných transkripčními testy *in vitro* byl sestaven graf, který vyjadřuje nasycení transkriptů v závislosti na čase a různé koncentraci proteinu Rv1222. **(B)** Výsledky získané u *E. coli* byly obdobné jako *M. tuberculosis*. Čas potřebný k nasycení transkriptů RNAP byl však nižší. Upraveno a převzato z: (Rudra *et al.*, 2015)

2.1.1 Proteinové transkripční faktory

Nejlépe charakterizovanou regulační sítí je modelový organismus *E. coli*, u kterého je identifikováno přibližně 197 transkripčních faktorů. Přibližně 60 transkripčních faktorů je sekvenčně specifických pouze pro jeden promotor. Některé transkripční faktory však mohou regulovat více genů. Asi polovina regulačních genů *E. coli* je

řízena přibližně sedmi transkripčními faktory: IHF, FNR, Fis, CRP, NarL, Lrp a ArcA (Browning *et al.*, 2004).

V případě *M. tuberculosis* je známo přibližně 200 transkripčních faktorů, které společně s DNA vazebnými proteiny reagují na signály z vnějšího prostředí a ovlivňují expresi jednotlivých genů. (Rustad *et al.*, 2014)

Ze stovek existujících faktorů bych se rád v této kapitole zmínil o dvou důležitých transkripčních faktorech, které jsou esenciální pro iniciaci transkripce u mykobakterií – RbpA a CarD.

2.1.1.1 RbpA

RbpA je protein o velikosti 14 kDa s dimerní strukturou. Poprvé byl izolován ze *Streptomyces coelicolor*. Váže se na RNAP, modifikuje její jádro, zvyšuje afinitu vazby faktoru sigma a tím vytvoření holoenzymu RNAP a rozpoznání specifických promotorových sekvencí (Hu *et al.*, 2016). Na rozdíl od kmenu *Actinobacteria* nenacházíme tento transkripční faktor u klasických modelových organismů, jako jsou: *E. coli*, *B. subtilis*, nebo *T. thermophilus* (Hubin *et al.*, 2017).

RbpA je složen z N-terminální domény, *N-terminal tail* (NTT), která interaguje s podjednotkou β' a podjednotkou σ . Dále z jádra, *core domain* (CD) RbpA, která interaguje s podjednotkou β' a z C-terminální domény, *σ -interaction domain* (SID), interagující s podjednotkou σ . Mezi CD a SID doménou se nachází linker, *basic linker* (BL), který interaguje s promotorovou sekvencí *upstream* před rozšířenou oblastí -10 (Ayyappasamy *et al.*, 2018; Jensen *et al.*, 2019).

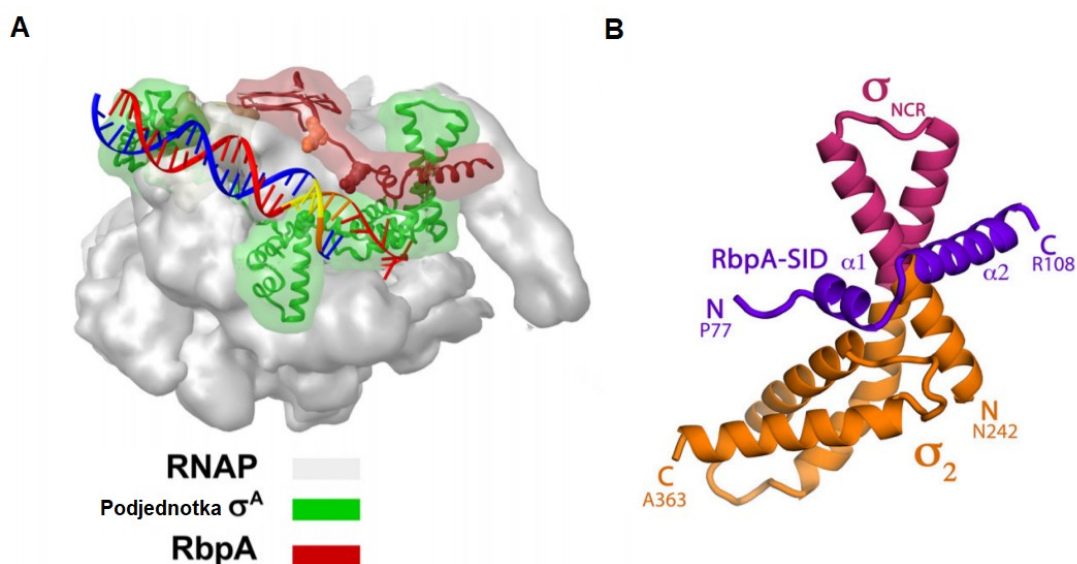
Bylo prokázáno, že pokud dochází k mutaci BL domény a k delecí domény NTT a CD, dochází tak k zpomalení růstu bakterií. Pro interakci RbpA s RNAP je důležitá pouze doména SID (Prusa *et al.*, 2018). BL linker společně s doménou SID jsou pak nezbytné pro stabilizaci otevřeného komplexu za *in vitro* podmínek (Jensen *et al.*, 2019).

Transkripční faktor RbpA interaguje s RNAP během iniciační fáze transkripce a stimuluje tvorbu otevřeného komplexu. Na rozdíl od *E. coli* a podobně jako u *B. subtilis* (Whipple a Sonenshein, 1992) je otevřený komplex u mykobakterií velmi

nestabilní s poločasem rozpadu několik minut i méně. RbpA se společně s CarD podílí na jeho stabilizaci (Davis *et al.*, 2015; Ayyappasamy *et al.*, 2018).

Oba faktory se společně uplatňují při regulaci genové exprese a tedy v patogenezi onemocnění. V infikované tkáni má *M. tuberculosis* omezený přístup k živinám (Shi a Xie, 2011). V podmínkách chudých na živiny dochází k bakteriálnímu stresu a geny *carD* a *rbpA* jsou nadprodukovány (Salazar *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2019).

Původní teorie naznačovaly, že RbpA hraje roli při tvorbě rezistence na rifampicin na základě dvou mechanismů: *i*) konkurence RbpA a rifampicinu o vazebné místo na RNAP nebo *ii*) alosterická změna vazebného místa a snížení afinity rifampicinu k RNAP. Nyní však víme, že se RbpA váže na podjednotku β RNAP do oblasti SBHMs (*Sandwich-Barrel Hybrid Motif*) a nepřekrývá tak vazebné místo pro rifampicin (Hu *et al.*, 2012).



Obrázek 14: Struktura transkripčního faktoru RbpA: (A) Modelové vyobrazení komplexu: RNAP (šedě), podjednotka σ^A (zeleně) s navázaným faktorem RbpA (červeně) a promotorovou DNA (templátové vlákno – modře, netemplátové – červeně) u *M. smegmatis*. Upraveno a převzato z: (Perumal *et al.*, 2018). (B) Krystalická struktura C-terminální domény (RbpA-SID) v komplexu s podjednotkou σ^A u *M. tuberculosis*. Modře je znázorněna C-terminální doména RbpA, oranžově doména 2 podjednotky σ^A a purpurově a N-terminální doména faktoru σ^A . Upraveno a převzato z: (Hubin *et al.*, 2015).

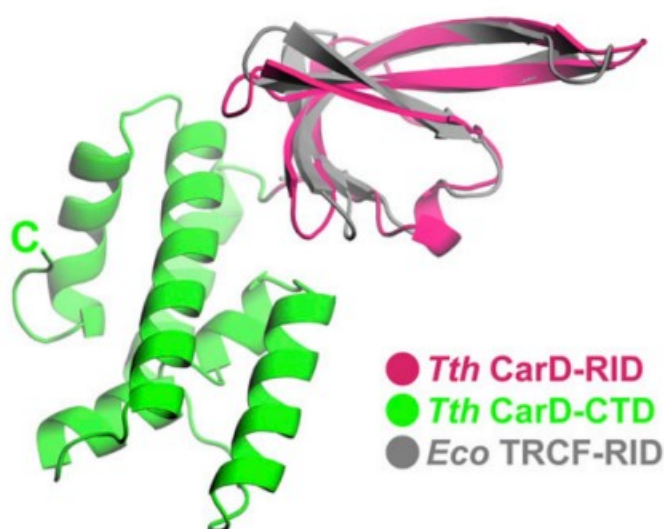
2.1.1.2 *CarD*

CarD je protein složený z 162 AMK u *M. smegmatis*. Skládá se z (i) N-terminální domény (RID), která interaguje s podjednotkou β , (ii) C-terminální domény (DBD)

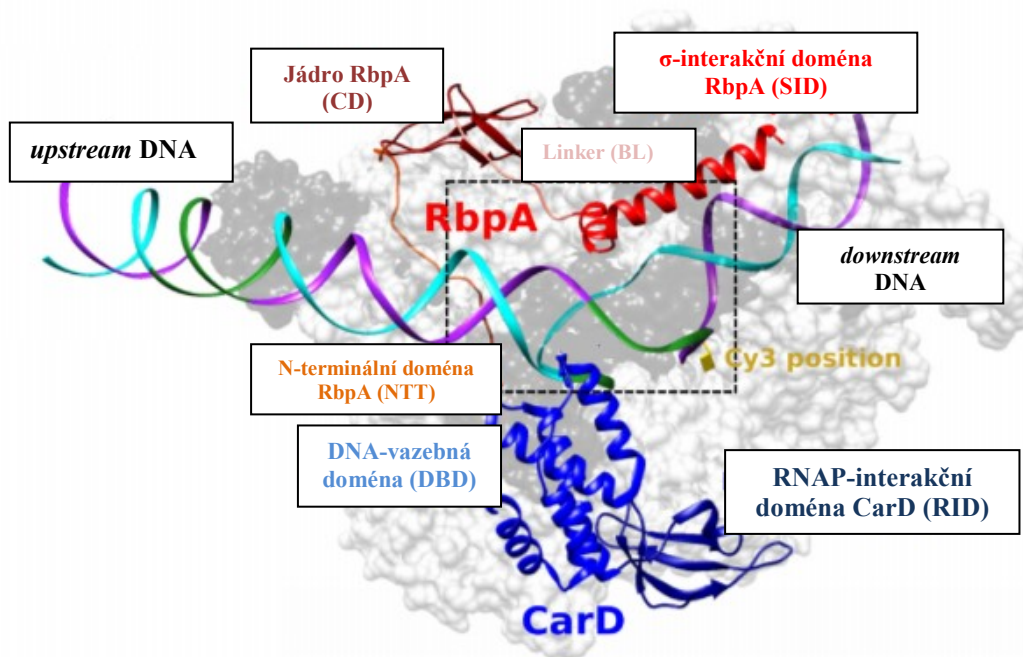
interagující s promotorovou sekvencí DNA a (iii) zbytku tryptofanu (W85), který je v kontaktu s horním okrajem transkripční bubliny (Srivastava *et al.*, 2013). C-koncová doména se podobá HMGA (*high mobility group*) u eukaryotických organismů. HMGA představují skupinu proteinů nehistonové povahy bohatých na AT DNA-vazebné oblasti a kyselě nabitě aminokyseliny. Jsou součástí chromatinu a podílejí se na jeho remodelaci a tvorbě nukleoproteinových komplexů (Cayuela *et al.*, 2003; Arnanz *et al.*, 2010). CarD je esenciální transkripční faktor u *M. tuberculosis*, který se váže na iniciační komplex a podporuje syntézu nového vlákna RNA stabilizací transkripční bubliny (Stallings *et al.*, 2009; Rammohan *et al.*, 2016).

Proteiny CarD nejsou konzervované u eukaryot, ale jejich distribuci můžeme pozorovat u bakterií, např. *T. thermophilus*, *B. burgdorferi*, *M. tuberculosis* atd. (Stallings a Glickman, 2011). Mykobakterie, které postrádají transkripční faktor CarD, jsou citlivé na ciprofloxacin, oxidační stres, hladovění a nejsou schopné replikace (Srivastava *et al.*, 2013).

CarD a RbpA však nejsou pouze esenciálními aktivátory transkripce u mykobakterií. Nové studie poukazují na skutečnost, že patrně plní funkci jako represor. Společně regulují rychlost tvorby otevřených komplexů, ale také zpomalují únik promotorů a mohou inhibovat syntézu transkriptů plné délky, což může mít za následek represi transkripce (Jensen *et al.*, 2019).



Obrázek 15: Struktura faktoru CarD: Krystalická struktura transkripčního faktoru CarD u *T. Thermophilus*. N-terminální doména (RID) je znázorněna růžově a vykazuje strukturální podobnost s šedě vyobrazenou N-terminální doménou TRCF-RID (TRCF: *transcription repair coupling factor*) u *E. coli*., C-terminální doména CarD (CTD) je znázorněna zeleně. Převzato z: (Srivastava *et al.*, 2013).



Obrázek 16: Model společné interakce RbpA a CarD během transkripce: V pozadí je šedě znázorněn holoenzym RNAP, černě je vyobrazen navázaný faktor σ^A . Vlákno DNA (templátové – světle modře, netemplátové – fialově) je složeno z promotorové sekvence s oblastí -10 a -35 (zeleně). Upraveno a převzato z: (Jensen *et al.*, 2019).

2.1.2 Neproproteinové transkripční regulátory

Regulace iniciace transkripce je také zprostředkována za pomoci malých molekul – alarmonu ppGpp a iniciačního nukleosid trifosfátu, ale rovněž působením nekódujících RNA (6S RNA, Ms1), vitamínů atd. (Srivatsan a Wang, 2008; Rabatinová *et al.*, 2013).

2.1.2.1 Regulace alarmonem ppGpp

Stringentní odpověď chápeme jako reakci buňky na nedostatek aminokyselin, při které dochází k produkci guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát (ppGpp). V buňce se nachází ve dvou podobách: *i*) guanosin tetrafosfátu (ppGpp) nebo *ii*) guanosin pentafosfátu (pppGpp); (Potrykus a Cashel, 2008).

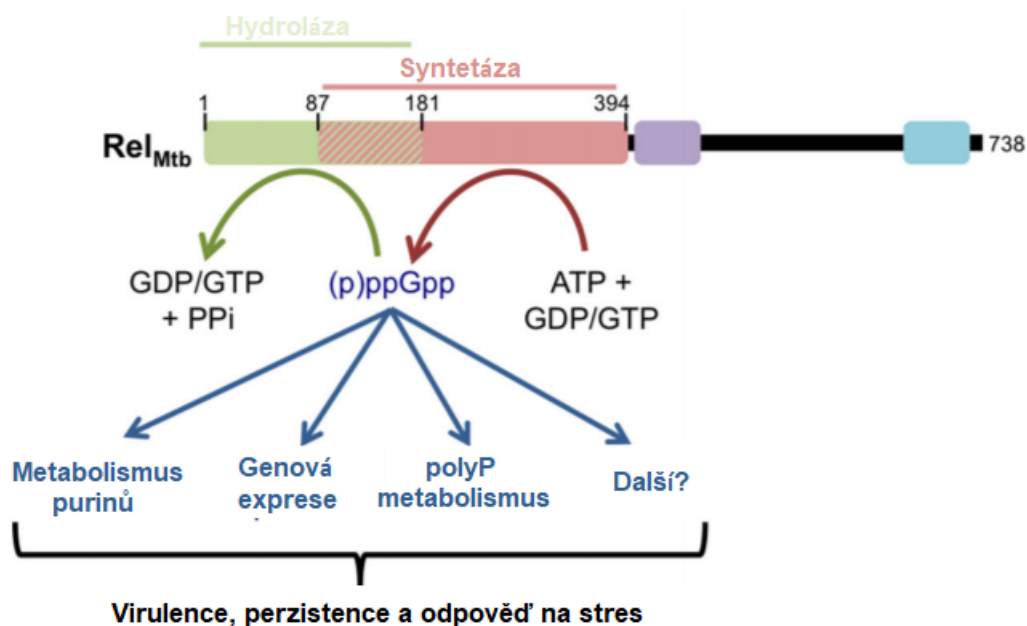
Tato reakce je aktivována zařazením nenabitě tRNA do místa A (aminokyselinové místo, tj. místo, kde se váže tRNA s novou AMK) na ribozomu. Nenabitá tRNA aktivuje RelA protein asociovaný s ribozomem, který katalyzuje hydrolýzu GTP nebo GDP na alarmon (p)ppGpp za využití ATP (Zhang *et al.*, 2018). U všech

mykobakterií nacházíme konzervovaný protein s názvem RelMtb, který je důležitý zejména při chronické fázi infekce *in vivo*. Stringentní odpověď u mykobakterií tak představuje podstatný molekulární mechanismus, jak odolávat poškození způsobené hostitelem (Prusa *et al.*, 2018).

Při nedostatku mastných kyselin, železa, fosforu atd. je aktivován enzym SpoT, který dokáže (p)ppGpp jak syntetizovat, tak hydrolyzovat na GTP/GDP a pyrofosfát (Vinella *et al.*, 2005).

Alarmon (p)ppGpp se podílí na globální regulační odpovědi, přičemž negativně reguluje expresi mnoha genů, zejména inhibuje syntézu RNA (rRNA, tRNA promotorů, některých mRNA promotorů); (Durfee *et al.*, 2008). Naopak aktivuje různé proteázy a biosyntetické dráhy, podílející se na syntéze aminokyselin z nukleotidů, lipidů. Také ovlivňuje afinitu primárního faktoru sigma k RNAP. Snížením afinity se do interakce s RNAP zapojují alternativní faktory sigma (Srivatsan a Wang, 2008).

U gram-negativních bakterií dochází ke spolupráci s kofaktorem DksA a urychluje tak tvorbu otevřených komplexů při iniciaci transkripce z aminokyselinových promotorů. Diskriminátor promotorů pro syntézu aminokyselin je bohatý na AT oblasti, což podporuje vytváření stabilních otevřených komplexů (Srivatsan a Wang, 2008). Avšak u gram-pozitivních bakterií nedochází k přímé interakci alarmonu s RNAP. Bylo zjištěno, že regulace stringentní odpovědi probíhá nepřímo přes ovlivnění koncentrace GTP. Diskriminátor promotorů pro rRNA obsahuje GC bohaté oblasti, které vytváří nestabilní otevřené komplexy. Jako iniciační nukleotid pro transkripci rRNA genů u *B. subtilis* slouží GTP, který svou přítomností stabilizuje otevřený komplex RNAP a promotoru. Rovněž GTP slouží jako důležitý substrát pro syntézu (p)ppGpp. Při zahájení stringentní odpovědi dochází k poklesu koncentrace GTP, který se využije pro syntézu ppGpp. Navíc se alarmon ppGpp aktivně podílí na inhibici syntézy GTP blokováním funkce enzymů hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy a guanylát kinázy, tedy enzymů zapojených do syntézy GTP. V konečném důsledku mají tyto regulační dráhy vliv na snížení transkripce genů kódujících rRNA (Srivatsan a Wang, 2008; Corrigan *et al.*, 2016).



Obrázek 17: Efekt působení alarmonu (p)ppGpp u *M. tuberculosis*: Rel_{Mtb} doména je zodpovědná za syntézu i hydrolýzu alarmonu (p)ppGpp. Při syntéze dochází k přenosu 5'-β,γ-pyrofosfátu z molekuly ATP na 3'-OH GDP nebo GTP. Pokud je buňka vystavena stresu, je aktivován alarmon (p)ppGpp, který vede ke změnám genové exprese, metabolismu purinů, metabolismu polyfosfatázy (polyP) a dalším, doposud neobjeveným změnám v regulaci alarmonem. Upraveno a převzato z: (Prusa *et al.*, 2018).

2.1.2.2 Regulace molekulou iNTP

Iniciační nukleosid trifosfáty jsou malé efektorové molekuly, které se během iniciační fáze transkripce vážou na RNAP a stabilizují otevřený komplex. Rozeznáváme dvě skupiny promotorů v závislosti na koncentraci iNTP ovlivňující stabilitu otevřeného komplexu a tím promotorovou aktivitu. První skupinou jsou tzv. [iNTP]-senzitivní promotory, které vyžadují pro maximální aktivitu relativně vysokou koncentraci iNTP. Nízké hladiny [iNTP] vedou k další destabilizaci otevřeného komplexu. Naopak zvýšená koncentrace iNTP otevřený komplex stabilizuje a tím zvyšuje i transkripční aktivitu. Druhou skupinu tvoří tzv. [iNTP]-nesenzitivní promotory, které jsou stabilní a mohou dosáhnout maximální aktivity i při nízké koncentraci iNTP (Krasný *et al.*, 2008).

2.1.2.3 Nekódující RNA

Jako nekódující RNA (ncRNA) označujeme molekuly, které nejsou překládány do proteinů. Malé nekódující RNA můžeme podle velikosti rozdělit na dlouhé ncRNA (o velikosti > 200 až 300 nt) a krátké ncRNA (< 200 nt). I přesto, že se jedná o RNA, které nekódují žádné proteiny, mají významnou regulační funkci v procesu

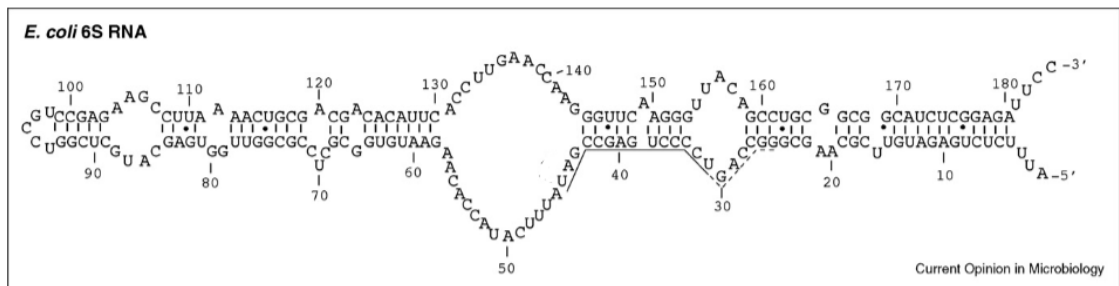
transkripce a potranskripčních modifikacích, intracelulárního transportu atd. (Kung *et al.*, 2013).

Do skupiny ncRNA řadíme funkční molekuly, jako jsou tRNA, rRNA, které mají zásadní vliv na regulaci transkripce a translace. Zájem o studium skupiny nekódujících RNA vyvolal objev dalších nekonvenčních regulačních molekul, jako jsou siRNA (*small interfering RNA*) a miRNA (*microRNA*), které zastupují funkci transkripčních aktivátorů nebo represorů v regulaci genové exprese. Také se podílí na koordinaci potranskripčních modifikací a kontrole stability RNA (Srijyothi *et al.*, 2018; Kung *et al.*, 2013).

Jako první ncRNA, byla u *E. coli* identifikována 6S RNA, u které bylo prokázáno, že inhibuje transkripci svou vazbou na holoenzym RNAP (Wassarman a Storz, 2000; Cavanagh a Wassarman, 2014). V naší laboratoři byla u modelového organismu *M. smegmatis* objevena malá nekódující RNA – Ms1, která se na rozdíl od 6S RNA váže na RNAP bez faktoru σ . (Hnilicová *et al.*, 2014; Šiková *et al.*, 2019). Její přítomnost se předpokládá i u jiných mykobakterií (Hnilicová *et al.*, 2014). Podrobněji se oběma nekódujícím RNA věnuji v samostatných kapitolách této diplomové práce.

3 6S RNA

6S RNA je krátká nekódující RNA (sncRNA), vysoce abundantní během stacionární fáze růstu. Jedná se o vůbec první sekvenovanou nekódující RNA a její homology byly identifikovány ve většině bakteriálních genomů. Buněčná funkce 6S RNA byla záhadou po mnoho let. Nyní však víme, že se podílí na regulaci genové exprese svou interakcí se σ^{70} navázanou na RNAP (Wassarman a Storz, 2000; Cavanagh *et al.*, 2010). 6S RNA se skládá do vysoce konzervované sekundární struktury v podobě vypouklé vlásenky, která se nápadně podobá transkripčnímu komplexu DNA během elongační fáze. Při interakci dochází ke kontaktu 6S RNA se σ^{70} a podjednotkami β a β' . Navázání 6S RNA je založeno na interakci s doménou 4.2 faktoru σ^{70} (složené z kladně nabitých aminokyselin) a záporně nabitým řetězcem RNA (Klocko a Wassarman, 2009).

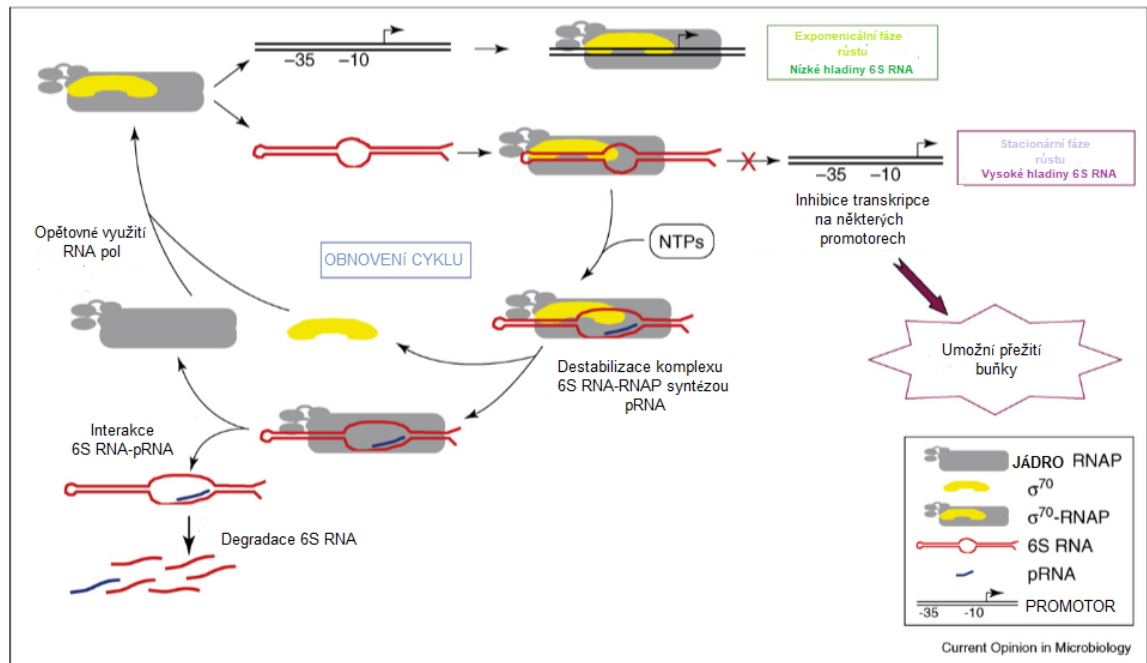


Obrázek 18: Sekundární struktura 6S RNA u *E. coli*: Upraveno a převzato z: (Wassarman, 2007)

6S RNA se podílí na globální regulaci transkripce svou interakcí s RNAP. Pokud dochází k hladovění buněk, 6S RNA vyvazuje faktor σ^{70} z holoenzymu RNAP a potlačuje tak transkripci σ^{70} -dependentních promotorů. Vyvázáním σ^{70} se na RNAP můžou navázat alternativní faktory sigma (Shephard *et al.*, 2010).

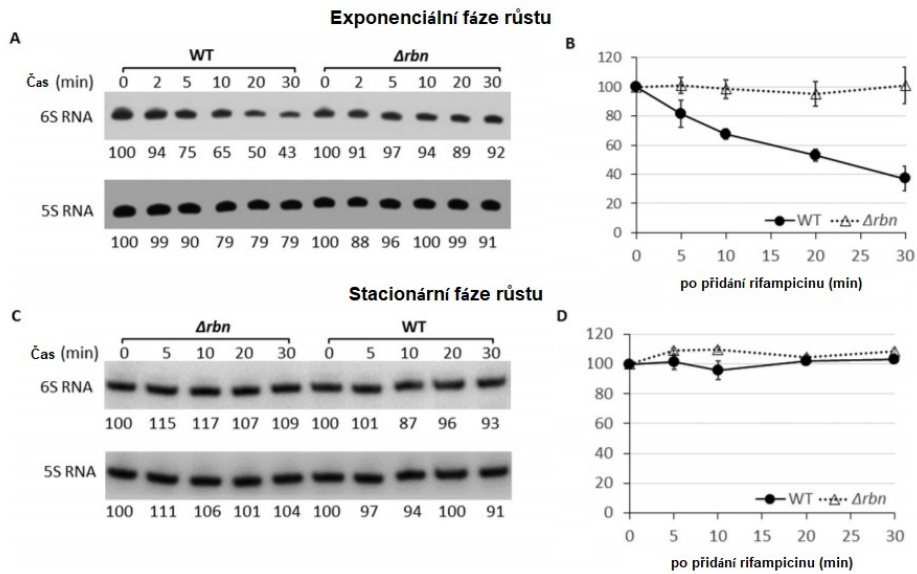
V nutričně bohatém prostředí se zvyšuje hladina nukleosid trifosfátů, které umožňují růst buňky. Opětovný růst je založen na negativní zpětné regulaci, kdy 6S RNA slouží jako templát pro syntézu pRNA vláknů, dlouhého přibližně 14 – 20 nukleotidů. Komplex 6S RNA:RNA se stane nestabilní, což vede k uvolnění z vazby na RNAP a obnovení transkripce *housekeeping* genů opětovným navázáním faktoru σ^{70} (Cavanagh *et al.*, 2012). U *B. subtilis* nacházíme dvě formy nekódující 6S RNA (6S-1 a 6S-2 RNA), které interagují s $E\sigma^A$ RNAP (Trotochaud a Wassarman, 2005).

Jako iniciační nukleotid u RNA 6S-1 slouží GTP, který je efektivnější pro syntézu pRNA vláknů a znovu obnovení funkce σ^A (Cabrera-Ostertag *et al.*, 2013).



Obrázek 19: Mechanismus fungování 6S RNA: Mezi DNA promotory a molekuly 6S RNA dochází ke kompetici o vazbu na RNAP v závislosti na růstových podmínkách. Během exponenciální fáze růstu jsou hladiny 6S RNA nízké. Naopak ve stacionární fázi převládá přítomnost komplexů 6S RNA- σ^{70} -RNAP, které inhibují funkci některých promotorů se záměrem zvýšit schopnost přežití buněk ve stacionární fázi růstu a během stresu. Ve chvíli, kdy se buňka dostává do nutričně bohatého prostředí, se zvýší koncentrace nukleosid trifosfátů (NTP) a 6S RNA slouží jako templátové vlákno pro syntézu pRNA. Tato syntéza destabilizuje komplex 6S RNA- σ^{70} -RNAP, dochází k uvolnění faktoru σ a poté k degradaci 6S RNA. Uvolněná RNAP se zapojuje do další transkripce. Upraveno a převzato z: (Wassarman, 2007).

Nové studie ukazují, že na regulaci 6S RNA (a některých dalších sRNA: SibE, GcvB a OxyS) se v exponenciální fázi růstu podílejí ribonukleázy. Pomocí testů *in vitro* bylo prokázáno, že RNáza BN může svou endoribonukleázovou aktivitou přímo štěpit 6S RNA. Tento závěr je také podpořen faktem, že poločas rozpadu 6S RNA u buněk v exponenciální fázi růstu je přibližně 20 minut, zatímco ve stacionární fázi, při které RNáza BN není přítomna, je 6S RNA zcela stabilní (Hua *et al.*, 2016).

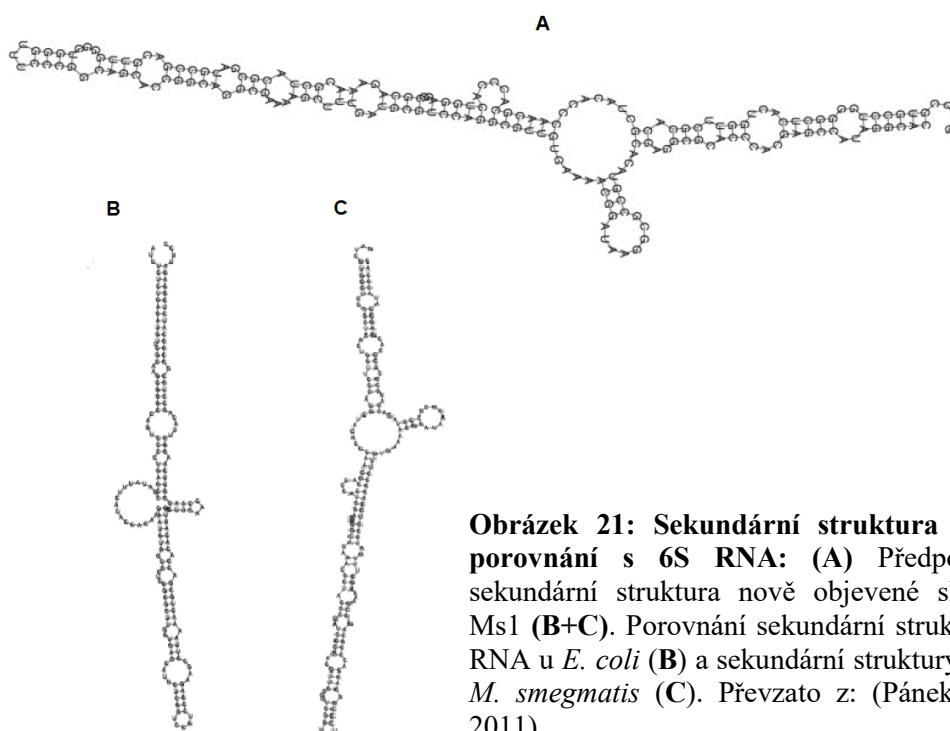


Obrázek 20: Vliv RNázy BN na stabilitu 6S RNA během různých fází růstu: (A) Stabilita 6S RNA během exponenciální fáze růstu u divokého kmene (*wt*) a Δrbn mutantních buněk. Po přidání rifampicinu bylo množství transkriptu stanoveno pomocí metody Northern blot. U divokého kmene došlo ke snížení hladiny 6S RNA na polovinu přibližně po 20 minutách od expozice rifampicinem. Naopak u mutantních buněk Δrbn byla tato hladina stabilní po maximální dobu měření, tedy 30 minut od expozice rifampicinem (grafické znázornění **B**). **(C)** Během stacionární fáze růstu nebyla pozorována žádná degradace 6S RNA u divokého kmene ani u buněk Δrbn (grafické znázornění **D**). Upraveno a převzato z: (Hua *et al.*, 2016)

4 MS1

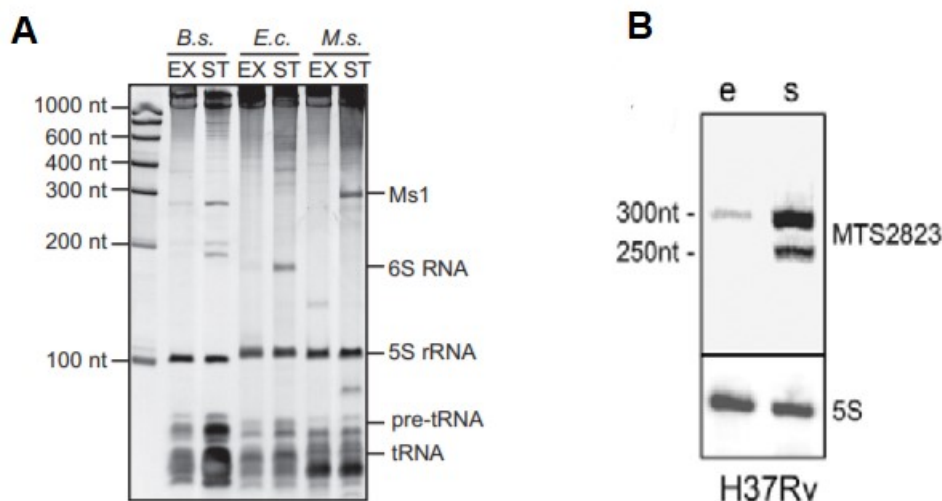
Nedávno byla u modelového organismu *M. smegmatis* identifikována nová nekódující sRNA – Ms1 o délce ~300nt. Ms1 je vysoce abundantní během stacionární fáze růstu (její množství se zvýší ~115x oproti exponenciální fázi). Ms1 interaguje s jádrem RNAP, ale bez přítomnosti jakéhokoliv primárního faktoru σ^A nebo jiného faktoru sigma. Způsob interakce se tak liší od 6S RNA, která interaguje s holoenzymem RNAP obsahujícím navázaný faktor sigma (Hnilicová *et al.*, 2014; Šiková *et al.*, 2019).

Ms1 má podobnou sekundární strukturu jako 6S RNA, tvořenou dvouřetězcovou vlásenkou s centrální bublinou, která je esenciální pro interakci s RNAP. Na 5' a 3' konci nacházíme dvě krátké vlásenky (Šiková *et al.*, 2019).



Existence dalších homologů Ms1 RNA se předpokládá také u jiných mykobakterií a aktinobakterií. Avšak Ms1 nebyla izolována/identifikována u modelových organismů *E. coli* ani *B. subtilis* v žádné fázi buněčného růstu (**Obrázek 22A**) (Hnilicová *et al.*, 2014). Transkripční analýzou a metodou Northern blot byl u *M. tuberculosis* objeven

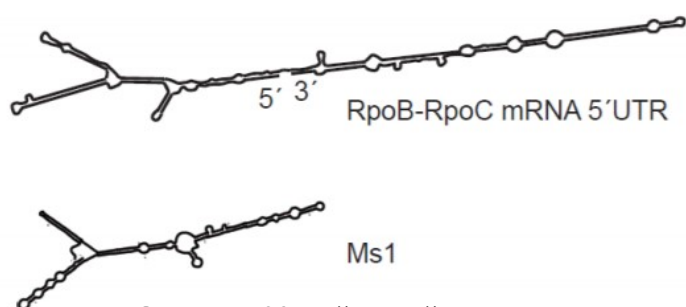
homolog Ms1 (pojmenovaný jako MTS2823) o délce ~300nt, kumulující se převážně během stacionární fáze růstu (**Obrázek 22B**); (Arnvig *et al.*, 2011).



Obrázek 22: Objevení nové nekódující RNA – Ms1: (A) PAGE gel obarvený pomocí GelRed znázorňuje celkové množství RNA izolované od *B. subtilis*, *E. coli* a *M. smegmatis* během exponenciální a stacionární fáze růstu. Množství izolované Ms1 u *M. smegmatis* odpovídá množství 6S RNA izolované u *B. subtilis* a *E. coli* během stacionární fáze růstu. Převzato z: (Hnilicová *et al.*, 2014). (B) Metodou Northern blot byl u *M. tuberculosis* izolován pravděpodobný homolog Ms1 s názvem MTS2823, vysoce abundantní během stacionární fáze růstu. Převzato z: (Arnvig *et al.*, 2011).

Ms1 má vliv na intracelulární množství RNAP. Jeho nepřítomnost snižuje produkci mRNA zodpovědné za syntézu podjednotek β a β' RNAP, což se projeví na množství proteinu (**Obrázek 24**); (Šiková *et al.*, 2019).

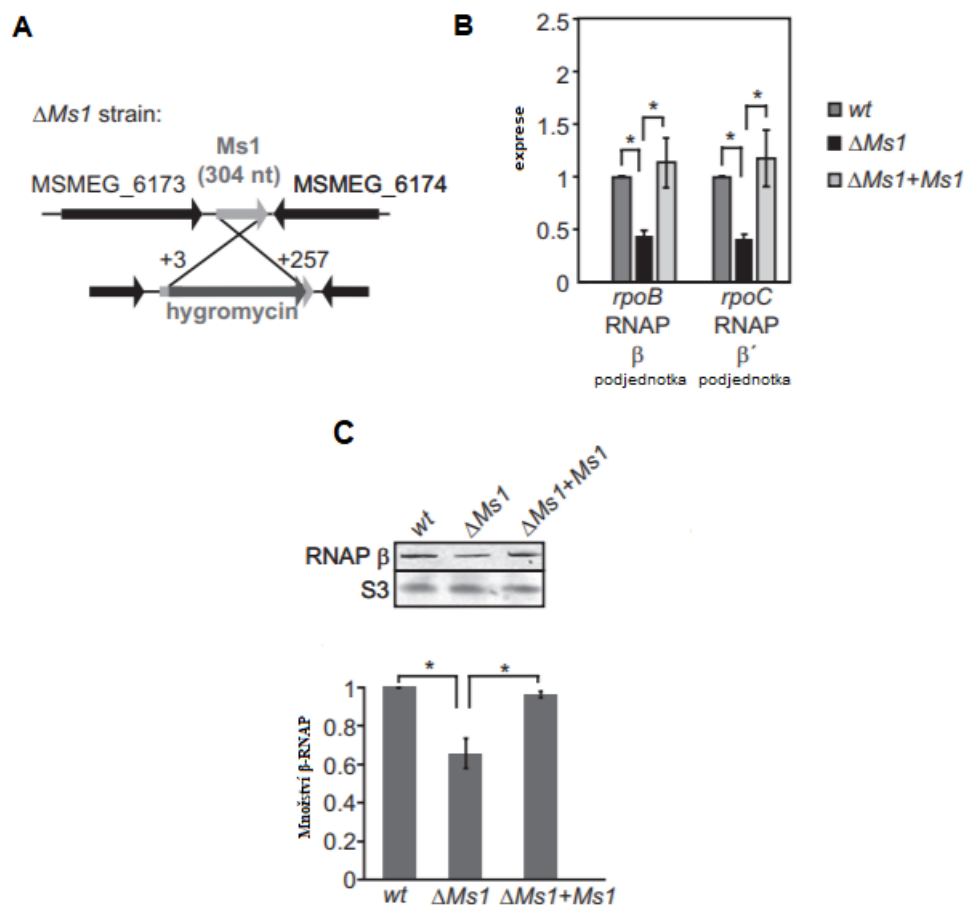
Podjednotky β a β' jsou kódovány geny *rpoB* a *rpoC* a jsou transkribovány



Obrázek 23: Předpovězená sekundární struktura RpoB-RpoC 5'UTR mRNA a porovnání se sekundární strukturou Ms1

z jednoho operonu. Tento operon má u mykobakterií neobvykle dlouhou *rpoB-rpoC* 5'UTR. Neobvykle dlouhá 5'UTR u *rpoB-rpoC* operonu byla objevena

také pomocí RNA-seq experimentů u *M. tuberculosis*. (Arnvig *et al.*, 2011). Jedna část operonu *rpoB-rpoC* 5'UTR strukturně připomíná Ms1.

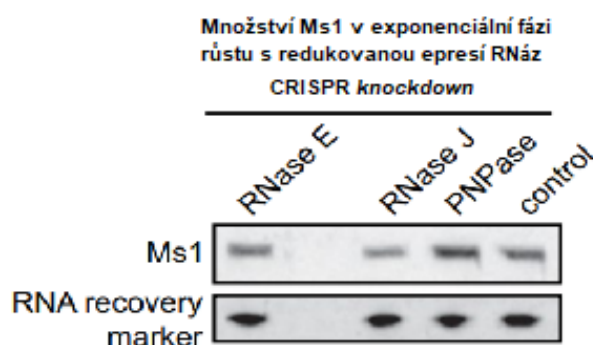


Obrázek 24: Ms1 má vliv na množství RNAP během stacionární fáze růstu: (A) Struktura kmene $\Delta Ms1$, založená na deleci 255 nukleotidů z 304 nt dlouhého genu Ms1. Oblasti +3 až +257 byla nahrazena hygromycin-rezistentní kazetou. **(B)** Metodou qPCR byla změřena exprese genů *rpoB* a *rpoC* kódující podjednotky β a β' RNAP u: divokého kmene (*wt*), kmene $\Delta Ms1$ a $\Delta Ms1+Ms1$ (kmen složený z plasmidu nesoucí kopii Ms1 pod kontrolou jeho nativním promotorem). U kmene $\Delta Ms1$ došlo k snížení exprese genů *rpoB* a *rpoC*. **(C)** Kvantifikace RNAP metodou Western Blot za použití protilátky proti podjednotce β -RNAP. Kmen $\Delta Ms1$ byl nasycen RNAP přibližně z 70% v porovnání s *wt*. Jinými slovy, nepřítomnost Ms1 během stacionární fáze snižuje množství RNAP až o 30%. Přidáním kopie Ms1 ($\Delta Ms1+Ms1$) došlo k obnovení hladin RNAP a tedy mezi $\Delta Ms1+Ms1$ a *wt* nebyly pozorované žádné rozdíly. Jako kontrola byl použit ribozomální protein S3. Upraveno a převzato z: (Šiková *et al.*, 2019).

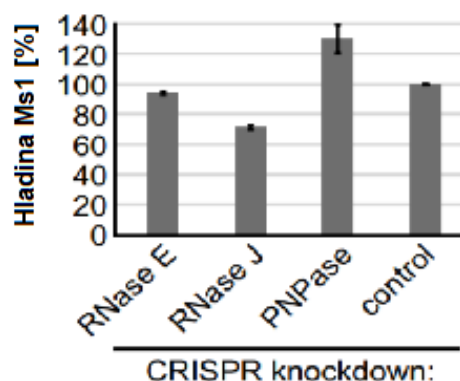
Bylo zjištěno, že rozdílná akumulace Ms1 během stacionární a exponenciální fáze růstu je ovlivněna přítomností ribonukleázy PNPázy. Expresa PNPázy s 3' – 5' fosforolytickou aktivitou je během exponenciální fáze růstu zvýšena přibližně 20x. Během exponenciální fáze se zvyšuje také hladina RNázy E (28x) a RNázy J (8x). Pro ověření, která ribonukleáza má vliv na degradaci Ms1 *in vivo*, byly pomocí

metody CRISPR připraveny kmeny s deplecí RNázy J, RNázy E a PNPázy během exponenciální fáze růstu. Ms1 byla izolována metodou Northern blot a následně kvantifikována. Bylo zjištěno, že RNáza E a RNáza J nezvýšila hladinu Ms1. Naopak deplecí PNPázy se zvýšila hladina Ms1 přibližně o 30%. Předpokládalo se však, že po depleci PNPázy budou hladiny Ms1 výrazně vyšší než 30%. Kromě PNPázy se tedy pravděpodobně na degradaci Ms1 podílí i jiná ribonukleáza nebo RNA helikáza (Šiková *et al.*, 2019).

A



B



Obrázek 25: PNPáza se podílí na regulaci exprese Ms1: (A) Metodou Northern Blot byla izolována Ms1 RNA z exponenciální fáze růstu, po CRISPR depleci enzymů: RNázy E, RNázy J a PNPázy. Pro kontrolu efektivity izolace RNA byl přidán RNA *recovery* marker (6S RNA z *B.subtilis*). (B) Následně byla hladina Ms1 kvantifikována. Deplece RNázy E ani RNázy J neměla vliv na zvýšení hladiny Ms1 během exponenciální fáze růstu. Naopak deplecí PNPázy se zvýšila hladina Ms1 přibližně o 30%. Převzato z: (Šiková *et al.*, 2019).

Shrnutě, Ms1 je nový typ nekódující sRNA, která interaguje s RNAP a ovlivňuje její množství. Mechanismus, jakým Ms1 reguluje expresi RNAP podjednotek však není doposud znám. V této diplomové práci přispívám k objasnění funkce Ms1 v roli regulace mykobakteriální transkripce.

MATERIÁL A METODIKA

4.1 Přístroje

Centrifugy

- ❖ Universal 320 R (HETTICH) – chlazená stolní centrifuga, výměnné rotory, max. otáčky 15000 rpm
- ❖ Mini – Centrifuge (ROTILABO®) – stolní centrifuga o maximálních otáčkách 600 rpm
- ❖ Microfuge 20R (BECKMAN COULTER) – chlazená stolní centrifuga pro mikrozkušavky, max. otáčky 15 000 rpm

Termostaty

- ❖ Thermostat BT – 120 (LAB SYSTEM)
- ❖ Thermo Shaker TS – 100 C (BIOSAN) – blokový termostat (pro mikrozkušavky)
- ❖ Thermostat 5320 (EPPENDORF) – blokový termostat (pro mikrozkušavky)

Třepačky

- ❖ Grant Bio PTR – 30 (P – LAB) – stolní třepačky s možností výběru programu
- ❖ Mini Rocker MR – 1 (BIOSAN) – překlopná stolní třepačka
- ❖ Horizontální třepačka HS250 BS1 (IKA LABORATORTECHNIK)

Elektroforézy, zdroje napětí

- ❖ Owl™ EasyCast B1A Mini Gel Electrophoresis System (THERMO SCIENTIFIC) – horizontální elektroforéza
- ❖ XCell SureLock™ Mini Cell Electrophoresis System (NOVEX) – vertikální elektroforéza
- ❖ Enduro 300V Power Supplies (LABNET INC.) – zdroj napětí
- ❖ Power Pac 3000 (BIO RAD) – zdroj napětí
- ❖ Mini Protean 3 Cell Electrophoresis System (BIO-RAD) – vertikální elektroforéza vhodná pro Western Blot

Další přístroje

- ❖ UP200S ultrasonic device (Hielscher)
- ❖ Vortex Genie 2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)
- ❖ UV – 1601PC UV – Visible (SHIMADZU) - spektrofotometr
- ❖ Ingenius (SYNGEN) – kamerový systém
- ❖ Gene Pulser XCell (BIO-RAD) - elektroporátor
- ❖ EG 2200 (KERN) – analytické váhy
- ❖ Termocykler MJ Research PTC-200
- ❖ Odyssey reader 9120 (LI-COR Biosciences)

4.2 Chemikálie a enzymy

V následující tabulce (**Tabulka 1**) uvádím nejčastěji používané chemikálie. Všechny použité chemikálie, média a enzymy jsou uvedeny v popisech postupů jednotlivých metod.

Tabulka 1: Seznam nejčastěji používaných chemikálií

Seznam nejčastěji používaných chemikálií, enzymů a dalších	
Název	Firma
Sterilní H ₂ O	Braun
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Coomassie brilliant blue R - 250	Thermo scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	NEB
Ethanol 96%	Penta
Formaldehyd	Applichem
GelRed	Bio-Rad
Glycerol	Sigma
Glycin	Serva
KCl (Chlorid draselný)	Penta
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	P-LAB
Tween 80	Sigma
Tris-HCl	Serva
Spektinomycin	Serva
Streptomycin	Serva
Kanamycin	Serva
T4 DNA ligáza	Takara
NaCl (Chlorid sodný)	Lach-ner
5x GC pufr	NEB
dNTP - ATP, CTP, GTP, UTP	Roche
Phusion® High-Fidelity DNA Polymeráza	NEB
6x Loading Dye	Biolabs
Restrikční enzymy (Sca I, Nde I, Hind III, Xho I)	Takara
Cutsmart pufr	Biolabs
10x ligační pufr	Takara
MgCl ₂ (Chlorid hořečnatý)	Penta
DTT (Dithiotreitol)	Thermo scientific
Proteázové inhibitory	Calbiochem
3x FLAG peptid	Sigma Aldrich
PBS (Phosphate-buffered saline)	Sigma
Reverse Mass DNA Ladder marker	Biolabs
10x SAP pufr	Takara
SAP (Shrimp alkaline phosphatase)	Takara
5x GoTaq pufr	Promega
GoTaq polymeraza	Promega
EDTA (ethylendiamintetraoctová kys.)	Lachema

Přehled používaných pufrů

❖ Lysis pufr

- 20 mM Tris (pH 7,9)
- 150 mM KCl
- 1mM MgCl₂
- 0,5 mM DTT
- 0,5 mM PMSF

❖ Western pufr

- 25 mM Tris-Cl (pH 8,3)
- 195 mM glycin
- 20 % metanol

❖ 1x TAE

- 2 M Tris-acetát
- 50 mM EDTA (pH 8.0)

❖ Bradfordovo činidlo

- 100 mg Coomasie Brilliant Blue G -250
- 100 ml 8,5 % H₃PO₄
- 50 ml 96% ethanolu
- ddH₂O (do 1 litru)

❖ Z pufr 1

- 0,06 M Na₂HPO₄ *12H₂O
- 0.04 M NaH₂PO₄*2H₂O
- 0.001 M MgSO₄*7H₂O
- 0,01 M KCl

4.3 Bakteriální kmeny

V následujících tabulkách uvádím seznam použitých bakteriálních kmenů.

Tabulka 2 Seznam použitých kmenů *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>			
Číslo	Kmen	Genotyp	Zdroj
LK1249	1249/pSM128	DH5α pSM128	(Dussurget <i>et al.</i> , 1999)
LK1886	1886/pTetInt-dCas9	DH5α pTetInt-dCas9	(Choudhary <i>et al.</i> , 2015)
LK2151	2151/SigA-FLAG-pTetINT	DH5α pTetINT SigA-FLAG	Jarmila Hnilicová
LK2369	2369/ pSM128+P _{rpoB} (-295 +9)	DH5α pSM128 P _{rpoB} (-295 +9)	Agnieszka Sude
LK2370	2370/pSM128+P _{rpoB} (-242 +9)	DH5α pSM128 P _{rpoB} (-242 +9)	Agnieszka Sude
LK2371	2371/pSM128+P _{rpoB} (-222 +9)	DH5α pSM128 P _{rpoB} (-222 +9)	Agnieszka Sude
LK2410	2410/pSM128+P _{rpoB} (-375 +9)	DH5α pSM128 P _{rpoB} (-375 +9)	Jarmila Hnilicová
LK2449	2449/SigAC-FLAG-pTetINT	DH5α pTetINT SigAC-FLAG	Tato práce
LK2526	2526/MoaB2-FLAG-pTetINT	DH5α pTetINT MoaB2-FLAG	Tato práce
LK2527	2527/CarD-FLAG-pTetINT	DH5α pTetINT CarD-FLAG	Tato práce
LK2528	2528/RbpA-FLAG-pTetINT	DH5α pTetINT RbpA-FLAG	Tato práce

Pozn.: *Tato práce* - příprava kmenů probíhala ve spolupráci s pracovníky Laboratoře mikrobiální genetiky a genové exprese, konkrétně: Jarmila Hnilicová, Michaela Šíková, Martina Janoušková

Tabulka 3 Seznam použitých kmenů *Mycobacterium smegmatis*

<i>Mycobacterium smegmatis</i>			
Číslo	Kmen	Genotyp	Zdroj
LK865	865/ <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt	Sarka Nebezdova Bobková
LK1442	1442/pSM128	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pSM128	Dragana Vítovská
LK1611	1611/ <i>M. smegmatis</i> ΔMs1	<i>M. smegmatis</i> ΔMs1	Martina Janoušková
LK1468	1468/ <i>rpoB</i> -FLAG-Das+pTe	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt <i>rpoB</i> -FLAG-Das pTe	(Schmappinger, 2011)
LK2073	2073/SigA-FLAG-pTetINT	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pTetINT SigA-FLAG	Jarmila Hnilicová
LK2360	2360/pSM128+P _{rpoB} (-242 +9)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pSM128 P _{rpoB} (-242 +9)	Agnieszka Sude
LK2362	2362/pSM128+P _{rpoB} (-242 +9)	<i>M. smegmatis</i> ΔMs1 pSM128 P _{rpoB} (-242 +9)	Agnieszka Sude
LK2364	2364/pSM128+P _{rpoB} (-222 +9)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pSM128 P _{rpoB} (-222 +9)	Agnieszka Sude
LK2366	2366/pSM128+P _{rpoB} (-222 +9)	<i>M. smegmatis</i> ΔMs1 pSM128 P _{rpoB} (-222 +9)	Agnieszka Sude
LK2418	2418/pSM128+P _{rpoB} (-295 +9)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pSM128 P _{rpoB} (-295 +9)	Agnieszka Sude
LK2358	2358/pSM128+P _{rpoB} (-295 +9)	<i>M. smegmatis</i> ΔMs1 pSM128 P _{rpoB} (-295 +9)	Agnieszka Sude
LK2421	2421/pSM128+P _{rpoB} (-375 +9)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pSM128 P _{rpoB} (-375 +9)	Tato práce
LK2585	2585/pSM128+P _{rpoB} (-375 +9)	<i>M. smegmatis</i> ΔMs1 pSM128 P _{rpoB} (-375 +9)	Tato práce
LK2463	2463/SigAC-FLAG-pTetINT	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pTetINT SigAC-FLAG	Tato práce
LK2539	2539/CarD-FLAG-pTetINT	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pTetINT CarD-FLAG	Tato práce
LK2541	2541/RbpA-FLAG-pTetINT	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pTetINT RbpA-FLAG	Tato práce
LK2543	2543/MoaB2-FLAG-pTetINT	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 wt pTetINT MoaB2-FLAG	Tato práce

Pozn.: *Tato práce* - příprava kmenů probíhala ve spolupráci s pracovníky Laboratoře mikrobiální genetiky a genové exprese, konkrétně: Jarmila Hnilicová, Michaela Šíková, Martina Janoušková

4.4 Primery

V Tabulce 4 uvádím seznam použitých primerů.

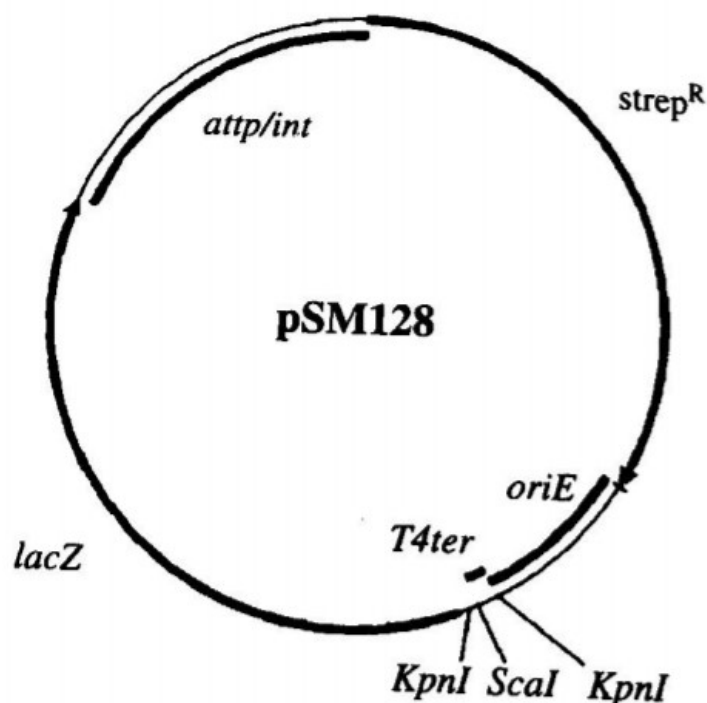
Tabulka 4: Seznam použitých primerů

Číslo	Název oligonukleotidu	Sekvence
Primery pro přípravu FLAG-značených proteinů		
2340	MSMEG2758_R / (MS_SigAdelN_FLAG_R)	tgTTAAATTAACCTactgtcgtcgtccttagtccaggtagtcgcgagcac
2894	MS_RbpA_FLAG_F	attcCATAATGGCTGATCGTGTCCCTGCGGGGC
2895	MS_RbpA_FLAG_R	cgtAAGCTTCTActgtcgtcgtccttgaGCTTCCGGTTCCGCGCCGCTT
2896	MS_CarD_FLAG_F	attcCAT ATGattttaaggftcggagacacc
2897	MS_CarD_FLAG_R	cgtAAGCTTCTActgtcgtcgtccttggaggcggggcccaaacctc
2901	MS_SigAdelN_FLAG_F	attcCATAATGgcatcggccgactcgggtcgc
3146	MSmoaB2FLAGNF	ATTCCATATGgactacaaggagcagcagaagATGGCCGCACCCGCTGTCCGCCGAGC
3147	MSmoaB2FLAGNR	CGTTCTAGACTAGATCTCCAAGCTTGATAGCTG
Primery pro přípravu promotorových inzertů genu <i>rpoB</i>		
2781	PrpoB_mezgen_F	gagggtcccaagcaggcgt
2782	PrpoB_mezgen_R2	cggcattcgcggatctctg
2783	PrpoB_375_F	ggtggaaagtcacgcgagcgg
2784	PrpoB_295_F	gttgggagcatgttcgaac
2785	PrpoB_240_F	cagctcatgcgccgaggggg
Primery pro metodu 5 RACE		
2811	MS_rpoB_RACE	ctgggacggagttattggtg

4.5 Vektory

4.5.1 Plazmid pSM128

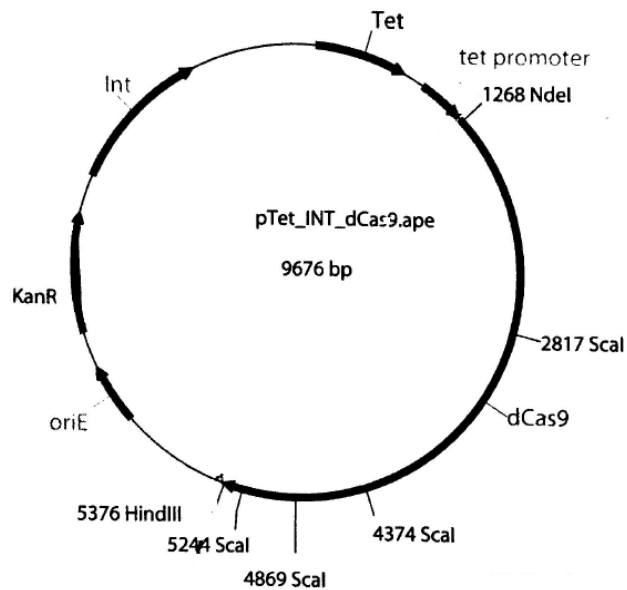
Tento reportérový plazmid byl zkonstruovaný Dussurgetem a kol. (1999) a běžně se používá pro měření genové exprese u mykobakterií. Je tvořen replikačním počátkem *oriE*, který umožňuje replikaci v *E. coli*. Dále obsahuje gen pro rezistenci na spektinomycin (*E. coli*) / streptomycin (*M. smegmatis*), *lacZ* bez promotoru a restrikční místa *KpnI* a *ScaI*. Po transformaci vektoru do *M. smegmatis* dochází k integraci přes *attB* oblast v chromozomu.



Obrázek 26: Schéma vektoru pSM128 (Caroll a James, 2009)

4.5.2 Plazmid pTet INT

Integrativní plazmid o velikosti 9676 bp. Tento vektor obsahuje restrikční místa pro štěpení endonukleázami *ScaI* a *Hind III*. Dále je tvořen genem pro rezistenci ke kanamycinu.



Obrázek 27 Schéma vektoru pTet INT

4.6 Kultivace bakterií

4.6.1 *Mycobacterium smegmatis*

Přístroje:

- ❖ Termostat BT – 120 (LAB SYSTEM)
- ❖ Laboratorní analytické váhy EG 2200 (KERN)
- ❖ Vortex (GENIE 2)
- ❖ Chlazená stolní centrifuga UNIVERSAL 320 R (HETTICH)
- ❖ Spektrofotometr UV – 1601PC UV – VISIBLE (SHIMADZU)
- ❖ Horizontální třpačka HS250 BSK1 (IKA LABORORTECHNIK)

Kultivační média:

- 1) Tekuté kultivační médium 7H9 s glycerolem

Tabulka 5: Složení tekutého kultivačního média pro mykobakterie

KULTIVAČNÍ MÉDIUM 7H9 S GLYCEROLEM	
Difco tm Middlebrook 7H9 Broth	4,7 g
Glycerol (100 %)	2 ml
ddH ₂ O	900 ml

2) Tuhé agarové médium 7H10 s glycerolem

Tabulka 6: Složení tuhého agarového média pro kultivaci mykobakterií

KULTIVAČNÍ MÉDIUM 7H10 S GLYCEROLEM	
Difco tm Middlebrook 7H10 Agar	19 g
Glycerol (100 %)	5 ml
ddH ₂ O	900 ml

Příprava kultivačního média:

- ❖ Podle **Tabulky 5** byly jednotlivé komponenty smíchány v láhvi tak, že došlo k rozpuštění prášku.
- ❖ Stejně tak bylo namícháno pevné agarové médium 7H10 s glycerolem (**Tabulka 6**).
- ❖ Následně byly nádoby s médiem autoklávovány a nechány vychladnout.

Postup kultivace:

- ❖ Bakteriální kmen, uložený v glycerinových konzervách (skladované při teplotě -80°C), byl pomocí sterilní kličky rozetřen na Petriho misku s pevným agarovým médiem 7H10 a příslušným antibiotikem. Následně byl inkubován při teplotě 37 °C, 3 dny.
- ❖ Poté bylo do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml přidáno 25 ml 7H9 média a 62,5 µl 20% Tweenu 80 (2,5 µl na 1 ml kultivačního média), který slouží jako prevence proti agregaci bakterií. Do takto připravených baněk byl sterilní kličkou resuspendován bakteriální kmen *M. smegmatis* z Petriho misky.
- ❖ Kultura byla kultivována v termostatu a na třepačce při teplotě 37 °C, přes noc
- ❖ Následně byla změřena optická denzita na UV-spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.
- ❖ Poté bylo do Erlenmayerovy baňky o objemu 300 ml přidáno 100 ml 7H9 média a 250 µl 20 % Tweenu 80. Následně byl napipetován příslušný objem

mykobakterií, který odpovídal $OD_{600} 0,1 \text{ cm}^{-1}$. Připravené baňky s kulturami se daly třepat na třepačku do termostatu při $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

- ❖ Po třech hodinách bylo ke vzorkům exponenciální fáze růstu přidáno 10 ng/ml anhydrotetracyklinu (ATC) Poté probíhala kultivace další 3 hodiny při teplotě 37°C .
- ❖ Následně byly kultury stočeny ve vychlazené centrifuze na 9 000 rpm, 4°C , po dobu 10 min. Buňky byly resuspendovány v 5 ml Lysis pufru a opět stočeny při 9 000 rpm, 4°C , 10 min. Následně byly kultury zamrazeny při teplotě $-70 \text{ }^\circ\text{C}$
- ❖ Po 7-10 hodinách růstu bylo ke kulturám stacionární fáze přidáno 10 ng/ml ATC. Poté byly buňky kultivovány přes noc při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$.
- ❖ Následně byly kultury stočeny (po 24 hodinách růstu) ve vychlazené centrifuze při 9 000 rpm, 4°C , 10 min. Buňky byly resuspendovány v 5 ml Lysis pufru a opět stočeny při 9 000 rpm, 4°C , po dobu 10 min. Následně byly kultury zamrazeny při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.6.2 *Escherichia coli*

Přístroje:

- ❖ Termostat BT – 120
- ❖ Laboratorní analytické váhy EG 2200 (KERN)
- ❖ Vortex (GENIE 2)
- ❖ Chlazená stolní centrifuga UNIVERSAL 320 R (HETTICH)
- ❖ Spektrofotometr UV – 1601PC UV – VISIBLE (SHIMADZU)
- ❖ Horizontální třepačka HS250 BSK1 (IKA LABORORTECHNIK)

Kultivační média:

Tabulka 7: Složené LB média pro kultivaci *Escherichie coli*

KULTIVAČNÍ MÉDIUM Luria – Bartoni (LB)	
trypton	10 g
NaCl	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
ddH ₂ O	1 000 ml

Postup kultivace:

- Bakterie z glycerinové konzervy (skladované při teplotě -80°C) byly zaočkovány do 10 ml LB média společně se spektinomycinem ($100\ \mu\text{g/ml}$) a následně byly inkubovány přes noc při teplotě 37°C na třepačce.
- ❖ Poté byly kultury stočeny při 9 000 rpm, 10 minut při teplotě 4°C a zmrazeny při teplotě -80°C .

4.7 Měření optické denzity

Tato metoda slouží k určení koncentrace buněk v suspenzi na základě měření intenzity dopadajícího světla neabsorbovaného vzorkem. Množství absorbovaného záření je úměrné koncentraci látky (buněk) ve vzorku.

Přístroje:

- ❖ Spektrofotometr UV – 1601PC UV – VISIBLE (SHIMADZU)

Postup práce:

- ❖ Do kyvety bylo pipetováno 900 μl ddH₂O a 100 μl vzorku získaného kultivací.
- ❖ Jako blank sloužil 1 ml ddH₂O.
- ❖ Následně byla změřena absorbance všech kyvet na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.
- ❖ Na základě výsledku absorbancí jednotlivých vzorků byl podle **Rovnice 1** vypočítán objem kultury, který byl zaočkován do většího objemu kultivačního média (V_m) tak, aby OD₀ kultury odpovídala $0,1\ \text{cm}^{-1}$.

Rovnice 1: Výpočet optické denzity

$$x = \frac{V_m}{\text{OD}_{vz}/\text{OD}_{0,1}}$$

4.8 Příprava glycerinových konzerv

Díky glycerolu mohou být bakterie dlouhodobě skladovány při teplotě -80°C .

Přístroje:

- ❖ Termostat BT – 120 (LAB SYSTEM)

- ❖ Vortex (GENIE 2)

Postup práce:

- ❖ Bakteriální kolonie byla v příslušném kultivačním médiu s antibiotikem kultivována přes noc při teplotě 37 °C.
- ❖ Následně bylo 850 µl kultury přidáno k 150 µl 100% glycerolu a konzerva byla řádně promíchána na vortexu.
- ❖ Takto připravená glycerinová konzerva byla skladována při teplotě -80 °C.

4.9 Polymerázová řetězová reakce

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byly amplifikovány geny kódující transkripční regulátory RbpA, CarD, dále MoaB2, sigma A (*sigA*), sigma AC (*sigA* bez N-terminální domény). Jako templát v reakci sloužila genomická DNA *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 nebo plazmidová DNA s příslušným inzertem. Primery použité pro PCR reakce jsou uvedeny v **Tabulce 4**

Přístroje:

- ❖ Termocykler MJ Research PTC-200

Postup práce:

- ❖ Podle **Tabulky 8** byla namíchána reakční směs

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro PCR

Reakční směs PCR (50 µl)	
Templát	5 µl
Phusion 5x GC pufr (NEB)	10 µl
dNTPs 10nM	1 µl
DMSO (NEB)	1,5 µl
Sterilní H ₂ O (BRAUN)	31,5 µl
Reverzní primer	0,25 µl
Forward primer	0,25 µl
Phusion High-Fidelity DNA Polymeráza (NEB)	0,5 µl

- ❖ Následně byly zkumavky přeneseny do termocykleru a byl zvolen program PHUSION. Jednotlivé kroky tohoto programu jsou uvedeny v **Tabulce 9**

Tabulka 9: Program PCR PHUSION

PCR PHUSION program			
<i>Proces</i>	<i>Počet cyklů</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
Iniciace denaturace	1x	98°C	30 s
Denaturace		98°C	10 s
Annealing Elongace	30x	50°C	30 s
		72°C	2 min
Závěrečná elongace	1x	72°C	6 min
		4°C	∞

4.10 Horizontální gelová elektroforéza

Tato metoda je založena na separaci makromolekul (DNA po metodě PCR) v závislosti na jejich různé velikosti a náboji. DNA je záporně nabitá, a proto se v elektrickém poli pohybuje od katody k anodě.

Přístroje:

- ❖ Zdroj napětí PowerPack 3000 (Bio-Rad)
- ❖ Kamerový systém InGenius (Syngene)
- ❖ Horizontální elektroforéza Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems

Postup práce:

- ❖ V Erlenmayerově baňce bylo rozpuštěno 0,5 g agarózy v 50 ml 1x TAE pufru (2M Tris-acetát, 50mM EDTA, pH 8.0). Agaróza byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě.
- ❖ Poté byl roztok agarózy ochlazen proudem studené tekoucí vody pod teplotu cca 50 °C a následně bylo přidáno 5 µl GelRed (Bio-Rad).
- ❖ Roztok byl promíchán pro důkladné rozpuštění fluorescenční barvy a přelit do elektroforetické aparatury.
- ❖ Následně byl do tekutého gelu osazen hřebínek vytvářející komůrky pro nanášení vzorků a gel se nechal ztuhnout cca 30 min.
- ❖ Do elektroforetické aparatury byl nalit pufr 1x TAE, do něhož byly ponořeny elektrody i ztuhnutý gel a hřebínek byl opatrně vyjmut z gelu.

- ❖ Poté bylo do jednotlivých komůrek nanášeno: 5 µl marker Reverse Mass DNA Ladder (Biolabs) a 10 µl každého vzorku smíchaného s 1,6 µl 6x Loading Dye (Biolabs).
- ❖ Zdroj napájení byl zapnut na 120 V, po dobu 30 min.
- ❖ Gel se separovanou DNA byl poté analyzován pomocí kamerového systému s UV lampou.

4.11 Štěpení plazmidů

Abychom úspěšně klonovali získané inzerty DNA do jednotlivých plazmidů, bylo nutné plazmidy nejprve linearizovat. Plazmid pSM128 byl izolován z *E. coli*, kmen *LK1249* a plazmid pTetINT izolovaný z kmene *LK1886*.

Přístroje:

- ❖ Blokovaný termostat THERMO SHAKER TS – 100 C (BIOSAN)

Postup práce:

- ❖ Byla vytvořena reakční směs, uvedená v tabulkách: **Tabulka 10 a 11**.
- ❖ Zkumavky byly vloženy do termostatu a štěpení probíhalo při 37 °C, 1 hodinu.
- ❖ Vzorek se štěpeným plazmidem pSM128 byl separován pomocí horizontální gelové elektroforézy (kapitola: *4.10 Horizontální gelová elektroforéza*) a poté izolován z gelu.
- ❖ Plazmid izolovaný z gelu byl přečištěn přes kolonku podle kapitoly: *4.13 Izolace DNA z agarózového gelu*.
- ❖ Další štěpené plazmidy byly také přečištěny přes kolonku podle postupu uvedeného v kapitole: *4.14 Čištění NK přes QIAgen kolonu*.

Tabulka 10: Reakční směs pro vektor pSM128

Plazmid pSM128 (40 μl)	
Cutsmart pufr (Biolabs)	4 μ l
Vektor	20 μ l
<i>ScaI</i> (TAKARA)	3 μ l
ddH ₂ O	13 μ l

Tabulka 11: Reakční směs pro vektor pTetINT

Plazmid pTetINT (40 μl)	
Cutsmart pufr (Biolabs)	4 μ l
Vektor	13 μ l
<i>NdeI</i> (Takara)	1 μ l
<i>ScaI</i> (Takara)	1 μ l
<i>HindIII</i> (Takara)	1 μ l
ddH ₂ O	20 μ l

4.12 TA klonování

V případě plazmidu pSM128 byl požadovaný inzert DNA klonován pomocí tzv. TA klonování. Tento proces je založen na principu komplementarity mezi adeninem a thyminem. Na 3' konci PCR produktu je převis jednoho adeninu, který se spojí s linearizovaným plazmidem nesoucím na svém 5' konci převis jednoho thyminu.

Přístroje:

- ❖ Termocykler MJ Research PTC-200

Postup práce:

- ❖ Byla namíchána reakční směs, uvedená v **Tabulce 12**.
- ❖ Zkumavka byla vložena do přístroje při teplotě 72 °C, 30 minut.
- ❖ Poté byl produkt přečištěn přes kolonku, na základě postupu uvedeného v kapitole: *4.14 Čištění NK přes QIAgen kolonu*.

Tabulka 12: Složení reakční směsi pro TA klonování

TA klonování (20 µl)	
5x GoTaq pufr (Biolabs)	3 µl
GoTaq Polymeráza (Promega)	0,8 µl
10 nM dATP/dTTP	0,6 µl
ddH ₂ O	15,6 µl

4.13 Izolace DNA z agarózového gelu

Větší množství produktů PCR reakce může vzniknout při méně častých nespecifických interakcích primerů s DNA. Pomocí izolace DNA z gelu jsme schopni získat band o správné velikosti. Izolace byla provedena u plazmidu pTetINT.

K izolaci DNA ze vzorku byl použit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagene)

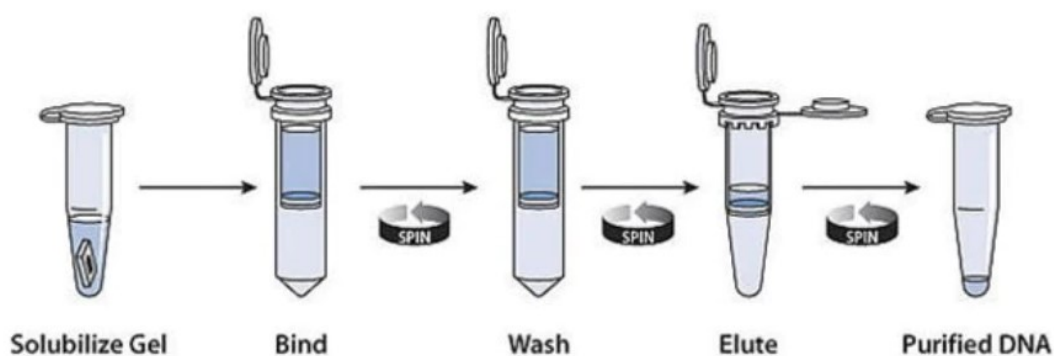
Přístroje:

- ❖ Blokový termostat THERMO SHAKER TS – 100 C (BIOSAN)
- ❖ Laboratorní analytické váhy EG 2200 (KERN)
- ❖ Vortex (GENIE 2)
- ❖ Stolní centrifuga MICROFUGE 20R (BECKMAN COMLTER)

Postup práce:

- Gel získaný horizontální gelovou elektroforézou byl pomocí UV lampy osvětlen a následně byl z gelu sterilním skalpelem vyříznut proužek s DNA o potřebné velikosti a vložen do bezbarvé mikrozkušavky.
- Mikrozkušavka se vzorkem byla zvážena na analytických váhách.
- Následně byl ke vzorku přidán trojnásobný objem QC pufru vždy v závislosti na hmotnosti gelu (1 mg = 3 µl).
- Poté byl vzorek inkubován při teplotě 50 °C po dobu 10 minut. K lepšímu rozpuštění gelu byla mikrozkušavka občas vortexována.
- Po úplném rozpuštění gelu byl ke vzorku přidán isopropanol v poměru 1:1 (100 mg vzorku -> 100 µl isopropanolu) a vzorek byl promíchán.
- Roztok byl přepipetován do QIAquick kolonky a stočen při 13000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.

- Část vzorku proteklá přes kolonku byla slita a následně bylo přidáno 0,5 ml QC pufru a kolona se centrifugovala při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- Proteklá část byla opět slita a následně bylo přidáno 0,75 ml PE pufru a kolona byla opět stočena při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- Následně byla prázdná QIAquick zkumavka stočena při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- Kolonka byla přenesena do čisté mikrozkušavky a do středu membrány bylo pipetováno 30 µl elučního pufru EB.
- Následně byl vzorek inkubován 1 minutu a poté centrifugován při 13000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.



Obrázek 28 Izolace DNA z agarózového gelu (převzato z manuálu PureLink® Quick Gel Extraction Kit)

4.14 Čištění NK přes QIAGEN kolonu

Pro pročištění PCR produktů následuje jejich purifikace přes QIAquick kolonu. Tímto procesem jsou jedno nebo dvouřetězcové fragmenty DNA z PCR pročištěny od primerů, polymeráz, solí a nukleotidů.

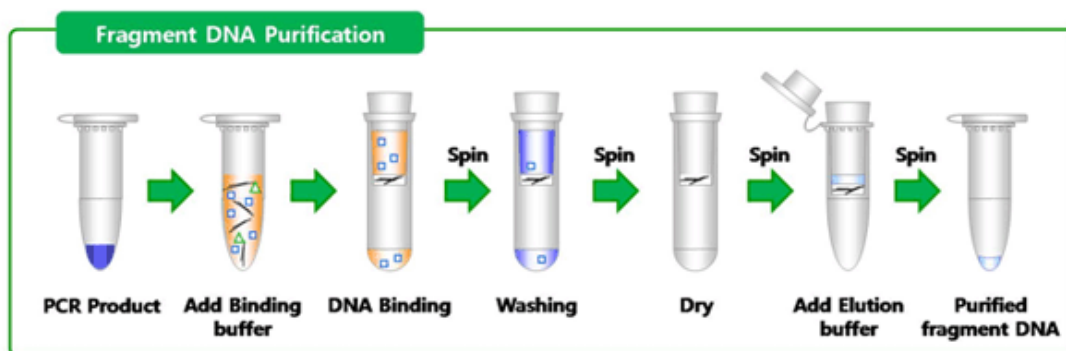
K purifikaci byl použit QIAquick PCR purification kit

Přístroje:

- ❖ Stolní centrifuga MICROFUGE 20R (BECKMAN COMLTER)
- ❖ Vortex (GENIE 2)

Postup práce:

- ❖ Ke vzorku s PCR produkty byl přidán PB pufru v poměru 1:5 a zkumavka byla promíchána (100 µl PCR produktu -> 500 µl pufru PB).
- ❖ Následně byl vzorek přepipetován do QIAquick kolonky se zkumavkou a stočen při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- ❖ Část vzorku proteklá přes kolonu byla slita a následně bylo přidáno 0,75 ml promývacího pufru PE a stočena při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- ❖ Proteklá část byla opět slita a QIAquick kolonka opět vložena do stejné zkumavky a pro úplné odstranění promývacího pufru stočena na prázdno na 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- ❖ Po stočení byla QIAquick kolonka přenesena do čisté mikrozskumavky.
- ❖ Do středu QIAquick membrány bylo pipetováno 50 µl elučního pufru EB a inkubováno 1 minutu.
- ❖ Následně byla kolona centrifugována při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.



Obrázek 29 Přečištění PCR produktů přes QIAgen kolonku (převzato z manuálu AccuPrep® PCR Purification Kit)

4.15 Ligace

Integrovaní inzertu do vektoru se provádí pomocí tzv. ligace. DNA inzert byl ligován s příslušnými plazmidy: pTetINT a pSM128. Jako kontrola byl použit štěpený plazmid bez DNA inzertu. Pro ligační reakci byla použita T4 DNA ligáza a ligační pufr (TAKARA).

Přístroje:

- ❖ Blokovaný termostat THERMO SHAKER TS-100 C (BIOSAN)

Postup práce:

- ❖ Podle **Tabulky 13** byla vytvořena ligační směs. Štěpený plazmid byl v reakční směsi připraven v poměru 1:5 ve prospěch inzertu.
- ❖ Zkumavky s ligační směsí byly vloženy do blokového termostatu a reakce probíhala přes noc při teplotě 16 °C.

Tabulka 13: Složení ligační směsi

Ligace (10 µl reakce)	
DNA inzert	1 µl
Štěpený plazmid	2 µl
10x ligační pufr (TAKARA)	1 µl
T4 DNA ligáza (TAKARA)	1 µl
ddH ₂ O	5 µl

4.16 Transformace do buněk *E. coli*

Ligační směs byla pomocí šokového zmrazení transformována do kompetentních buněk *E. coli* DH5α. Pro ověření úspěšnosti transformace, byl do kompetentních buněk transformován prázdný vektor. Jako negativní kontrola sloužily kompetentní buňky *E. coli* bez DNA inzertu, které v případě správně provedené transformace nerostou na agarové půdě se zvoleným antibiotikem. Transformace probíhala na ledě při sterilních podmínkách (mimo jiné použitím špiček s filtrem).

Přístroje:

- ❖ Blokový termostat THERMO SHAKER TS – 100 C (BIOSAN)
- ❖ Termostat BT-120 (LAB SYSTEM)
- ❖ Horizontální třepačka HS250 BSK1 (IKA LABORATORTECHNIK)
- ❖ Stolní centrifuga MICROFUGE 20R (BECKMAN COMLTER)

Postup práce:

- ❖ Kompetentních buňky *E. coli* DH5α uložené v mrazáku při teplotě -80 °C byly rozmrazeny na ledu po dobu 15 minut.
- ❖ Do vychlazených zkumavek byla přidána celá ligační směs a 100 µl kompetentních buněk. Také byla připravena negativní kontrola ze 100 µl kompetentních buněk.
- ❖ Zkumavky byly opatrně promíchány a následně inkubovány 30 min na ledu.

- ❖ Poté byly zkumavky vloženy do termostatu (BIOSAN) a byl proveden *heat shock* (šokové zahřátí při teplotě 42 °C, 90 sekund).
- ❖ Následně byly vzorky inkubovány na ledu 3 – 5 minut.
- ❖ Poté bylo do všech zkumavek pipetováno 1 ml LB média bez antibiotika a inkubováno na třepačce v termostatu při teplotě 37 °C, 60 min.
- ❖ Po inkubaci byly vzorky krátce stočeny a většina supernatantu odstraněna. Buňky byly resuspendovány v 1/3 zbylého média.
- ❖ Na zahřáté plotny z LB média se spektinomycinem (100 µg/ml) bylo za sterilních podmínek rozetřeno zbylé množství buněk.
- ❖ Petriho misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C přes noc.

4.17 Izolace DNA metodou Miniprep

Lyzáty vzorků byly pipetovány do silikagelových kolonek, na které se při vysokých koncentracích solí selektivně vážou molekuly DNA. Aby byly odstraněny kontaminující látky, je navázaná DNA promývána a poté čistá plazmidová DNA eluována do elučního pufru nebo vody.

K izolaci DNA byl použit komerčně dodávaný QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Přístroje:

- ❖ Horizontální třepačka HS250 BSK1 (IKA LABORATORTECHNIK)
- ❖ Termostat BT-120 (LAB SYSTEM)
- ❖ Stolní centrifuga MICROFUGE 20R (BECKMAN COMLTER)

Postup práce:

- ❖ Z narostlých kolonií na plotně získaných transformací byly vybrány celkem čtyři kolonie označené čísly 1 – 4.
- ❖ Tyto kolonie byly inokulovány do 5 ml LB média se spektinomycinem (100 µg/ml) a falkony byly inkubovány na třepačce v termostatu při 37 °C, přes noc.
- ❖ Následně byly kultury stočeny při 9 000 rpm, 10 minut při 4 °C.
- ❖ Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a bylo přidáno 250 µl pufru P1, buňky byly resuspendovány a pipetovány do mikrocentrifugační zkumavky.

- ❖ Poté bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru P2 a během 5 minut byly vzorky 6x promíchány otočením zkumavky.
- ❖ Ke směsi bylo přidáno 350 µl neutralizačního pufru N3 a zkumavky byly opět pomocí otočení 6x promíchány.
- ❖ Následně byly zkumavky stočeny při 13 000 rpm, 10 minut při pokojové teplotě.
- ❖ Po centrifugaci byl supernatant pipetován do QIAprep zkumavek a stočen při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- ❖ Část vzorku proteklá přes kolonu byla odstraněna a poté bylo do kolonky přidáno 0,5 ml promývacího pufru PB.
- ❖ Vzorky byly stočeny na 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě a proteklá část opět odstraněna.
- ❖ Následně bylo přidáno 0,75 ml promývacího pufru PE a kolonky stočeny při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě a proteklá část vzorku opět odstraněna.
- ❖ Pro úplné odstranění promývacího pufru byla QIAprep zkumavka opět stočena při 13 000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- ❖ Kolonka byla přenesena do čisté mikrozkušavky a do středu membrány bylo pipetováno 30 µl elučního pufru EB.
- ❖ Následně byl vzorek inkubován 1 minutu a poté centrifugován při 13000 rpm, 1 minutu při pokojové teplotě.
- ❖ Poté může být eluát DNA skladován při teplotě -20 °C.

4.18 Restrikční analýza

Pro ověření úspěšnosti klonování DNA inzertu do plazmidu byla provedena restrikční analýza. Štěpná reakce probíhala za použití stejných reakčních podmínek jako v případě přípravy linearizovaného plazmidu. Úspěšnost klonování byla následně ověřena sekvenováním.

Přístroje:

- ❖ Blokovaný termostat THERMO SHAKER TS – 100 C (BIOSAN)

Pracovní postup:

- ❖ Byla připravena reakční směs, uvedená v tabulkách: **Tabulka 10** a **11**.

- ❖ Zkumavky byly vloženy do blokového termostatu a štěpná reakce probíhala při 37 °C, 1 hodinu.
- ❖ Poté byly vzorky separovány na 1% agarózovém gelu pomocí horizontální gelové elektroforézy (4.10 Horizontální gelová elektroforéza).
- ❖ U vzorků s úspěšně klonovaným inzertem DNA byla změřena koncentrace na nanodropu a vzorky byly sekvenovány.
- ❖ Z kolonií obsahující klonovaný inzert byly vytvořeny glycerinové konzervy.

4.19 Příprava kompetentních buněk *M. smegmatis* mc² 155

Přístroje:

- ❖ Termostat BT-120 (LAB SYSTEM)
- ❖ Horizontální třepačka HS250 BSK1 (IKA LABORORTECHNIK)
- ❖ Spektrofotometr UV – 1601PC UV – VISIBLE (SHIMADZU)
- ❖ Chlazená stolní centrifuga UNIVERSAL 320 R (HETTICH)

Postup práce:

- Bakteriální kmen, uložený v glycerinových konzervách (skladované při teplotě -80°C), byl pomocí sterilní kličky rozetřen na Petriho misku s pevným agarovým médiem 7H10 a příslušným antibiotikem. Následně byl inkubován při teplotě 37 °C, 3 dny.
- Do Erlenmayerovy baňky o objemu 30 ml bylo přidáno 100 ml 7H9 média a 62,5 µl 20% Tweenu 80 (2,5 µl na 1 ml kultivačního média), který slouží jako prevence proti agregaci bakterií. Do takto připravených baněk byl sterilní kličkou resuspendován bakteriální kmen *M. smegmatis*.
- Kultura byla přes noc kultivována v termostatu a na třepačce při teplotě 37°C.
- Následně byla změřena optická denzita na UV-spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Na základě změřené absorbance byl vypočten objem kultury, který byl přenesen do většího objemu kultivačního média tak, aby OD₀ kultury odpovídala 0,01, 0,005 a 0,0025 cm⁻¹.
- Poté bylo do Erlenmayerovy baňky o objemu 300 ml přidáno 100 ml 7H9 média, 250 µl 20 % Tweenu 80 a 2 ml 10% azidu. Byl pipetován vypočítaný

objem mykobakterií a kultura byla kultivována při teplotě 37 °C na třepačce, přes noc.

- Ráno byla opět změřena optická denzita.
- Při optické denzitě 0,8 – 1 byla kultura vložena na led, 30 – 90 minut.
- Poté byly kultury přelity do vychlazených falkonek a stočeny při 4200 rpm, 4°C, 10 minut.
- Supernatant byl odstraněn a do každé falkony bylo přidáno 50 ml vychlazeného 10 % glycerolu, buňky byly resuspendovány a stočeny při 4200 rpm, 4 °C, 20 minut.
- Po stočení byl supernatant odstraněn a opět bylo do každé falkony přidáno 50 ml vychlazeného 10 % glycerolu, buňky byly resuspendovány a stočeny při 4200 rpm, 4 °C, 20 – 25 minut.
- Poté byl supernatant odstraněn a do všech falkonek bylo přidáno 25 ml vychlazeného 10 % glycerolu, buňky byly resuspendovány a stočeny při 4200 rpm, 4 °C, 20 – 25 minut. Postup byl opakován 2x.
- Po poslední centrifugaci a slití supernatantu bylo do všech falkonek přidáno 4 ml vychlazeného 10 % glycerolu, buňky byly resuspendovány a alikvotovány po 200 µl do zkumavek.
- Kompetentní buňky byly zmrazeny při teplotě -80°C.

4.20 Transformace do buněk *M. smegmatis*

Transformace do kompetentních buněk *M. smegmatis* mc² 155 se provádí pomocí elektroporace. Během tohoto procesu je buněčná stěna bakterie vystavena elektrickému pulzu, který vede k vytvoření trhliny a umožní tak vpravení příslušné nukleové kyseliny.

Přístroje:

- Termostat BT – 120 (LAB SYSTEM)
- Horizontální třepačka HS250 BSK1 (IKA LABORATORTECHNIK)
- Stolní centrifuga MICROFUGE 20R (BECKMAN COMLTER)
- Elektroporátor Gene Pulser XCell (Bio-Rad)

Postup práce:

- Kompetentních buňky *M. smegmatis* mc² 155 uložené v mrazáku při teplotě -80 °C byly rozmrazeny na ledu po dobu 15 minut.
- Buňky byly následně stočeny při 15500 g, 3 minuty při 4 °C.
- Supernatant byl pomocí pipety odstraněn a buňky resuspendovány ve 200 µl vychlazeného sterilního 10 % glycerolu.
- Poté bylo přidáno 5 µl (0,5–5 ng) plazmidové DNA.
- Směs byla přepipetována do 2 mm elektroporační kyvety Gene Pulser® Cuvetes (Bio-Rad) a inkubována na ledu po dobu 10 minut.
- Kyvety byly vloženy do ShockPod komory elektroporačního přístroje Gene Pulser XCell (2.5 kV, 25 uF, 1000 Ω) a následně byl zvolen požadovaný program. Pomocí tlačítka byl spuštěn krátký elektrický pulz.
- Následně byly kyvety inkubovány na ledě po dobu 10 min.
- Vzorek byl pipetován do falkony a poté bylo přidáno 5 ml 7H9 média a 12,5 µl Tweenu 80.
- Buňky se inkubovaly na třepačce v termostatu při teplotě 37 °C, 3 hodiny.
- Po inkubaci byly vzorky stočeny při 9 000 g, 10 minut při pokojové teplotě
- Většina supernatantu byla odstraněna a buňky byly resuspendovány v 1/3 zbylého média.
- Na zahřáté plotny 7H10 s příslušným antibiotikem bylo za sterilních podmínek rozetřeno zbylé množství buněk.
- Petriho misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C, 3 – 5 dnů.
- Poté byla vybrána kolonie, která se rozetřela na novou 7H10 půdu. Následně byla vytvořena glycerinová konzerva.

4.21 Optimalizace exprese pro SigAC-FLAG a SigA-FLAG

Po úspěšné transformaci SigAC-FLAG a SigA-FLAG do *M. smegmatis* mc² 155 bylo nutné zoptimalizovat jejich expresi.

Přístroje:

- ❖ Termostat BT – 120 (LAB SYSTEM)
- ❖ Vortex (GENIE 2)
- ❖ Chlazená stolní centrifuga UNIVERSAL 320 R (HETTICH)

- ❖ Spektrofotometr UV – 1601PC UV – VISIBLE (SHIMADZU)
- ❖ Horizontální třepačka HS250 BSK1 (IKA LABORATORTECHNIK)

Postup kultivace:

- ❖ Bakteriální kmeny skladované v glycerinových konzervách byly pomocí sterilní kličky rozetřeny na Petriho misku s pevným agarovým médiem 7H10 a kanamycinem (20 µg/ml) a kultivovány 3 dny při teplotě 37°C.
- ❖ Do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml bylo přidáno 20 ml 7H9 média a 50 µl 20% Tweenu 80. Do takto připravených baněk byl sterilní kličkou resuspendován bakteriální kmen z Petriho misky.
- ❖ Kultura byla přes noc kultivována v termostatu na třepačce při teplotě 37 °C
- ❖ Následně byla změřena optická denzita na UV-spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.
- ❖ Bylo připraveno celkem 18 Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml. Do každé bylo přidáno 25 ml 7H9 média a 62,5 µl 20% Tweenu 80. Následně byl přidán příslušný objem mykobakterií. Kultury byly kultivovány v termostatu a na třepačce při teplotě 37 °C.
- ❖ Po 3 hodinách kultivace bylo do jednotlivých baněk pro exponenciální růst přidáno 100 ng, 10 ng nebo 5 ng/ml anhydrotetracyklinu a vzorky se nechaly kultivovat další 3 hodiny. Poté byly stočeny při 9 000 rpm, 4°C, po dobu 10 minut. Buňky byly resuspendovány v 5 ml Lysis pufru a opět stočeny při 9 000 rpm, 4°C, po dobu 10 min. Následně byly kultury zamrazeny při teplotě -80 °C.
- ❖ Po 7 – 8 hodinách kultivace bylo do baněk se stacionární fází 1 přidáno 100 ng, 10 ng nebo 5 ng/ml anhydrotetracyklinu. Po 24 hod růstu byly bakteriální kultury zpracovány stejně jako v případě vzorků exponenciální fáze.
- ❖ Kultury stacionární fáze 2 se nechaly kultivovat 24 hodin a poté bylo přidáno 100 ng, 10 ng nebo 5 ng/ml anhydrotetracyklinu a vzorky se nechaly kultivovat další 3 hodiny. Poté byly zpracovány stejně jako vzorky z exponenciální fáze.

4.22 Práce s proteiny

4.22.1 Ko-Imunoprecipitace

Metodou ko-imunoprecipitace lze izolovat proteiny nebo proteinové komplexy. K imobilizaci proteinů byla využita fúze FLAG-TAGu se zkoumaným proteinem. Použitím vysoce specifické monoklonální protilátky kovalentně vázané k agarózové pryskyřici byla vytvořena vazba s FLAG fúzním proteinem. Několikanásobným promytím nosiče byly odstraněny nespecificky navázané proteiny. Proteiny byly z nosiče uvolněny denaturací pomocí povaření vzorků v denaturujícím pufru SDS určeného pro polyakrylamidovou elektroforézu (SDS-PAGE).

Přístroje:

- ❖ UP200S ultrasonic device (Hielscher)
- ❖ Chlazená stolní centrifuga UNIVERSAL 320 R (HETTICH)
- ❖ Vortex (GENIE 2)
- ❖ Stolní centrifuga MINI – CENTRIFUGE (ROTILABO®)
- ❖ Stolní třepačka GRANT BIO PTR – 30 (P – LAB)
- ❖ Stolní centrifuga MICROFUGE 20R (BECKMAN COMLTER)

Postup práce:

- ❖ Bakteriální pelety ve falkonkách, skladované při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly rozpuštěny na ledu a resuspendovány ve 4 ml Lysis pufru (20 mM Tris pH 7,9; 150 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF (+ inhibitory proteáz – 5 μl/1 ml Lysis pufru).
- ❖ Následně byly buňky na ledu sonikovány 15x10s (amplituda 40 %) vždy s pauzou 1 minuta mezi každou sonikací.
- ❖ Po sonikaci byly falkony stočeny (UNIVERSAL 320 R) při 9 000 rpm, 10 minut při 4°C.
- ❖ Pro každý vzorek bylo připraveno 25 μl MS2 afinitního gelu, který byl propláchnut v 1 ml Lysis pufru.
- ❖ Následně byl přidán lyzát vzorků z exponenciální fáze a obou stacionárních fází růstu a zkumavky vloženy na rotor do chladicí místnosti při 2 – 8°C přes noc.

- ❖ Následně byly vzorky 4x promyty 1 ml Lysis pufrem (po druhém promytí byly vzorky pipetovány do nových zkumavek).
- ❖ Poté bylo přidáno 60 μ l 3x FLAG peptidu o finální koncentraci 150 ng.
- ❖ Zkumavky byly inkubovány na rotoru s třepáním po dobu 30 minut, při teplotě 2-8 °C.
- ❖ Po inkubaci byly vzorky krátce stočeny (MICROFUGE 20R) cca 30 sekund, 5000 – 8200 g, při pokojové teplotě a supernatanty byly přeneseny do nových zkumavek.
- ❖ Získané supernatanty i MS2 afinitní gel byly dále využity pro polyakrylamidovou elektroforetickou analýzu proteinů, uvedenou v kapitole: *4.22.2 Polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE)* a barveny podle postupu v kapitole: *4.22.3 SimplyBlue™ SafeStain barvení*.

A. Bacterial extracts preparation

CarD-FLAG pTetINT
RbpA-FLAG pTetINT
MoaB2-FLAG pTetINT
SigAC-FLAG pTetINT
SigA-FLAG pTetINT



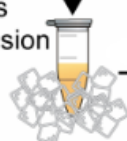
9000 rpm
10' 4°C



Cells suspension

Sonicate

10' x15



9000 rpm
10' 4°C



Lysate+ M2 affinity gel



ANTI-FLAG M2 affinity gel

Wash



3X FLAG Peptide

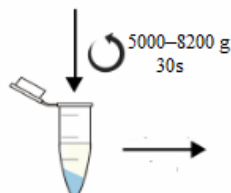
Wash

x4



B2. Co-IP

30' 4°C



Eluate

M2 affinity gel

+ / or

C. Sample analysis

SDS-PAGE, WB...

Obrázek 30 Schéma metody ko-imunoprecipitace (převzato a upraveno z BioProtoc.2678, Ana Lechuga a spol., 2018)

4.22.2 Polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE)

V přítomnosti SDS nastává denaturace proteinů a na základě elektroforetické pohyblivosti se proteiny pohybují od záporného pólu ke kladnému. Denaturované proteiny jsou děleny na základě jejich molekulární hmotnosti.

Přístroje:

- ❖ Vertikální elektroforéza XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher)

- ❖ Zdroj napětí PowerPack 3000 (Bio-Rad)
- ❖ Blokový termostat THERMOSTAT 5320 (EPPENDORF)

Postup práce:

- ❖ Do složené elektroforetické aparatury XCell SureLock™ Mini-Cell byl vložen NuPAGE® Novex 4 – 12% Bis-Tris gel.
- ❖ Následně byl připraven 1x NuPAGE® MES SDS Running buffer (zásobní roztok ředěn 20x → 25 ml pufru a 475 ml ddH₂O) a poté nalit do elektroforetické aparatury.
- ❖ Následovala kontrola, zda je gel správně vložen do aparatury a pufr neprotéká do okolního prostředí. Poté byl vytažen hřebínek z gelu.
- ❖ Vzorky byly promíchány s příslušným objemem pufru 4x NuPAGE® LDS Sample (ke kuličkám M2 resinu bylo přidáno 20 µl 1x NuPAGE® LDS Sample) a vloženy do termostatu při teplotě 95 °C, 5 minut.
- ❖ Následně byl marker a jednotlivé vzorky napipetovány do komůrek zvoleného gelu.
- ❖ Zdroj napájení byl zapnut na 200 V, po dobu 35 minut.
- ❖ Po elektroforéze byl gel opatrně vyjmut z plastového krytu a barven pomocí SimplyBlue™ SafeStain.

4.22.3 SimplyBlue™ SafeStain barvení

Pomocí barvení SimplyBlue™ SafeStain jsme schopni vizualizovat proteinové proužky na polyakrylamidových gelech.

Přístroje:

- ❖ MINI ROCKER MR-1 (BIOSAN)

Postup práce:

- ❖ Gel byl vložen do nádoby se 100 ml demineralizované vody a minutu zahříván v mikrovlnné troubě.
- ❖ Poté byla nádoba s gelem přemístěna na třepačku na 60 sekund.
- ❖ Tekutina byla z nádoby odstraněna a opět bylo nalito 100 ml demineralizované vody a postup byl opakován 2x.

- ❖ Po posledním promytí bylo do nádoby nalito 20 ml SimplyBlue™ SafeStain a nádoba s gelem byla zahřívána v mikrovlnné troubě 1 minutu.
- ❖ Po zahřátí byla nádoba přemístěna na třepačku na 5 minut.
- ❖ Poté bylo barvivo odstraněno a do nádoby opět nalito 100 ml demineralizované vody a nádoba se vložila na třepačku na 10 minut.
- ❖ Výměna demineralizované vody proběhla jednou až dvakrát.

4.22.4 Měření koncentrace proteinů

K detekci a kvantifikaci koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito kolorimetrické stanovení podle Bradfordové. Navázáním Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) na proteiny v kyselém prostředí nastává změna barvy roztoku z červeno-hnědé na modrou. Tuto změnu lze měřit spektrofotometricky.

Přístroje:

- ❖ Spektrofotometr UV-1601PC UV-VISIBLE (SHIMADZU)

Postup práce:

- ❖ Nejprve bylo připraveno 5 standardů hovězího bovinního albuminu (BSA) o známé koncentraci (0,4, 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml) v celkovém objemu 40 µl.
- ❖ Jako vzorky sloužily bakteriální lyzáty získané sonikací a jako blank 40 µl vody.
- ❖ Do všech kyvet bylo přidáno 960 µl Bradfordova roztoku (připraveného navážením 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuštěného v 50 ml ethanolu, 8,5 % H₃PO₄ a H₂O doplněna do celkového objemu 1l) a kyvety byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.
- ❖ Následně byla měřena absorbance na spektrometru při 595 nm.
- ❖ Z naměřených hodnot absorbancí standardů byla sestavena kalibrační křivka, na základě **Rovnice 2:**

Rovnice 2: Vzorec kalibrační křivky

$$OD = a * c [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

a - směrnice přímky, c - koncentrace proteinu

- ❖ Výsledná koncentrace proteinů ve vzorcích byla vypočítána podle **Rovnice 3**:

Rovnice 3: Výpočet koncentrace proteinů ve vzorku

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{595}/V[\mu\text{l}]}{a}$$

V - objem vzorku, *c* - koncentrace proteinu

4.22.5 Western Blot

Metoda umožňuje detekci specifických proteinů ve vzorku. V prvním kroku byla provedena elektroforetická separace proteinů metodou SDS-PAGE. Separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a poté probíhala interakce s primární protilátkou. Následně byla přidána sekundární protilátka značená fluorescenčně, která vytvořila vazbu s primární protilátkou. Postup metody je schematicky uveden na **Obrázku 31**.

Přístroje:

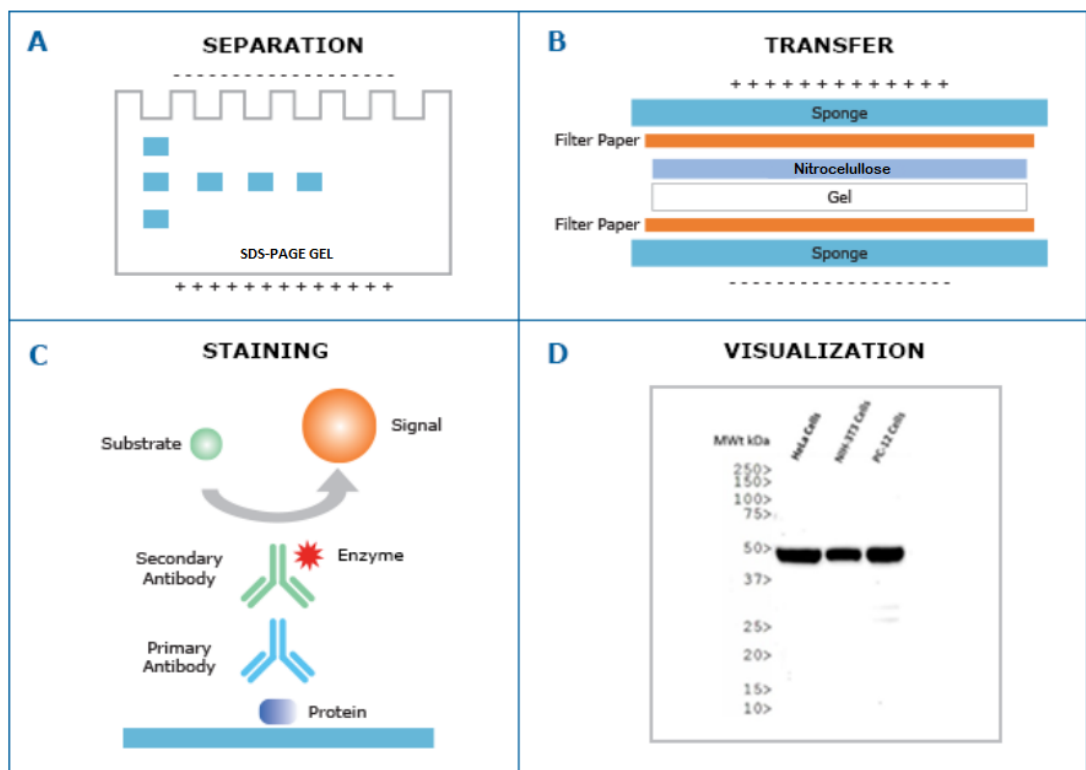
- ❖ UP200S ultrasonic device (Hielscher)
- ❖ Chlazená stolní centrifuga UNIVERSAL 320 R (HETTICH)
- ❖ MINI ROCKER MR-1 (BIOSAN)
- ❖ Mini Protean 3 Cell Electrophoresis System (BIO-RAD)
- ❖ Odyssey reader 9120 (LI-COR Biosciences)

Postup práce:

- ❖ Bakteriální pelety ve falkonkách, skladované při teplotě -80 °C, byly rozpuštěny na ledu a resuspendovány ve 4 ml Lysis pufru (20mM Tris pH 7,9, 150 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF (+ inhibitory proteáz – 5μl/1ml Lysis pufru).
- ❖ Následně byly buňky na ledu sonikovány 2x1 minuta, vždy s pauzou 1 minuta mezi každou sonikací.
- ❖ Po sonikaci byly falkonky stočeny při 9 000 rpm, 10 minut při 4°C.
- ❖ Po centrifugaci byl supernatant přelit do zkumavek.
- ❖ Následovalo měření koncentrace proteinů podle Bradfordové (4.22.4 *Měření koncentrace proteinů*).

- ❖ Poté byla provedena polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů, uvedená v kapitole: 4.22.2 *Polyakrylamidová elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE)*.
- ❖ Do nádoby s vychlazeným pufrem pro Western blot byly postupně vloženy houby, filtrační papír a těsně před nanesením gelu také nitrocelulózová membrána.
- ❖ Gel získaný SDS-PAGE elektroforézou byl opatrně vyjmut z plastového krytu.
- ❖ Na kazetu byly pomocí pinzety vloženy: vlhčená houba, vlhčený filtrační papír, SDS-PAGE gel, nitrocelulózová membrána, vlhčený filtrační papír. Pomocí skleněné tyčinky byly vytlačem odstraněny bubliny a na vlhčený filtrační papír byla nanesena poslední vrstva- vlhčená houba a kazeta uzavřena.
- ❖ Do elektroforetické aparatury byl nalit pufr pro Western blot a poté byla kazeta do pufru ponořena.
- ❖ Aparatura byla vložena na led a zdroj napájení byl zapnut na 60 V, po dobu 60 minut.
- ❖ Pro orientační kontrolu úspěšnosti blotování, byla membrána nabarvena pomocí Ponceau S a poté byla membrána přenesena do tmavé nádoby.
- ❖ Následně byla membrána promyta 1x PBS pufrem + 0,05% Tween 20.
- ❖ Promývací pufr byl slit a následně byl přidán 5% blokovací pufr (2 g sušeného mléka rozpuštěného v 40 ml 1x PBS+0,05% Tween 20). Nádoba s membránou byla inkubována na třepačce 1 hodinu při pokojové teplotě, případně při 4 °C, přes noc.
- ❖ Poté byl blokovací pufr slit a membrána promyta 1x PBS+0,05% Tween 20.
- ❖ Promývací pufr byl slit a na membránu byla nanesena myší primární protilátka (1xPBS+0,05% Tween 20 + 1% mléko + protilátka naředěna ve správném poměru + 0,1% Azid) a inkubována na třepačce hodinu při pokojové teplotě nebo při 4°C, přes noc.
- ❖ Poté byla primární protilátka slita a membrána promývána 1xPBS+0,05% Tween20, 5 minut. Postup byl opakován čtyřikrát.

- ❖ Následně byla aplikována sekundární myší chemiluminiscenční protilátka (1xPBS+0,05% Tween 20 + 1% mléko + 1:80 000 HRP / *Horse Radish Peroxidase*) a inkubována na třepačce hodinu při pokojové teplotě.
- ❖ Poté byla sekundární protilátka slita a membrána promývána 1xPBS+0,05% Tween20, 5 minut. Postup byl opakován čtyřikrát.
- ❖ Membrána s navázanou chemiluminiscenční protilátkou byla vyvolána v temné komoře na rentgenový film.
- ❖ Pro uchování byla membrána vložena do fólie a zmrazena při teplotě -25 °C. (tento krok je možné provést před přidáním blokovacího pufru nebo po pozorování membrány v přístroji).



Obrázek 31 Schéma metody Western Blot (převzato a upraveno z NovusBio - Western Blotting) Proteiny jsou separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy (A) a následně přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (B). Na membránu je aplikována primární myší protilátka (C) specifická pro protein SigAC-FLAG a SigA-FLAG. Následně je přidána sekundární protilátka značená fluorescencně, která se váže na komplex antigen+protilátka. Detekce a vizualizace (D) byla provedena pomocí zobrazovacího systému Odyssey reader 9120

4.22.6 Rychlá amplifikace konců cDNA (RACE)

Metoda RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) slouží k nalezení celých transkriptů v buňce. Pomocí reverzní transkripce byla převedena mRNA na cDNA a poté byl transkript amplifikován metodou PCR. Metodou 5' RACE jsem se pokusil identifikovat počáteční místa transkripce RpoB-RpoC mRNA.

Přístroje:

- ❖ Zdroj napětí PowerPack 3000 (Bio-Rad)
- ❖ Kamerový systém InGenius (Syngene)
- ❖ Horizontální elektroforéza Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems
- ❖ Vortex Genie 2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)
- ❖ Thermostat BT – 120 (LAB SYSTEM)
- ❖ Microfuge 20R (BECKMAN COULTER)

Postup práce:

- ❖ Byla připravena reakční směs, uvedená v **Tabulce 14**

Tabulka 14 Reakční směs DNase treatment

DNase treatment (25 µl)		
	Stacionární fáze	Exponenciální fáze
RNA vzorek	3,2 µl	12,2 µl
Turbo Dnase pufr (ThermoFisher)	2,5 µl	2,5 µl
Turbo Dnase (ThermoFisher)	2,5 µl	2,5 µl
Sterilní voda (Braun)	16, 8 µl	7,8 µl

- ❖ Následně byly vzorky inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C.
- ❖ Poté bylo ke všem vzorkům přidáno 2,5 µl inaktivačního reagensu a vzorky byly inkubovány 3 minuty, po každé minutě kultivace byla reakční směs promíchána poklepáním na dno zkumavky.
- ❖ Vzorky byly stočeny 90 sekund, 10 000 rpm, při pokojové teplotě.
- ❖ Do nových zkumavek byla připravena reakční směs podle **Tabulky 15**.

Tabulka 15 Reakční směs TEX

TEX (10 μ l)	
10x TEX pufr A (Epicentre)	1 μ l
TEX enzym (Epicentre)	1 μ l
RNA vzorek	8 μ l

- ❖ Zkumavky byly inkubovány hodinu při teplotě 37 °C.
- ❖ Ke všem vzorkům bylo přidáno 90 μ l sterilní H₂O pro doplnění objemu na 100 μ l.
- ❖ Následně bylo přidáno 100 μ l Trizolu a 20 μ l chloroformu.
- ❖ Zkumavky byly vortexovány na 20 – 30 sekund a poté stočeny 5 minut při 5000 rpm.
- ❖ Po stočení byl bezbarvý supernatant pipetován do nové zkumavky.
- ❖ Poté bylo k supernatantu přidáno 0,5 – 1 μ l glycerolu, 14 μ l octanu sodného a vzorky promíchány.
- ❖ K reakční směsi bylo pipetováno 375 μ l čistého ethanolu a zkumavky byly promíchány a inkubovány 10 – 20 minut, při teplotě -25 °C nebo 5 minut při teplotě -70°C.
- ❖ Poté byly vzorky centrifugovány 20 minut, při 4 °C na maximální otáčky.
- ❖ Po stočení byl supernatant slit a vzorek promyt 7 μ l 70 % ethanolu.
- ❖ Zkumavky byly centrifugovány 5 minut, 5000 rpm.
- ❖ Supernatant byl opatrně slit a vzorky vysušeny v exikátoru 15 minut.
- ❖ Poté bylo ke vzorkům pipetováno 7 μ l sterilní vody.
- ❖ Vzorky byly napipetovány (0,5 μ l) na 1 % gel agarózy a separované pomocí horizontální gelové elektroforézy.
- ❖ Podle **Tabulky 16** byla připravena reakční směs a vzorky inkubovány hodinu při teplotě 37 °C.

Tabulka 16 Reakční směs TAP

TAP (10 µl)	
10xTAP enzym (Epicentre)	1 µl
TAP pufr (Epicentre)	1 µl
Sterilní voda (Braun)	1 µl
RNA vzorek	7 µl

- ❖ Ke všem vzorkům bylo přidáno 90 µl sterilní vody pro doplnění objemu na 100 µl.
- ❖ Následně bylo přidáno 100 µl Trizolu a 20 µl chloroformu.
- ❖ Zkumavky byly vortexovány na 20 – 30 sekund a poté stočeny 5 minut, 5 000 rpm. Po stočení byl bezbarvý supernatant pipetován do nové zkumavky.
- ❖ Poté bylo k supernatantu přidáno 0,5 – 1 µl glycerolu, 14 µl octanu sodného a vzorky promíchány.
- ❖ K reakční směsi bylo pipetováno 375 µl čistého ethanolu a zkumavky byly promíchány a inkubovány 10 – 20 minut, při teplotě -25 °C nebo 5 minut při teplotě -70°C.
- ❖ Poté byly vzorky centrifugovány 20 minut, při 4 °C na maximální otáčky.
- ❖ Po stočení byl supernatant slit a vzorky promyty 7 µl 70% ethanolu.
- ❖ Zkumavky byly centrifugovány 5 minut, 5000 rpm.
- ❖ Supernatant byl opatrně slit a vzorky vysušeny v exikátoru 15 minut.
- ❖ Poté bylo ke vzorkům pipetováno 7 µl sterilní vody.
- ❖ Vzorky byly inkubovány 15 minut s občasným promícháním poklepáním na dno zkumavky.
- ❖ Poté byla připravena reakční směs uvedená v **Tabulce 17** a vzorky byly inkubovány hodinu při teplotě 37 °C.

Tabulka 17 Reakční směs RNA ligace

RNA ligace (10 µl)	
10xT4 ligační pufr (NEB)	1 µl
10nM ATP	1 µl
T4 RNA ligáza (NEB)	0,5 µl
5' RACE RNA oligo	0,25 µl
Sterilní voda (Braun)	0,25 µl
RNA vzorek	7 µl

- ❖ Poté proběhla cDNA syntéza namícháním reakční směsi uvedené v **Tabulce 18**.

Tabulka 18 Reakční směs cDNA syntézy

cDNA syntéza (14,5 µl)	
Sterilní voda (Braun)	7,5 µl
dNTPs	1 µl
Primer A/B	0,5 µl / 0,5 µl
RNA vzorek	5 µl

- ❖ Poté byly vzorky vloženy do termostatu na 5 minut při teplotě 65 °C. Následně byly zkumavky inkubovány minutu na ledě a poté byly do všech zkumavek pipetovány reagens uvedené v **Tabulce 19**.

Tabulka 19 Reakční směs cDNA syntézy 2

cDNA syntéza (34,5 µl)	
First Strand pufr (ThermoFisher)	4 µl
DTT	1 µl
Super Script RT (Thermofisher)	0,5 µl
RNA vzorek	14,5 µl

- ❖ Vzorky byly vloženy do blokového termostatu a inkubovány 50 minut při 55 °C.
- ❖ Poté proběhla inaktivace při teplotě 70 °C, 15 minut.
- ❖ Poté byla podle **Tabulky 20** připravena reakční směs pro PCR a podle **Tabulky 21** zvolen patřičný program. Produkty získané PCR reakcí byly rozděleny na 2% agarazovém gelu pomocí metody horizontální gelové elektroforézy.

Tabulka 20 Reakční směs PCR reakce

Reakční směs PCR (20 µl)	
cDNA	2 µl
Taq pufr (Biotools)	2 µl
dNTPs 10mM	0,4 µl
Sterilní H ₂ O (BRAUN)	14,7 µl
Reverzní primer-stejný z Tabulky 17	0,2 µl
Forward primer	0,2 µl
Taq polymeráza (Biotools)	0,5 µl

Tabulka 21 Program PCR reakce

PCR program			
<i>Proces</i>	<i>Počet cyklů</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
Iniciace denaturace	1x	94°C	3 min
Denaturace		94°C	15 s
Annealing	35x	55°C	30 s
Elongace		72°C	1 min
Závěrečná elongace	1x	72°C	5 min
		4°C	∞

4.22.7 β -galaktosidázový test

Konstrukty s plazmidem pSM128 sloužily k testování β -galaktosidázové aktivity. K měření se používal substrát ONPG (o-nitrofenyl-beta-D-galaktopyranosid). Enzym β -galaktosidáza umí štěpit laktózu a její analogy. Intenzita zabarvení po přidání substrátu odpovídá množství β -galaktosidázy a tedy síle promotoru. Po přidání ONPG vzniká barevný (žlutý) produkt vhodný k spektrofotometrickému stanovení, na základě kterého lze vypočítat aktivitu promotoru.

Přístroje:

- ❖ Spektrofotometr UV – 1601PC UV – VISIBLE (SHIMADZU)
- ❖ UP200S ultrasonic device (Hielscher)
- ❖ Chlazená stolní centrifuga UNIVERSAL 320 R (HETTICH)
- ❖ Thermo Shaker TS-100 C (BIOSAN) – blokový termostat (pro mikrozkušky)

Chemikálie:

- ❖ Z-pufř 1 upravený na pH 7.0, skladovaný při 4°C
- ❖ Z-pufř 2: Připravený přidáním 2,7 μ l β -merkapt ethanolu na 1 ml Z-pufř 1
- ❖ ONPG roztok: Čerstvý roztok připravený rozpuštěním 4 mg ONPG na 1 ml Z-pufř 1
- ❖ 1M Na₂CO₃

Postup práce:

- ❖ Bakteriální kmeny určené k testování β -galaktosidázové aktivity byly kultivovány podle postupu, který je uveden v kapitole: 4.6.1 *Mycobacterium smegmatis*. Ke kultivaci bylo použito 7H9 médium o objemu 30 ml.
- ❖ Bakteriální pelety získané stočením buněk byly promyty 500 μ l Z-pufru 2.
- ❖ Následně byly zkumavky centrifugovány při 17 900 x g, 10 min při teplotě 4°C.
- ❖ Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 500 μ l Z-pufru 2.
- ❖ Následně byly buňky na ledu sonikovány 3x 20 sekund, vždy s pauzou 1 minuta mezi každou sonikací,
- ❖ Poté byly zkumavky stočeny při 17 900 x g, 10 min při teplotě 4°C.
- ❖ Do zkumavky o objemu 2 ml bylo přidáno 200 μ l lyzátu a 800 μ l Z-pufru 1.
- ❖ Zkumavky byly inkubovány 5 min při teplotě 30 °C.
- ❖ Do všech zkumavek bylo přidáno 200 μ l ONPG a byl zapsán čas přidání.
- ❖ Reakce byla měřena do vytvoření žluté barvy nebo maximálně 20 minut.
- ❖ Poté bylo do reakční směsi přidání 500 μ l Na₂CO₃ a byl zapsán čas přidání.
- ❖ U všech vzorků bylo změřeno OD₄₂₀ a OD₅₅₀.
- ❖ Blank byl vytvořen namícháním: 200 μ l Z-pufru 2, 800 μ l Z-pufru 1, 200 μ l ONPG a 500 μ l Na₂CO₃.
- ❖ Koncentrace proteinů byla změřena podle Bradfordové.
- ❖ β -galaktosidázová aktivita byla vypočtena podle vzorce:

Rovnice 4: Výpočet β -galaktosidázové aktivity

$$aktivita = \frac{1000 * (OD_{420} - 1,75 * OD_{550})}{V[ml] * T [min] * c [mg/ml]}$$
$$aktivita = \frac{1000 * (OD_{420} - 1,75 * OD_{550})}{V[ml] * T [min] * c [mg/ml]}$$

V- objem vzorku, T- čas reakce, c- koncentrace proteinů

5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

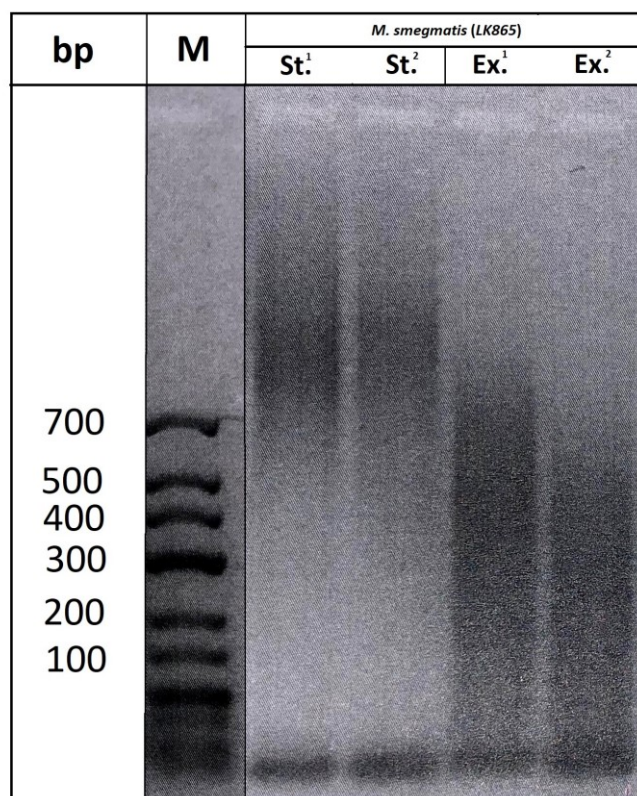
Cílem této diplomové práce bylo přispět k lepšímu pochopení mykobakteriálního transkripčního aparátu, konkrétně:

- Identifikovat promotory *rpoB-rpoC* a zjistit, jaká je role malé nekódující Ms1 v regulaci exprese z těchto promotorů.
- Charakterizovat nově objevený protein MoaB2 u *M. smegmatis*.
- Zjistit, zda se při interakci mezi MoaB2 a σ^A uplatňuje také RNAP.
- Objasnit, jestli při interakci vyžaduje protein MoaB2 N-terminální doménu a zda váže MoaB2 další mykobakteriální transkripční faktory.

6 VÝSLEDKY

6.1 Hledání transkripčního počátku mRNA RpoB-RpoC

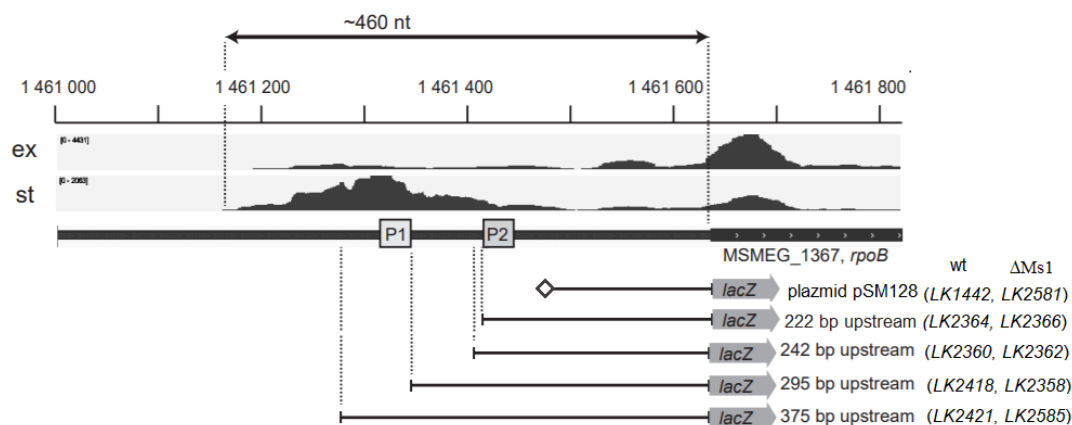
Transkripční počátek kmenu *M. smegmatis* mc² 155 wt (LK865) byl identifikován metodou 5' RACE. K degradaci monofosforylovaných 5' konců byla celková RNA ošetřena použitím 5'-dependentní exonukleázy (TEX) a následně byla provedena metoda 5'RACE. Poté byly PCR produkty rozděleny na agarózovém gelu. Hledání transkripčního počátku *rpoB-rpoC* kmene LK865 bylo provedeno jak v exponenciální, tak ve stacionární fázi růstu. Z výsledku získaného gelu je patrné, že se nepodařilo nalést transkripční počátek z 5' konce, který by byl následně osekvenován. Možným příčinám a řešením se věnuji v kapitole 7 *Diskuze*.



Obrázek 32: Hledání transkripčního počátku mRNA RpoB-RpoC: Snímek 2% agarózového gelu po rozdělení produktů PCR reakce získaných metodou 5'RACE. Transkripční počátek mRNA RpoB-RpoC nebyl nalezen. Vzorke byly měřeny v duplikátech pro každou růstovou fázi. Jako marker byl použit *Low Range Ladder* (ThermoFisher). St. - stacionární fáze, Ex.- exponenciální fáze, M - marker.

6.2 Příprava buněk *M. smegmatis* s inzerty promotorů genu *rpoB*

Na základě výsledků RNA-seq v naší laboratoři bylo zjištěno, že se pravděpodobně před promotory P1 a P2 nachází třetí neznámý promotor (nepublikovaná data). Pro předpokládané hlavní promotory pro *rpoB* gen byly navrženy primery specifické pro tuto oblast DNA. Ke strategii testování promotorové aktivity jsme zvolili test β -galaktosidázy, který se často využívá pro studium regulačních prvků genů a kvantifikaci jejich účinků na expresi. K měření byla připravena řada fragmentů promotoru P_{rpoB} o různé délce. Tyto fragmenty byly klonovány do plazmidu pSM128 do restrikční oblasti pro enzym *ScaI* před reportérovým genem *lacZ*. Takto připravené fragmenty byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* (DH5 α). Úspěšnost klonování DNA inzertu do plazmidu byla u několika vybraných kolonií ověřena pomocí restrikční analýzy. Z úspěšně transformovaných buněk byly vytvořeny glycerinové konzervy. Po ověření sekvenace konstruktů sekvenací byly izolované plazmidy transformovány do kompetentních buněk *M. smegmatis* mc² 155. **Obrázek 33** znázorňuje schéma připravených promotorových fragmentů P_{rpoB} o různé délce.



Obrázek 33 Schéma připravených promotorových fragmentů P_{rpoB} : Na základě nepublikovaných dat RNA-seq byly připraveny fragmenty promotoru P_{rpoB} o různé délce od počátku transkripce genu *rpoB*. Tyto fragmenty, klonované do plazmidu pSM128, sloužily k testování promotorové aktivity *in vivo* v *M. smegmatis*. P1 a P2 jsou predikované potenciální promotory pro gen *rpoB-rpoC*. Ex - exponenciální fáze, St - stacionární fáze.

6.3 Testování aktivity promotorů genu *rpoB* v exponenciální fázi růstu

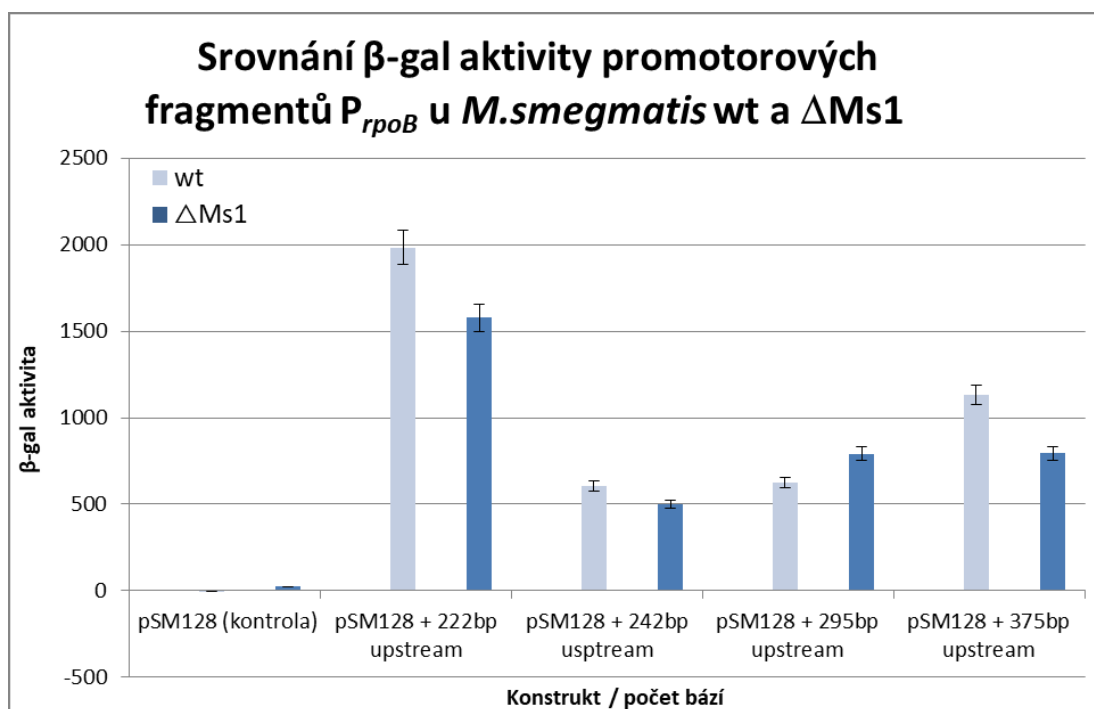
Vybrané bakteriální kmeny uvedené v **Tabulce 3** byly kultivovány do exponenciální a stacionární fáze růstu. Vzorky byly v obou fázích růstu odebrány v duplikátech: *i*) exponenciální fáze růstu (OD_{600} 0,5, přibližně po 6 hodinách kultivace) a *ii*) stacionární fáze růstu (OD_{600} 2 – 3, po 24 hodinové kultivaci). Měření β -galaktosidázové aktivity probíhalo u vzorků získaných z exponenciální fáze růstu. Pro testování promotorové aktivity během stacionární fáze je přesnější měření *lacZ* mRNA metodou qPCR. Pro každý kmen wt a $\Delta Ms1$ byly provedeny celkem tři biologické opakování.

6.3.1 Srovnání aktivity P_{rpoB} mezi kmeny *M. smegmatis* wt a $\Delta Ms1$

Graf 1 znázorňuje rekombinantní konstrukty použité v této diplomové práci a shrnuje výsledky testování β -galaktosidázové aktivity u kmenů *M. smegmatis* wt a $\Delta Ms1$. Konstrukt *LK1442 / LK2581*, tvořený plazmidem pSM128 bez klonovaného fragmentu P_{rpoB} , sloužil jako negativní kontrola a při měření nebyla pozorována žádná významná aktivita. Nejsilnější exprese proteinu LacZ u wt kmene byla sledována u protomorového fragmentu kmene *LK2364* (fragment složený z -222 +9 hexamerů). U fragmentu P_{rpoB} kmene *LK2360* (fragment složený z -242 +9 hexamerů) poklesla aktivita promotoru více než 3x. Rozdíly v expresi proteinu LacZ mezi konstrukty *LK2360* (fragment složený z -242 +9 hexamerů) a *LK2418* (fragment složený z -295 +9 hexamerů) byly minimální. U kmene *LK2418* stoupla aktivita P_{rpoB} přibližně o 4%. Další rozšíření oblasti *upstream* o 80 bp (kmen *LK2421* – fragment složený z -375 +9 hexamerů) uvolnilo inhibiční efekt a aktivita promotorového jádra P_{rpoB} se zvýšila téměř dvojnásobně.

U kmenů *M. smegmatis* $\Delta Ms1$ byla nejsilnější exprese proteinu LacZ sledována u protomorového fragmentu kmene *LK2366* (fragment složený z -222 +9 hexamerů). U kmene *LK2362* (fragment složený z -242 +9 hexamerů) došlo k poklesu aktivity P_{rpoB} více než 3x. U kmenů *LK2358* (fragment složený z -295 +9 hexamerů) a *LK2585* (fragment složený z -375 +9 hexamerů) se následně zvýšila aktivita P_{rpoB} přibližně 1,5x. Mezi kmeny *LK2358* a *LK2585* nebyly pozorovány rozdíly v aktivitě P_{rpoB} .

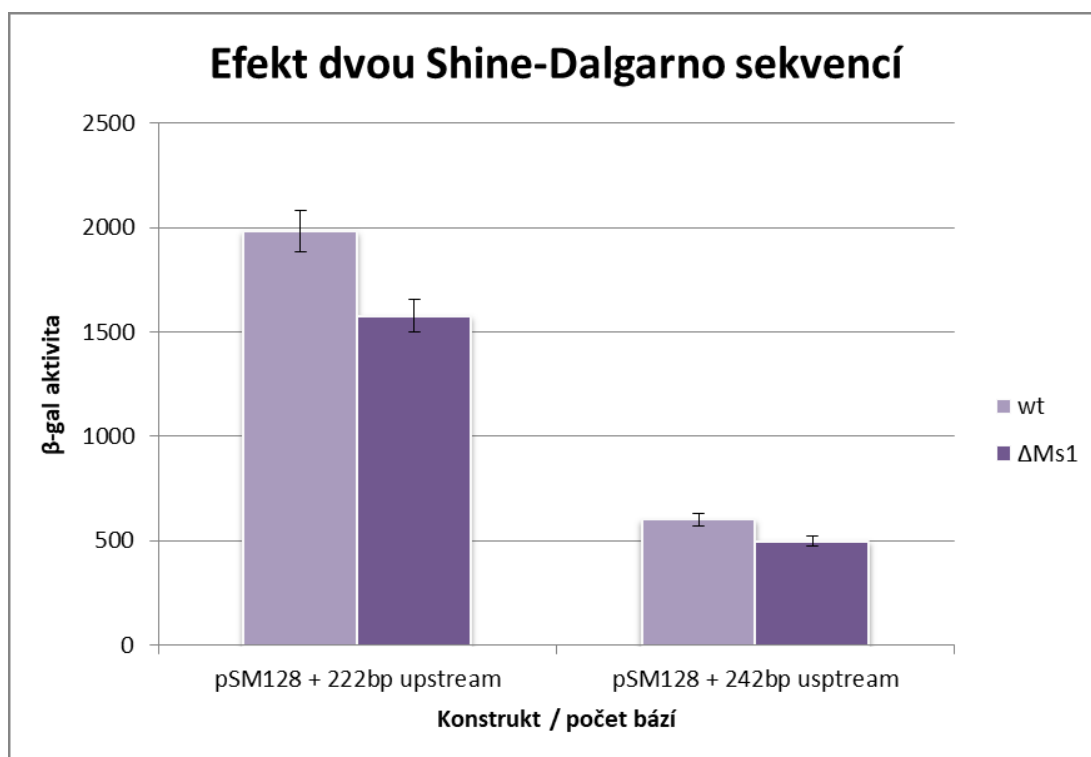
Mezi kmeny *LK2364* wt a *LK2366* Δ Ms1 (fragmenty složené z -222 +9 hexamerů) došlo k poklesu aktivity P_{rpoB} o více než 20 %. Mezi kmeny *LK2360* wt a *LK2362* Δ Ms1 (fragmenty složené z -242 +9 hexamerů) byl sledován pokles aktivity P_{rpoB} o 17 %. U kmene *LK2358* Δ Ms1 stoupla aktivita promotoru P_{rpoB} přibližně o 27% v porovnání s kmenem *LK2418* wt (fragment složený z -295 +9 hexamerů). Následně byl sledován pokles aktivity P_{rpoB} o 30% mezi kmeny *LK2421* wt a *LK2585* Δ Ms1 (fragmenty složené z -375 +9 hexamerů).



Graf 1 Srovnání β -galaktosidázové aktivity mezi kmeny *M. smegmatis* wt a Δ Ms1: Graf znázorňuje srovnání hodnot výsledků měření β -galaktosidázové aktivity u vzorků z exponenciální fáze růstu mezi kmeny wt (kmeny *LK1442*, *LK2364*, *LK2360*, *LK2418*, *LK2421*) a Δ Ms1 (kmeny *LK2581*, *LK2366*, *LK2362*, *LK2358* a *LK2585*). Měření bylo provedeno celkem třikrát, přičemž každý vzorek byl měřen v duplikátu. Chybové úsečky představují standardní odchylku od měření.

6.3.2 Efekt dvou Shine-Dalgarno sekvencí na aktivitu promotoru P_{rpoB}

Graf 4 znázorňuje rekombinantní konstrukty kmenů *LK2364* wt a *LK2366* Δ Ms1 (fragменты složené z -222 +9 hexamerů) a *LK2360* wt a *LK2362* Δ Ms1 (fragменты složené z -242 +9 hexamerů). Více než trojnásobný pokles aktivity u kmenů wt i Δ Ms1 je způsoben přítomností druhé Shine-Dalgarno sekvence v oblasti -242 +9 hexamerů.

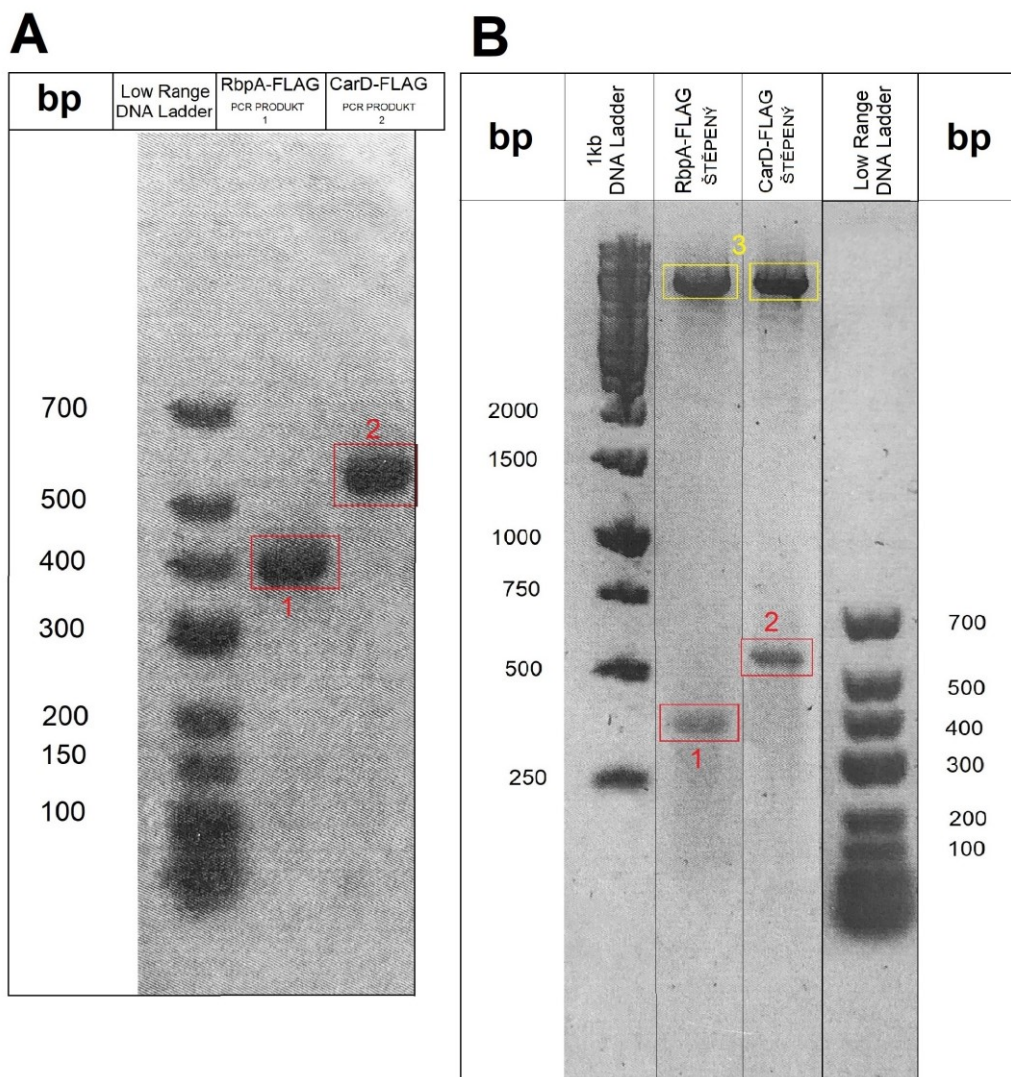


Graf 2 Efekt dvou Shine-Dalgarno sekvencí u kmenů *M. smegmatis* wt a Δ Ms1: Graf znázorňuje pokles promotorové aktivity P_{rpoB} mezi kmeny wt (*LK2364*, *LK2360*) a Δ Ms1 (*LK2366*, *LK2362*) v důsledku přítomnosti druhé Shine-Dalgarno sekvence. Chybové úsečky představují standardní odchylku od měření.

6.4 Příprava FLAG-značených proteinů

Proteiny MoaB2, CarD, RbpA, SigA (s N-terminální doménou) a SigAC (bez N-terminální) byly fúzovány s FLAG-afinitní značkou. Následně byly klonovány do plazmidu pTet INT. Připravené konstrukty byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* (DH5 α). Poté, co byla úspěšnost klonování DNA inzertu ověřena pomocí restrikční analýzy, se z úspěšně transformovaných buněk vytvořily glycerinové konzervy. Sekvence vytvořeného konstruktu byla ověřena sekvenováním. Izolované plazmidy byly transformovány do kompetentních buněk

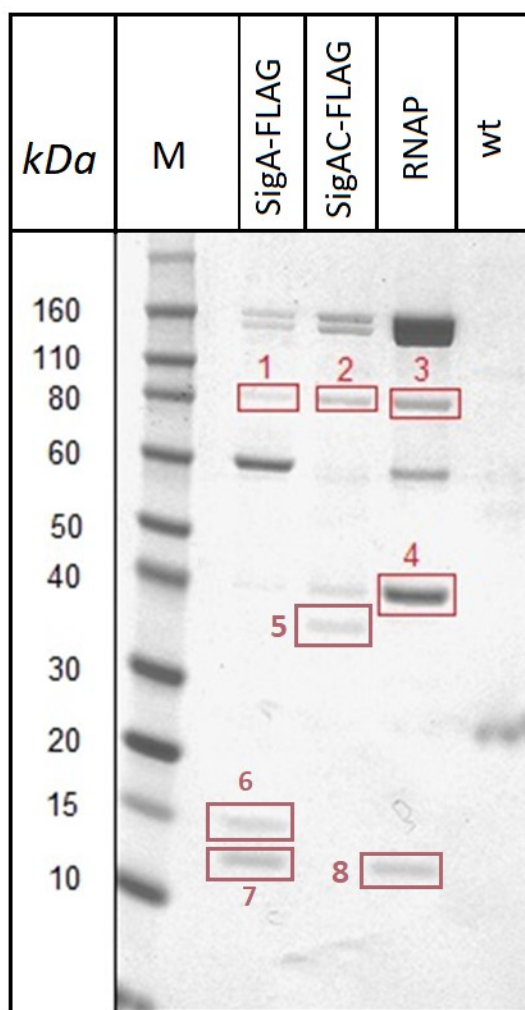
M. smegmatis mc² 155. Na **Obrázku 34** je uvedena ukázka **(A)** získání PCR inzertu transkripčních faktorů CarD a RbpA a ukázka restričního štěpení **(B)** po klonování s plazmidem pTet INT.



Obrázek 34 Ukázka přípravy FLAG-značených proteinů: **(A)** Získané PCR produkty transkripčních faktorů RbpA a CarD na 2 % agarovém gelu: (1) RbpA – 350 bp (2) CarD – 500 bp. Jako marker byl použit *Low Range DNA Ladder* (ThermoFisher). **(B)** Ukázka restričního štěpení na 1 % agarovém gelu: RbpA (1), CarD (2), plazmid pTet INT (3) štěpený restričními endonukleázami *NdeI* a *HindIII*. Jako marker byl použit: *1kb DNA Ladder* a *Low Range Ladder* (ThermoFisher)

6.4.1 Interakční partneři vybraných FLAG-značených proteinů u *M. smegmatis*

Bakteriální kmeny byly kultivovány při teplotě 37 °C do exponenciální fáze růstu (OD₆₀₀ 0,5 – 0,6; ~6 hod kultivace) a stacionární fáze růstu (OD₆₀₀ 2,5 – 3; 24 hod kultivace). Imunoprecipitace byla hodnocena v obou růstových fázích. Pro každý kmen byly provedeny celkem tři biologické opakování. Eluované proteiny přítomné v supernatantu i navázané na anti-FLAG M2 afinitní gel byly separovány metodou SDS-PAGE a následně vizualizovány. Na **Obrázku 35** je získaný SDS-PAGE gel s interakčními partnery FLAG-značených proteinů (FLAG – sigA, sigAC, RNAP) izolovaných ze stacionární fáze růstu. Výsledky potvrzují interakci faktoru σ^A s proteinem MoaB2. Mimo to se interakce s faktorem σ^A účastnila RNAP a transkripční faktory RbpA a HelD. Předběžně jsme imunoprecipitovali také σ^A bez N-terminální domény (sigAC), abychom zjistili, zda je tato doména potřebná pro vazbu proteinu MoaB2 na σ^A . Zjistili jsme, že MoaB2 se sigAC komplex nevytváří. Vzájemná exprese faktorů σ^A a σ^A bez N-terminální domény je však velmi rozdílná proto, abychom mohli posoudit, jaká je role této domény při interakce. Proto bylo potřebné nejprve optimalizovat expresi těchto dvou proteinů na takovou úroveň, abychom je mohli vzájemně porovnat. Společně s sigAC jsme ko-immunoprecipitovali RNAP, HelD a σ^A . FLAG-značená RNAP interagovala s faktorem σ^A , transkripčními faktory RbpA a HelD, nikoliv však s MoaB2. Z těchto výsledků teda vyplývá, že jediným interakčním partnerem proteinu MoaB2 je faktor σ^A . Jako kontrola byl použit kmen wt, který neobsahoval žádné FLAG-značené proteiny. Jednotlivé proteiny označené v rámečku na **Obrázku 35** byly odeslány pro analýzu metodou hmotnostní spektrometrie. Výsledky hmotnostní spektrometrie (**Tabulka 22**) upřesňují, že s faktorem σ^A interaguje zkrácená verze proteinu MoaB2 o velikosti 15 kDa.

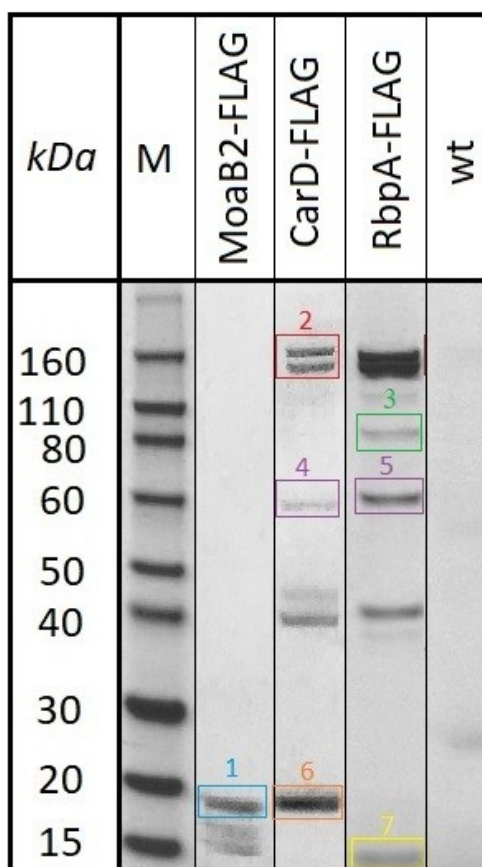


Obrázek 35 Imunoprecipitace FLAG-značených proteinů ze stacionární fáze růstu: Interakční partneři FLAG-značených proteinů (eluáty) ze stacionární fáze (24 hod kultivace). Byly provedeny celkem tři biologická opakování. Jako negativní kontrola byl použit kmen *M. smegmatis* wt bez FLAG-značených proteinů. Marker - *Novex Sharp Pre-stained Protein Standard* (ThermoFischer). Očíslované proteiny v červeném rámečku byly zaslány na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie (Tabulka 22).

Tabulka 22 Výsledek hmotnostní spektrometrie spojený s analýzou proteinových proužků, označených rámečkem na Obrázku 35: Číslo proteinových proužků odpovídají číslování Obrázku 35

Číslo Bandu	Název proteinu	Číslo v databázi	Počet peptidů	Dosah testování [%]	MSMS analýza	MW protein
1	Helikáza	WP_011728199.1	11	22	AEFVDVWYVWTER HGVLVVGGTPAFDHIHR	81
2	Helikáza	WP_011728199.1	13	26	AEFVDVWYVWTER HGVLVVGGTPAFDHIHR	81
3	Helikáza	WP_011728199.1	14	28	AEFVDVWYVWTER DIVATIQAEDQVIR HGVLVVGGTPAFDHIHR	81
4	RNAP podjednotka α	RPOA_MYCS2	13	50	TLLSSIPGAAVTSIR DALASAGGTLVELFGLAR FVIEPLEPGFGYTLGNSLR	38
5	Sigma AC (bez N-terminální domény)	WP_011728563.1	11	27	VLEIQQYAR TLDEIGQVGVTR	51
6	Pterin-4 α -karbinolamin dehydratáza (MoaB2)	AFP41774.1	7	56	ELLGISEALR ASGLAAGIVDAGLSR GLAGISGSTLWNIAGSR NALNTAVIGGVDLVSVGGTGVTPR	15
7	RNA-vazebný protein A (RbpA)	RBPA_MYCS2	7	48	LGAVSYETDRNHDLAPR	13
8	RNA-vazebný protein A (RbpA)	RBPA_MYCS2	7	48	No	13

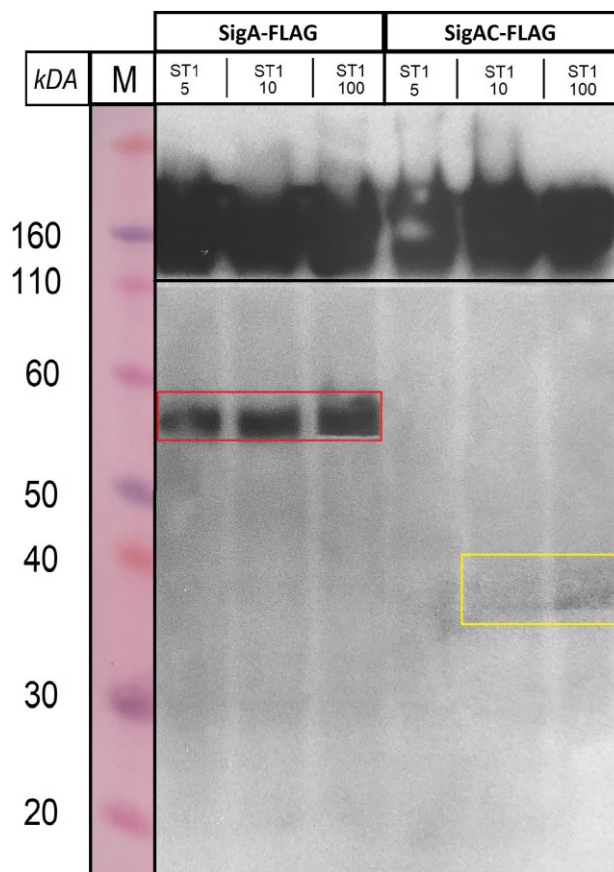
K nalezení interakčních partnerů proteinu MoaB2 byl připraven FLAG-značený kmen (MoaB2-FLAG). Z **Obrázku 36** je patrné, že společně s FLAG-značeným proteinem MoaB2 jsme stáhli pouze MoaB2 a její kratší formy, žádný jiný protein nebyl ko-imunoprecipitován. Poté jsme zjišťovali, zda by mohla MoaB2 interagovat s esenciálními transkripčními faktory mykobakterií – CarD a RbpA. Pro tento experiment byly vytvořeny FLAG-značené kmeny CarD a RbpA a následně imunoprecipitovány. Na **Obrázku 36** můžeme vidět, že MoaB2 neinteraguje ani s jedním z těchto transkripčních faktorů. S transkripčním faktorem CarD interagovala pouze RNAP a faktor σ^A . S transkripčním faktorem RbpA byl v komplexu navíc protein HelD.



Obrázek 36 Imunoprecipitace FLAG-značených transkripčních faktorů: (A) Interakční partneři FLAG-značených proteinů (eluáty) ze stacionární fáze (24 hod kultivace). Byly provedeny tři biologické opakování. V modrém rámečku (1) je protein MoaB2, v červeném rámečku (2) jsou zobrazeny podjednotky β a β' RNAP, v zeleném rámečku (3) protein HelD, ve fialovém rámečku (4 a 5) je zobrazen faktor σ^A , v oranžovém rámečku (6) je transkripční faktor CarD a ve žlutý rámečku (7) je transkripční faktor RbpA. Jako negativní kontrola sloužil kmen *M. smegmatis* wt bez FLAG-značených proteinů. Marker - Novex Sharp Pre-stained Protein Standart (Thermo Fischer).

6.5 Výsledek optimalizace exprese mezi SigA-FLAG a SigAC-FLAG

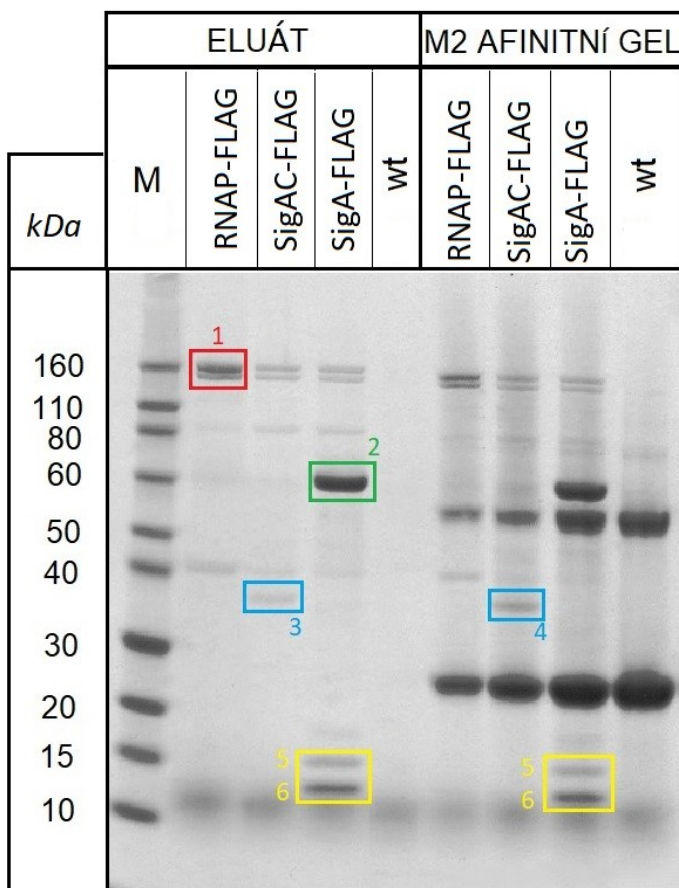
Následně byla optimalizována exprese u kmenů SigA-FLAG (s N-terminální doménou) a SigAC-FLAG (bez N-terminální domény). Bakteriální kmeny byly kultivovány v přítomnosti různé koncentrace anhydrotetracyklinu (100ng, 10ng nebo 5 ng/ml) do exponenciální fáze (OD_{600} 0,5 – 0,6; ~6 hod kultivace). Stacionární fáze byla kultivována ve dvou krocích, které se lišily časem přidání ATC. Pro časnou stacionární fázi bylo po ~7 hodinách kultivace přidáno 100 ng, 10 ng nebo 5 ng/ml ATC a následně kultivováno do druhého dne (celkem 24 hod růst). Pro kmeny pozdní stacionární fáze probíhala kultivace 24 hodin bez přidání antibiotika. Po 24 hodinách bylo přidáno 100 ng, 10 ng nebo 5 ng/ml ATC a kmeny byly kultivovány další 3 hodiny. Následně byly proteiny separovány pomocí SDS-PAGE, metodou Western Blot přeneseny na nitrocelulózovou membránu a následně detekovány pomocí specifických protilátek. Množství proteinů, které bylo naneseno na gel, bylo optimalizováno na základě změření koncentrace proteinů ve vzorku podle Bradfordové, případně optimalizací na základě hodnot změřené OD_{600} . K detekci byl použit chemiluminiscenční substrát na bázi luminolu, který detekuje křenovou peroxidázu (HRP) jako sekundární protilátku v komplexu s primární protilátkou na imunoblotu. Úpravou časové expozice rentgenového filmu s imunoblotem s navázaným substrátem bylo možné získat signál potřebný k detekci. Na **Obrázku 37** můžeme pozorovat RNAP, faktor σ^A s přibližnou molekulovou hmotností 58 kDa a σ^A bez N-terminální domény s přibližnou molekulovou hmotností 35 kDa. Na základě intenzity získaných proteinových proužků bylo určeno množství ATC potřebného pro optimalizaci exprese mezi oběma faktory sigma.



Obrázek 37: Úprava exprese FLAG-sigA (s N-terminální doménou) a FLAG-sigAC (bez N-terminální domény): Z detekovaného chemiluminiscenčního signálu na rentgénový film je patrný nejsilnější signál sigAC při koncentraci ATC 100 ng/ ml detekovaný u vzorků z časně stacionární fáze. V pozdní fázi nebyl detekován žádný signál. Sekundární protilátka byla namířena proti σ^A . Jako kontrola byla použita sekundární protilátka namířená proti RNAP. Rentgénový film byl exponován 10s. Jako marker byl použit *Novex Sharp Pre-stained Protein Standard* (ThermoFischer). Marker není při chemiluminiscenci detekován, proto orientačně uvádím marker získaný barvením Ponceau S, které předcházelo přípravě imunoblotu.

6.5.1 Role N-terminální domény σ^A při interakci s MoaB2

Podle výsledku zoptimalizované exprese byl kmen FLAG-sigA kultivován do časné stacionární fáze (24 hodin) při koncentraci ATC 5 ng/ml a kmen FLAG-sigAC při koncentraci 100 ng/ml (přidané po ~7 hodinách kultivace). Izolované buňky byly ko-immunoprecipitovány. Vzhledem k tomu, že signál izolovaných proteinových proužků sigA a sigAC (**Obrázek 38**) nebyl kvantifikován o stejné intenzitě, optimalizace exprese se nevydařila. K semikvantitativnímu vyhodnocení byl použit program Quantity One a bylo zjištěno, že z výsledků intenzity získaných proteinových proužků nelze určit, zda je N-terminální doména σ^A pro vazbu MoaB2 potřebná. Intenzita proteinových proužku MoaB2 je více než 2x nižší než σ^A , intenzita σ^{AC} více než 2,5x nižší než σ^A (eluáty). Intenzita izolovaných proteinových proužků faktoru σ^A bez N-terminální domény je v M2 afinitním gelu přibližně o 29 % intenzivnější než v elutátu (výsledky semikvantitativního vyhodnocení v eluátech a M2 afinitním gelu si však přibližně odpovídají). Větší množství proteinů v M2 afinitním gelu mohlo být způsobeno jeho nedokonalým promytím.



Obrázek 36: Role N-terminální domény σ^A pro vazbu MoaB2: Výsledek imunoprecipitace získaný z eluátů a M2 afinitního gelu u vzorků izolovaných ze stacionární fáze růstu (24 hodin). Celkem byly provedeny dvě biologické opakování. V červeném rámečku (1) jsou zobrazeny podjednotky β a β' RNAP, v zeleném rámečku (2) je zobrazen faktor σ^A , v modrém rámečku (3 a 4) faktor σ^A bez N-terminální domény (sigAC), ve žlutém rámečku (5) protein MoaB2 a (6) transkripční faktor RbpA. Jako negativní kontrola sloužil kmen *M. smegmatis* wt bez FLAG-značených proteinů. Marker - Novex Sharp Prestained Protein Standard (Thermo Fischer).

7 DISKUZE

Identifikace transkripčního počátku RpoB-RpoC mRNA

Geny *rpoB* a *rpoC* kódují podjednotky β a β' RNAP. Oba tyto geny jsou transkribovány ve společném operonu *rpoB-rpoC*. Nedávno byly popsány dva promotory, které transkripci řídí (Zhu *et al.*, 2018). Na základě RNA-seq bylo v naší laboratoři zjištěno, že transkripce z operonu *rpoB-rpoC* je iniciována i před promotory P1 a P2, kde se pravděpodobně nachází třetí, doposud neznámý promotor (nepublikovaná data).

V rámci této diplomové práce jsme se pokusili identifikovat počáteční místo transkripce mRNA RpoB-RpoC použitím metody 5'RACE. Specifická amplifikace 5' konců transkriptu usnadňuje mapování transkripčního počátku a informuje o přibližném umístění jednotlivých promotorových prvků (Olivarius *et al.*, 2009). Zvolili jsme obdobný přístup, jako u předchozích, úspěšně provedených experimentů při hledání počátku transkripce u homologu Ms1 v *M. tuberculosis* (Šiková *et al.*, 2019). Produkty PCR 5'RACE byly rozděleny na agarovém gelu. I přesto, že se nepodařilo zjistit počáteční místo transkripce mRNA RpoB-RpoC, je tato metoda rutinně používaná pro sekvenční analýzu *upstream* oblastí buněčných mRNA. Avšak nevýhodou je její finanční a časová náročnost (Dallmeier a Neyts, 2013). Úspěšnost 5'RACE je výrazně ovlivněna účinností a specifíčností PCR. V závislosti na konkrétním použitém primeru a cílové sekvenci se také mění optimální podmínky pro amplifikaci. Postup metody tak může vyžadovat úpravu protokolu (změnu koncentrace Mg^{2+} , dNTP nebo primerů, případně i úpravu tepelného cyklování). I přesto, že počáteční místo transkripce nebylo nalezeno, byly připraveny konstrukty promotorových fragmentů, které sloužily k měření promotorové aktivity. Příprava jednotlivých promotorových fragmentů P_{rpoB} určených k testování β -galaktosidázové aktivity předcházela nezávisle publikaci Zhu *et al.*, 2018.

Příprava buněk *M. smegmatis* s inzerty promotorů P_{rpoB}

Při zahájení transkripce dochází k vazbě holoenzymu RNAP s promotorovou sekvencí, která se většinou nachází na začátku přepisovaného genu. V blízkosti jádra promotoru můžeme u bakterií nacházet další oblasti, které mohou mít vliv na regulaci genové transkripce. Připravené fragmenty promotoru P_{rpoB} obsahovaly sadu sekvenčních elementů potřebných k regulaci transkripce a zahájení syntézy vlákna RNA. Vzájemně se lišily délkou *upstream* oblastí. Pro klonování byl použit vektor pSM128, který se běžně používá pro měření genové exprese. Tento integrativní plazmid je vkládán do chromozomu jako jedna kopie prostřednictvím attP rekombinace (Arnold *et al.*, 2018). Hlavní výhodou integrativních plazmidů je vytvoření stabilnějších buněk, přičemž na každou buňku připadá pouze jedna kopie konstruktů (v porovnání s replikačními plazmidy, kdy vznikají vícenásobné kopie, které je nutné při vyhodnocení zohlednit); (Guérout-Fleury *et al.*, 1996).

Aktivita P_{rpoB} se stanovila pomocí β -galaktosidázové metody. Jako heterologní reportérový gen sloužil *lacZ*, kódující β -galaktosidázu (Stephen Smale, 2010). Testování probíhalo u vzorků získaných z exponenciální fáze růstu.

a) Efekt délky promotorových inzertů na transkripci genu *rpoB* u buněk *M. smegmatis* wt

Nejsilnější promotorová aktivita byla naměřená v oblasti 222 bp *upstream* od startovacího kodonu genu *rpoB*. V této oblasti je lokalizován promotor P2 s konzervovaným motivem 5'-CGCTATNGTT-3', který je rovněž označován jako promotor majoritně zodpovědný za iniciaci transkripce (Cortes *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2018). V oblasti od 242 do 222 bp od startovacího kodonu genu *rpoB* byla zjištěna přítomnost druhé Shine-Dalgarno (SD) sekvence. Přítomnost druhé konsensus sekvence 5'-AGGAGG-3' (Hahn *et al.*, 2017) v oblasti rozšířené o 20 bp vedla k více než trojnásobnému poklesu aktivity P_{rpoB} . Druhá SD sekvence tak měla vliv na translaci proteinu LacZ. Translace je zahájena startovacím kodonem (obvykle AUG), který představuje trojici nukleotidů rozpoznávaných ribozomální podjednotkou, která skenuje řetězec mRNA a pokouší se iniciovat translaci (Jin *et al.*, 2006). Mechanismus rozpoznání iniciačního kodonu u bakterií je založen na nukleotidové komplementaritě mezi 3' koncem 16S rRNA a 5' SD sekvencí, která je

obvykle lokalizovaná 4 až 10 bází *upstream* od startovacího kodonu (Yurovsky *et al.*, 2018). Dva a více startovacích kodonů mohou mít vliv na kinetiku translace a vést k tvorbě zkrácených produktů (Buskirk *et al.*, 2017). Stejně tak druhá SD sekvence zkracuje čas potřebný ke správnému párování mezi ribozomem a mRNA a tím snižuje efektivitu translace (Hockenberry *et al.*, 2017). Mutace v SD sekvenci narušují iniciaci translace bakteriálními ribozomy a ovlivnění stability mRNA (Jacob *et al.*, 1987; Agaisse a Lereclus, 1996; Yang *et al.*, 2016). V poslední době odhalují studie sekvenční diverzitu SD motivů prokaryotických genomů (Kuo *et al.*, 2020), přičemž i nekonsenzuální SD motiv může sloužit jako vazebné místo pro ribozom a pro iniciaci translace lze použít i jiné startovací kodony (ATG, UTG, atd.); (Jenning *et al.*, 2016). Mnoho studií potvrzuje, že k zahájení translace lze použít i alternativní startovací kodony, u *E. coli* to mohou být např.: GUG (14% iniciací translace) nebo UUG (3% iniciací translace); (Hecht *et al.*, 2016; Belinky *et al.*, 2017). Do budoucna navrhuji vytvoření konstruktů bez inserce druhé SD sekvence. Tím bude možné lépe zodpovědět na otázku, zda je v oblasti mezi 242 a 222 bp *upstream* přítomna regulační sekvence nebo zda dochází k vazbě neznámého represoru, který je zodpovědný za pokles promotorové aktivity genu *rpoB*.

Druhá nejsilnější promotorová aktivita genu *rpoB* byla změřena u fragmentu 375 *upstream* od startovacího kodonu genu *rpoB*. Přibližně 330 bp *upstream* od startovacího kodonu genu *rpoB* nacházíme promotor P1, který má menší vliv na tvorbu transkriptů ze společného operonu *rpoB-rpoC*. Tento promotor je přednostně inhibován rifampicinem, což vede ke zvýšení exprese genu *rpoB* z promotoru P2 (Zhu *et al.*, 2018). Rifampicin je díky svému baktericidnímu účinku nejpoužívanější antibiotikum při léčbě tuberkulózy způsobené *M. tuberculosis*. Zaznamenané rezistence k rifampicinu jsou více než z 95 % způsobené mutací genu *rpoB* (Zaw *et al.*, 2018). Rifampicin neznámým mechanismem ovlivňuje výběr promotoru P2, což vede k upregulaci genu *rpoB* v subpopulaci buněk. Tato upregulace umožní jejich růst a dělení při takových koncentracích antibiotika, které jsou běžně pro buňky letální (Zhu *et al.*, 2018). Není ani vyloučeno, že se třetí neznámý promotor nachází dále *upstream* od promotoru P1. Na efektivnější transkripci v oblasti 375 bp *upstream* od startovacího kodonu genu *rpoB* může mít vliv přítomnost A/T bohatých oblastí, které zvyšují promotorovou sílu (Krásný *et al.*, 2000). A/T bohaté oblasti

(UP elementy) se podílí na rozpoznávání promotorů na základě jejich interakce s C-terminální doménou podjednotky α RNAP (Grainger a Busby, 2008). Do této oblasti se však může vázat i neznámý regulátor, který zvyšuje aktivitu P_{rpoB} . Proto, abychom mohli zjistit, kde se nachází námi hledaný promotor v této oblasti, navrhuji do budoucna vytvořit rozšířené promotorové fragmenty. Na základě měření jejich β -galaktosidázové aktivity můžeme konstatovat, zda další rozšíření promotorové oblasti má nebo nemá vliv na aktivitu promotorového jádra. Pro přesnější navržení délky promotorových fragmentů doporučuji v prvních krocích najít transkripční počátek $RpoB$ - $RpoC$ mRNA použitím metody 5'RACE.

Mimo jiné byly také pozorovány změny v rychlosti růstů jednotlivých kmenů wt. Kromě kontrolního kmene *LK1442* rostly všechny kmeny pomaleji. Přítomnost 5'UTR oblasti by tedy mohla mít vliv na regulaci množství RNAP a tzn., že mohla ovlivňovat celkové množství RNAP v buňkách a způsobit jejich pomalejší růst. Intracelulární množství RNAP vzájemně souvisí s okamžitou schopností buněčného růstu (Klumpp a Hwa, 2008). Studie Lloyd-Price *et al.*, se zabývali měřením relativní koncentrace RNAP u buněk pěstovaných na různě bohatých médiích. Pomocí metody RT-PCR genu *rpoC*, který kóduje podjednotku β' , bylo zjištěno, že koncentrace RNAP výrazně stoupala se zvyšující se koncentrací živin v růstovém médiu, avšak volná frakce RNAP pro transkripci zůstala v určitém rozmezí těchto podmínek přibližně konstantní (Lloyd-Price *et al.*, 2016).

b) Efekt délky promotorových inzertů na transkripci genu *rpoB* u buněk *M. smegmatis* $\Delta Ms1$

Zajímavostí je, že 5'UTR oblast operonu *rpoB-rpoC* strukturně připomíná *Ms1*, který je předpovězen v dalších mykobateriích a aktinobateriích, jako je rod *Nocardia* nebo *Rhodococcus* (Hnilicová *et al.*, 2014). Přibližně 460 nt dlouhá 5'UTR oblast byla mimo jiné prokázána také pomocí RNA-seq v *M. tuberculosis* (Arnvig *et al.*, 2011). Následně jsme předpokládali, že pokud má *Ms1* vliv na regulaci operonu *rpoB-rpoC* prostřednictvím 5'UTR oblasti, měly by se výsledky β -galaktosidázové aktivity mezi kmeny wt a $\Delta Ms1$ lišit. V promotorové oblasti 375 bp *upstream* od startovacího kodonu genu *rpoB* byl sledován pokles aktivity o 30 % v porovnání s kmenem wt. Jinými slovy nepřítomnost *Ms1* ($\Delta Ms1$) vedla ke snížení aktivity

promotoru P1 a/nebo třetí neznámého promotoru přibližně ~ 1,5x. Na základě dat z RNA-seq je známo, že během stacionární fáze růstu dochází u Ms1 ke snížení exprese podjednotek β a β' RNAP na polovinu a k poklesu hladiny RNAP o ~30 % v porovnání s kmeny wt. U buněk Δ Ms1 tedy chybí rezervoár RNAP, který je přítomný v komplexu Ms1+RNAP u buněk wt. Vzhledem k tomu, že Ms1 je vysoce abundatní během stacionární fáze růstu a během exponenciální fáze růstu tvoří ~0,1% non-rRNA transkriptů (Hnilicová *et al.*, 2014; Šiková *et al.*, 2019), nebyl doposud u kmenů Δ Ms1 během této růstové fáze měřen pokles exprese podjednotek β a β' RNAP a ani stanovena hladina RNAP na úrovni proteinu. Pro kompletnost výsledků by bylo dobré určit množství RNAP izolované z buněk wt a Δ Ms1 získaných z exponenciální fáze růstu na úrovni RNA a proteinů.

Dále byl u kmenů Δ Ms1 sledován přibližně ~20% pokles aktivity genu *rpoB* transkribovaného z oblasti 222 bp *upstream* od transkripčního počátku. K poklesům síly promotoru může také docházet díky přítomnosti palindromu, který vytváří neobvyklé struktury DNA, ovlivňující tvorbu iniciačních komplexů pro transkripci (Krásný *et al.*, 2000). Nepřítomnost Ms1 však dále uvolnila inhibiční efekt v oblasti 295 bp od transkripčního počátku genu *rpoB*. Nárůst o přibližně 27 % může být způsoben uvolněním neznámého faktoru ze sekvence, která se u mutovaného kmene bez Ms1 nenachází. I přesto, že je vazba Ms1 během exponenciální fáze výrazně nižší (Šiková *et al.*, 2019), stále může ovlivňovat expresi z operonu *rpoB-rpoC*.

Přítomnost Ms1 zvyšuje množství mRNA kódující pojednotky β a β' RNAP ve stacionární fázi (Šiková *et al.*, 2019). Je tedy pravděpodobné, že Ms1 je důležitá pro regulaci množství podjednotky β a β' RNAP. Jaký je regulační mechanismus Ms1 z *M. smegmatis* ovlivňující expresi z operonu *rpoB-rpoC* zůstává i nadále nezodpovězeno. Do budoucna by bylo dobré otestovat hypotézu, zda RNAP reguluje svou vlastní expresi a/nebo přítomnost Ms1 v komplexu s molekulami RNAP během stacionární fáze nepřímo umožňuje uniknout této vlastní regulaci. Ochrana jádra RNAP před degradací pak napomáhá buňce lépe přežívat nepříznivé podmínky okolního prostředí (Gengenbacher a Kaufann, 2012). RNAP v komplexu s Ms1 se nepodílí na regulaci exprese *rpoB-rpoC*, takže celkové množství RNAP izolované u wt je vyšší než u Δ Ms1 (Šiková *et al.*, 2019). Do budoucna by bylo dobré zjistit, zda

RNAP asociuje s 5'UTR oblastí operonu *rpoB-rpoC*. Rozdíly ve vazbě RNAP by se měly vzájemně lišit mezi kmeny wt a $\Delta Ms1$.

Na základě dat z RNA-seq (nepublikovaná data) je zřejmé, že třetí, doposud nepopsaný promotor, je aktivní zejména ve stacionární fázi růstu. V rámci této diplomové práce byly kultivovány vzorky do časně stacionární fáze. Získané vzorky budou do budoucna sloužit ke stanovení aktivity inzertů promotorů genu *rpoB* pomocí kvantitativní PCR (qPCR). LacZ protein je stabilnější a více se kumuluje během exponenciální fáze růstu, a proto je vhodné jeho použití pro měření β -galaktosidázové aktivity. Avšak na základě dříve provedených experimentů (Krásný *et al.*, 2008; Šiková *et al.*, 2019) bylo zjištěno, že během stacionární fáze růstu je přesnější stanovit hladinu *lacZ* mRNA pomocí qPCR (Wong a Medrano, 2005; Corbisier *et al.*, 2015).

Vazební partneři proteinu MoaB2

Ko-imunoprecipitační techniky jsou široce používané metody umožňující studium meziproteinových interakcí (Antrobus a Borner, 2011). V rámci této diplomové práce byly proteiny MoaB2, CarD, RbpA, σ^A a σ^{AC} fúzovány s afinitivní značkou FLAG. Použití FLAG-značení bylo zvoleno z toho důvodu, že se nepodařilo připravit vysoce specifické myší ani kralíčí protilátky.

Značka FLAG je oktapeptidový uměle vytvořený antigen, který může být fúzován s N- nebo C- koncem studovaného proteinu. Díky specifickým vysoce afinitním monoklonálním protilátkám, lze použít FLAG-značení k izolaci proteinových komplexů o dostatečné čistotě (Einhauer a Jungbauer, 2001). FLAG-značené fúzované proteiny byly klonovány s vektorem pTet INT a následně transformovány do buněk *M. smegmatis*. Pomocí anti-FLAG M2 monoklonální protilátky byly proteiny imunoprecipitovány a následně separovány metodou SDS-PAGE. Získané proteinové proužky byly analyzovány pomocí hmotností spektrometrie.

a) Faktor σ^A

Bylo potvrzeno, že faktor σ^A byl stažen společně s novým proteinem MoaB2 u vzorků izolovaných ze stacionární fáze růstu. Interakce proteinu MoaB2 s faktorem σ^A je obzvláště zajímavá, protože doposud bylo popsáno málo proteinů, které přímo

interagují s bakteriálními faktory sigma. Například u transkripčního faktoru RbpA, studovaného u *M. tuberculosis*, bylo zjištěno, že je schopný přímo interagovat jak se σ^A tak σ^B (Bortoluzzi *et al.*, 2013). U *E. coli* a *Salmonella enterica* je studován protein Crl, který přímo interaguje s doménou 2 faktoru σ^S a podílí se na iniciaci transkripce (Banta *et al.*, 2014). Funkce proteinu MoaB2 je doposud neznámá. Je možné, že obdobně jako protein Crl, který stimuluje σ^S dependentní transkripci (Zhao *et al.*, 2019), má MoaB2 stimulační vliv na σ^A dependentní transkripci. Není však ani vyloučeno, že může protein MoaB2 v komplexu s σ^A transkripci inhibovat.

Pro potvrzení interakce, že MoaB2 je novým interakčním partnerem σ^A , jsme se pokusili stáhnout σ^A přes FLAG-značený protein MoaB2. Tuto interakci se však nepodařilo potvrdit a metodou ko-imunoprecipitace jsme získali nejspíše jen volnou formu proteinu MoaB2 a její kratší formy. Srovnáním sekvencí z FLAG- σ^A a FLAG-MoaB2 získané z hmotnostní spektrometrie jsme ale zjistili, že faktor σ^A stahuje kratší formu proteinu MoaB2 o velikosti 15 kDa. Do budoucna by bylo vhodné připravit kmeny se zkrácenou formou MoaB2-FLAG a pomocí ko-imunoprecipitace a SDS-PAGE zjistit, zda stáhneme σ^A . Je možné, že FLAG-značky na N- nebo C-koncové části MoaB2 mohou měnit konformaci proteinu, která může bránit vazbě na σ^A . Následná změna konformace může způsobit ztrátu aktivity příslušného proteinu (Bräuer *et al.*, 2019). Druhou příčinou může být, že N- a/nebo C-terminální část proteinu MoaB2 je orientována směrem do faktoru σ^A , FLAG-značka tak není přístupná pro vazbu na FLAG-značenou protilátku.

Existují však i alternativní metody, kterými lze do budoucna testovat protein-proteinové interakce. Jednou z nich je gelová retardační analýza (EMSA - *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), díky které lze stanovovat komplexy různých stechiometrií a konformací (Hellman a Fried, 2007). EMSA je jedna z nejcitlivějších metod určená k měření kvalitativních i kvantitativních informací o DNA-proteinových interakcích. Princip metody je založen na rozdílné elektroforetické pohyblivosti komplexu DNA-protein vůči samotné DNA, přičemž volná DNA vykazuje na gelu vyšší mobilitu. Vytvořený komplex lze potvrdit přidáním sekundární protilátky a následně ho lze detekovat pomocí DNA sekvence značené radioizotopem ^{32}P nebo fluoforem (Gaudreault *et al.*, 2009). Druhou možností studia proteinových interakcí je použití mikroskopické termoforézy (MST – *MicroScale*

Thermophoresis), která je založena na řízeném pohybu molekul v teplotním gradientu v závislosti na molekulárních vlastnostech (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011).

b) CarD a RbpA

Dále nás zajímalo, zda MoaB2 váže mykobakteriální transkripční faktory RbpA a CarD. MoaB2 by se mohla vázat přes tyto transkripční faktory na σ^A . U mykobakterií se tyto esenciální transkripční faktory uplatňují při stabilizaci promotorového komplexu s RNAP (Srivastava *et al.*, 2013). Společně s faktorem σ^A a MoaB2 byl stažen také protein RbpA, který jak je známo stabilizuje vazbu RNAP s faktorem σ^A (Hu *et al.*, 2012). Se samotným proteinem MoaB2 však neinteragoval ani transkripční faktor RbpA ani CarD. Při detailním studiu získaných SDS PAGE gelů byla potvrzena přítomnost komplexu transkripčního faktoru RbpA, RNAP, σ^A a proteinu HelD, který zabraňuje nespécifickým interakcím mezi RNAP a DNA, což přispívá k efektivnímu fungování transkripčního aparátu (Kouba *et al.*, 2020). Obzvláště zajímavá je společná přítomnost proteinu HelD a faktoru σ^A na RNAP, protože u doposud provedených studií u *B. subtilis* nebyla tato vazba zjištěna (Burnley *et al.*, 2017). Z našich výsledků pak vyplívá, že transkripční faktor CarD interaguje jak s σ^A , tak RNAP, ale ne s proteinem HelD. Je možné, že HelD kompletuje o vazbu s transkripčním faktorem CarD na RNAP nebo na RbpA. I přesto, že přímá interakce mezi RbpA a CarD není pomocí strukturního modelování předpovězena, není ani vyloučeno, že k takové interakci může docházet. Roli v interakci mezi CarD a RbpA může hrát základní doména faktoru RbpA, jejíž umístění v iniciačním komplexu není známo, ale předpokládá se, že se nachází v těsné blízkosti C-koncové domény transkripčního faktoru CarD (Rammohan *et al.*, 2016).

Mimo jiné bylo také zjištěno, že FLAG-značený protein MoaB2 neinteraguje s RNAP. Avšak σ^A v komplexu s navázaným faktorem RbpA a zkrácenou formou MoaB2 asocijují s RNAP. Na základě predikované modelové struktury bylo navrženo, že MoaB2 a RbpA nekompetují o vazbu na RNAP a mohou se vázat současně (nepublikované data). Získané výsledky tento model podporují.

Role N-terminální domény σ^A při interakci s MoaB2

Z našich dosud nepublikovaných výsledků jsme zjistili, že protein MoaB2 interaguje jen s faktorem σ^A a s žádným dalším faktorem sigma. Faktor σ^A u mykobakterií sdílí sekvenční homologii s faktorem σ^B , s výjimkou jedinečné, přibližně 150 aminokyselin dlouhé N-terminální domény (Hubin *et al.*, 2017). Pro zjištění odpovědi, zda je tato doména nezbytná pro interakci s faktorem σ^A , byly pro testování *in vivo* připraveny FLAG-značené konstrukty σ^A (s N-terminální doménou) a σ^{AC} (bez N-terminální domény). FLAG-fúzané proteiny byly klonovány s plazmidem pTet INT. Prvotní výsledky imunoprecipitace naznačily, že MoaB2 vyžaduje pro vazbu s faktorem σ^A N-terminální doménu. Aby bylo možné tuto skutečnost potvrdit, bylo nutné nejprve optimalizovat expresi obou sigem. Vektor pTet INT je vybaven promotorem tet, čímž je možné regulovat expresi v závislosti na přidání různé koncentrace anhydrotetracyklinu (Evans a Mizrahi, 2015). Následná identifikace proteinů probíhala metodou Western blot. K detekci proteinů jsme zvolili chemiluminiscenční přístup, který je citlivější než detekce pomocí fluorescence. Jako reportérový enzym byla použita křenová peroxidáza, která katalyzuje přeměnu chemiluminiscenčního substrátu. Tato reakce je doprovázena emitací světelného záření (Charette *et al.*, 2010). I přes snahu zoptimalizovat expresi σ^A a σ^{AC} , je z intenzity nových proteinových proužků patrné, že se optimalizace nevydařila. I nadále tedy zůstává otázkou, zda protein MoaB2 skutečně vyžaduje pro vazbu s faktorem σ^A přítomnost N-terminální domény. Avšak z SDS PAGE gelů je patrné, že po delecí ~ 150 aminokyselin dlouhé N-terminální domény se může faktor σ^A stále vázat na RNAP. Obdobný efekt byl sledován také u faktoru σ^{54} (Syed a Gralla, 1998). Snížením intenzity proteinových proužků faktoru σ^A o 20 % by znamenalo, že se u faktoru σ^{AC} pohybujeme na úrovni šumu pozadí. Důvodem velmi slabého signálu může být, že N-terminální doména má vliv na stabilitu faktoru σ^A a tedy na množství σ^{AC} stažené při imunoprecipitaci. Role N-terminální domény, která se u mykobakterií liší od N-terminální domény *E. coli* i *B. subtilis* (Zachrdla *et al.*, 2017), zůstává stále nejasná. Pro zvýšení citlivosti detekce pomocí protilátky anti-FLAG M2 lze do budoucna fúzovat faktor σ^{AC} s 3xFLAG-značkou. Tato fúze umožňuje až 200x citlivější detekci v porovnání s jinými systémy (6xHis-tag, GST, atd.) a běžně se používá pro studium alternativních faktorů sigma (Edgar *et al.*, 2017; Lago *et al.*, 2017). Dalším přístupem může být přípravení deplečního kmene

s faktorem σ^A metodou CRISPR, účinnou metodou používanou v genovém inženýrství (Ran *et al.*, 2013). Je však spekulativní, nakolik by byla tato deplece úspěšná, neboť faktor σ^A je esenciálním faktorem mykobakterií (Wu *et al.*, 2004) a zbytkové množství σ^A by mohlo tuto interakci ovlivňovat. Složitost deplece *housekeeping* faktorů sigma u bakterií demonstruje jejich nutnost při zachování jednotlivých regulačních procesů v buňce (Rebets *et al.*, 2018).

Pro zjištění funkce N-terminální domény faktoru σ^A navrhujeme do budoucna na základě zoptimalizované exprese provést další ko-imunoprecipitační testy se σ^A a σ^{AC} . Společně s testy *in vitro* za použití purifikovaných proteinů nám tato data umožní získat povědomí o tom, jak dochází k interakci mezi MoaB2 a σ^A .

8 ZÁVĚR

V první části této diplomové práce byly pro kmeny wt a Δ Ms1 připraveny fragmenty promotoru P_{rpoB} o různé délce. Následně byly tyto komponenty použity pro testování promotorové aktivity *in vivo* v buňkách *M. smegmatis*, izolovaných z exponenciální fáze růstu.

Na základě výsledků měření β -galaktosidázové aktivity jednotlivých promotorových oblastí, bylo vyvozeno několik závěrů:

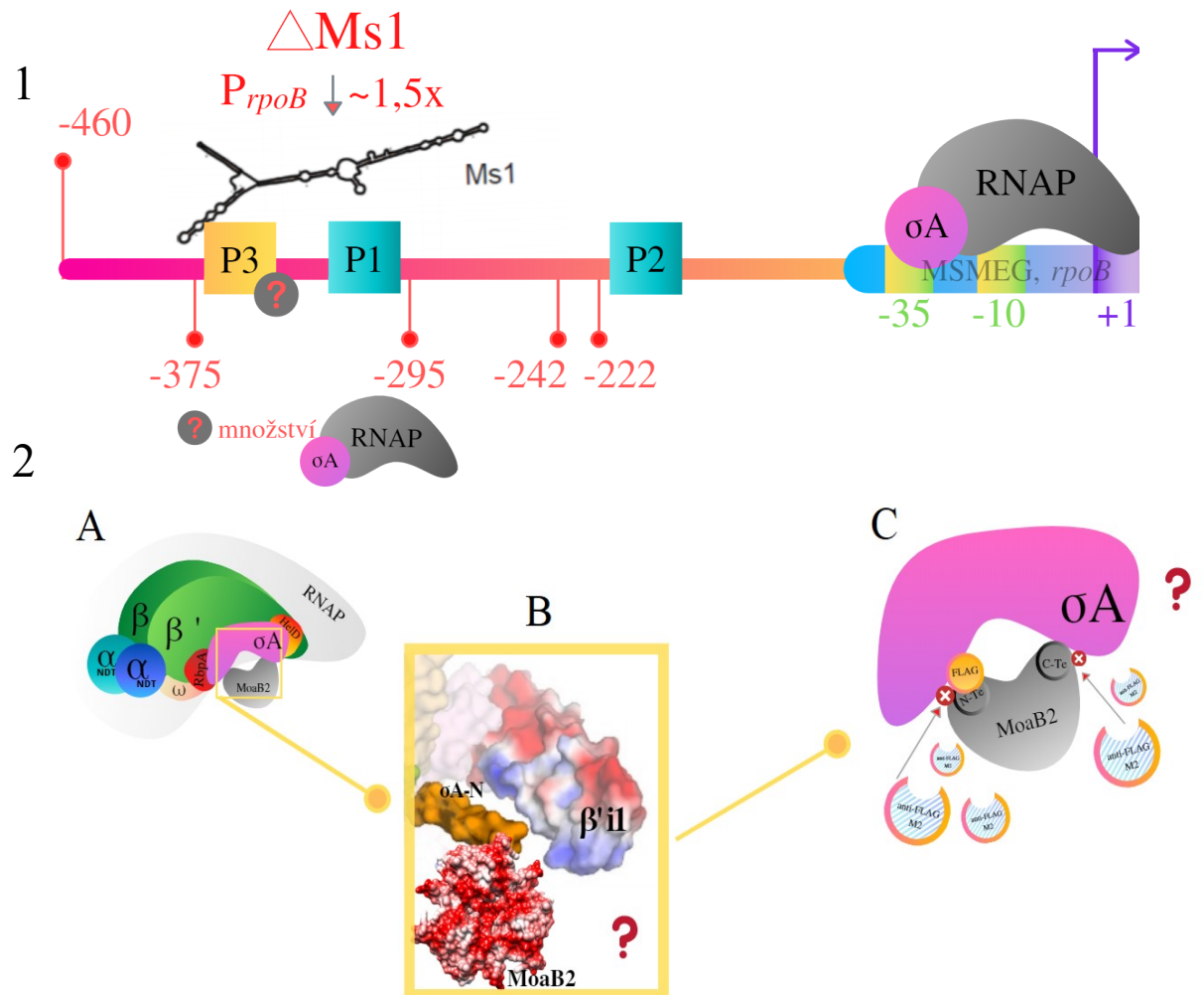
- Promotorová oblast 375 bp *upstream* od transkripčního počátku genu *rpoB* zvýšila svou aktivitu téměř dvojnásobně a může mít vliv na regulaci exprese genu *rpoB*.
- Nepřítomnost Ms1 (Δ Ms1), vede k snížení aktivity této promotorové oblasti přibližně $\sim 1,5$ x.

Z toho vyplývá, že malá nekódující sRNA – Ms1, která strukturně připomíná 5'UTR oblast operonu *rpoB-ropC*, má pravděpodobně vliv na expresi genu *rpoB* a tedy na regulaci RNAP. Oblast 375 bp *upstream* může být klíčovou oblastí, která se do této regulace zapojuje.

V druhé části této diplomové práce byly u proteinů: MoaB2, CarD, RbpA, σ^A a σ^{AC} , fúzovaných s FLAG-značkou, sledovány meziproteinové interakce. Na základě výsledků ko-immunoprecipitačních technik bylo zjištěno, že:

- Společně s faktorem σ^A interaguje zkrácená verze proteinu MoaB2.
- Volná forma proteinu MoaB2 neasocijuje s RNAP.
- Transkripční faktor RbpA a CarD se na interakci s MoaB2 nepodílí.
- Důležitost N-terminální domény σ^A pro interakci s MoaB2 nebyla stále potvrzena.

Tato diplomová práce přispěla k částečnému pochopení a doporučení nových směrů studia mechanismů, jakými malá sRNA Ms1 reguluje množství RNAP. Také se podařilo přispět k charakterizaci nově objeveného proteinu MoaB2, čímž bude do budoucna lépe pochopeno, jaká je role tohoto proteinu v mykobakteriální transkripci.



Obrázek 37 Shrnutí regulace mykobakteriální transkripce v kontextu s výsledky této práce: (1) Schéma možného působení malé nekódující sRNA Ms1 v oblasti, kde se nachází σ^A dependentní promotor P1 genu *rpoB* (přibližně 330 bp *upstream* od transkripčního počátku) a/nebo třetí, doposud neznámý promotor. 5'UTR oblast operonu *rpoB-rpoC* (dlouhá přibližně 460 nt) strukturně připomíná Ms1 a domníváme se, že oblast 375 bp *upstream* může mít v této regulaci svůj význam. V oblasti 375 bp *upstream* od transkripčního počátku genu *rpoB* byla sledována druhá nejvyšší promotorová aktivita testovaných kmenů *M. smegmatis* wt a také nejvyšší pokles aktivity ($\sim 1,5x$) u kmenů bez Ms1 ($\Delta Ms1$). Jaké je množství RNAP v kmenech bez Ms1 v exponenciální fázi růstu není známo. **(2)** A S faktorem σ^A interaguje zkrácená verze proteinu MoaB2 o velikosti 15 kDa, mykobakteriální transkripční faktory RbpA a CarD jsou v komplexech s faktorem σ^A , nikoliv však s proteinem MoaB2. Společně s RNAP, σ^A a faktorem RbpA byl stažen také protein HelD. Tento protein se v komplexu s CarD nenachází. Volná forma proteinu MoaB2 s RNAP neinteraguje. **(B)** Role N-terminální domény (σ^A -N) nebyla stále potvrzena (převzato a upraveno z: Hubin *et al.*, 2017; model proteinu MoaB2-Jiří Zahradník-nepublikováno). **(C)** Je možné, že N-terminální část proteinu MoaB2 s fúzovanou FLAG-značkou a/nebo také C-terminální část proteinu je orientována směrem do faktoru σ^A , což znemožňuje vazbu anti-FLAG M2 protilátky

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) Agaisse, H., & Lereclus, D. (1996). STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Molecular microbiology*, 20(3), 633–643. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5401046.x>
- 2) Agarwal, N., & Tyagi, A. K. (2006). Mycobacterial transcriptional signals: requirements for recognition by RNA polymerase and optimal transcriptional activity. *Nucleic acids research*, 34(15), 4245–4257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl521>
- 3) Alhadid, Y., Chung, S., Lerner, E., Taatjes, D. J., Borukhov, S., & Weiss, S. (2017). Studying transcription initiation by RNA polymerase with diffusion-based single-molecule fluorescence. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 26(7), 1278–1290. <https://doi.org/10.1002/pro.3160>
- 4) Antrobus, R., & Borner, G. H. (2011). Improved elution conditions for native co-immunoprecipitation. *PloS one*, 6(3), e18218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018218>
- 5) Arnold, F. M., Hohl, M., Remm, S., Koliwer-Brandl, H., Adenau, S., Chusri, S., Sander, P., Hilbi, H., & Seeger, M. A. (2018). A uniform cloning platform for mycobacterial genetics and protein production. *Scientific reports*, 8(1), 9539. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27687-5>
- 6) Arnvig, K. B., Comas, I., Thomson, N. R., Houghton, J., Boshoff, H. I., Croucher, N. J., Rose, G., Perkins, T. T., Parkhill, J., Dougan, G., & Young, D. B. (2011). Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 7(11), e1002342. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002342>
- 7) Bader, G., Gomez-Ortiz, M., Haussmann, C., Bacher, A., Huber, R., & Fischer, M. (2004). Structure of the molybdenum-cofactor biosynthesis protein MoaB of *Escherichia coli*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 60(Pt 6), 1068–1075. <https://doi.org/10.1107/S0907444904007164>
- 8) Bae, B., Chen, J., Davis, E., Leon, K., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2015). CarD uses a minor groove wedge mechanism to stabilize the RNA polymerase open promoter complex. *eLife*, 4, e08505. <https://doi.org/10.7554/eLife.08505>
- 9) Banta, A. B., Cuff, M. E., Lin, H., Myers, A. R., Ross, W., Joachimiak, A., & Gourse, R. L. (2014). Structure of the RNA polymerase assembly factor Crl and identification of its interaction surface with sigma S. *Journal of bacteriology*, 196(18), 3279–3288. <https://doi.org/10.1128/JB.01910-14>
- 10) Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J., & Minchin, S. D. (1997). Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *The EMBO journal*, 16(13), 4034–4040. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.4034>

- 11) Barvík, I., Rejman, D., Panova, N., Šanderová, H., & Krásný, L. (2017). Non-canonical transcription initiation: the expanding universe of transcription initiating substrates. *FEMS microbiology reviews*, *41*(2), 131–138. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw041>
- 12) Basu, R. S., Warner, B. A., Molodtsov, V., Pupov, D., Esyunina, D., Fernández-Tornero, C., Kulbachinskiy, A., & Murakami, K. S. (2014). Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*, *289*(35), 24549–24559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.584037>
- 13) Belinky, F., Rogozin, I. B., & Koonin, E. V. (2017). Selection on start codons in prokaryotes and potential compensatory nucleotide substitutions. *Scientific reports*, *7*(1), 12422. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12619-6>
- 14) Bird, J. G., Zhang, Y., Tian, Y., Panova, N., Barvík, I., Greene, L., Liu, M., Buckley, B., Krásný, L., Lee, J. K., Kaplan, C. D., Ebright, R. H., & Nickels, B. E. (2016). The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA. *Nature*, *535*(7612), 444–447. <https://doi.org/10.1038/nature18622>
- 15) Bortoluzzi, A., Muskett, F. W., Waters, L. C., Addis, P. W., Rieck, B., Munder, T., Schleier, S., Forti, F., Ghisotti, D., Carr, M. D., & O'Hare, H. M. (2013). Mycobacterium tuberculosis RNA polymerase-binding protein A (RbpA) and its interactions with sigma factors. *The Journal of biological chemistry*, *288*(20), 14438–14450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459883>
- 16) Borukhov, S., Lee, J., & Laptenko, O. (2005). Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular microbiology*, *55*(5), 1315–1324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04481.x>
- 17) Borukhov, S., Sagitov, V., & Goldfarb, A. (1993). Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell*, *72*(3), 459–466. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90121-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90121-6)
- 18) Boyaci, H., Chen, J., Lilic, M., Palka, M., Mooney, R. A., Landick, R., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2018). Fidaxomicin jams *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase motions needed for initiation via RbpA contacts. *eLife*, *7*, e34823. <https://doi.org/10.7554/eLife.34823>
- 19) Bräuer, M., Zich, M.T., Önder, K. et al. The influence of commonly used tags on structural propensities and internal dynamics of peptides. *Monatsh Chem* *150*, 913–925 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00706-019-02401-x>
- 20) Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature reviews. Microbiology*, *2*(1), 57–65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro787>
- 21) Browning, D. F., & Busby, S. J. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, *14*(10), 638–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>

- 22) Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., & Bautz, E. K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221(5175), 43–46. <https://doi.org/10.1038/221043a0>
- 23) Burnley, T., Palmer, C. M., & Winn, M. (2017). Recent developments in the CCP-EM software suite. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, 73(Pt 6), 469–477. <https://doi.org/10.1107/S2059798317007859>
- 24) Buskirk, A. R., & Green, R. (2017). Ribosome pausing, arrest and rescue in bacteria and eukaryotes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 372(1716), 20160183. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0183>
- 25) Cabrera-Ostertag, I. J., Cavanagh, A. T., & Wassarman, K. M. (2013). Initiating nucleotide identity determines efficiency of RNA synthesis from 6S RNA templates in *Bacillus subtilis* but not *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 41(15), 7501–7511. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt517>
- 26) Cardinale, C. J., Washburn, R. S., Tadigotla, V. R., Brown, L. M., Gottesman, M. E., & Nudler, E. (2008). Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5878), 935–938. <https://doi.org/10.1126/science.1152763>
- 27) Cavanagh, A. T., & Wassarman, K. M. (2014). 6S RNA, a global regulator of transcription in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and beyond. *Annual review of microbiology*, 68, 45–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150135>
- 28) Cavanagh, A. T., Chandrangsu, P., & Wassarman, K. M. (2010). 6S RNA regulation of relA alters ppGpp levels in early stationary phase. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 12), 3791–3800. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043992-0>
- 29) Cavanagh, A. T., Sperger, J. M., & Wassarman, K. M. (2012). Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic acids research*, 40(5), 2234–2246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1003>
- 30) Cayuela, M. L., Elías-Arnanz, M., Peñalver-Mellado, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2003). The *Stigmatella aurantiaca* homolog of *Myxococcus xanthus* high-mobility-group A-type transcription factor CarD: insights into the functional modules of CarD and their distribution in bacteria. *Journal of bacteriology*, 185(12), 3527–3537. <https://doi.org/10.1128/jb.185.12.3527-3537.2003>
- 31) Corbisier, P., Pinheiro, L., Mazoua, S., Kortekaas, A. M., Chung, P. Y., Gerganova, T., Roebben, G., Emons, H., & Emslie, K. (2015). DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(7), 1831–1840. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8458-z>

- 32) Corrigan, R. M., Bellows, L. E., Wood, A., & Gründling, A. (2016). ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), E1710–E1719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522179113>
- 33) Cortes, T., Schubert, O. T., Rose, G., Arnvig, K. B., Comas, I., Aebersold, R., & Young, D. B. (2013). Genome-wide mapping of transcriptional start sites defines an extensive leaderless transcriptome in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell reports*, *5*(4), 1121–1131. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.031>
- 34) Cramer, P., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science (New York, N.Y.)*, *292*(5523), 1863–1876. <https://doi.org/10.1126/science.1059493>
- 35) Dallmeier, K., & Neyts, J. (2013). Simple and inexpensive three-step rapid amplification of cDNA 5' ends using 5' phosphorylated primers. *Analytical biochemistry*, *434*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.031>
- 36) Davis, E., Chen, J., Leon, K., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2015). Mycobacterial RNA polymerase forms unstable open promoter complexes that are stabilized by CarD. *Nucleic acids research*, *43*(1), 433–445. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1231>
- 37) de Hoon, M. J., Makita, Y., Nakai, K., & Miyano, S. (2005). Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS computational biology*, *1*(3), e25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010025>
- 38) deHaseth, P. L., Zupancic, M. L., & Record, M. T., Jr (1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *Journal of bacteriology*, *180*(12), 3019–3025.
- 39) Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R., & Jin, D. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *190*(3), 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.01092-07>
- 40) Edgar, R. J., Hampton, G. E., Garcia, G., Maher, M. J., Perugini, M. A., Ackerley, D. F., & Lamont, I. L. (2017). Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate iron acquisition and uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, *106*(6), 891–904. <https://doi.org/10.1111/mmi.13855>
- 41) Einhauer, A., & Jungbauer, A. (2001). The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of biochemical and biophysical methods*, *49*(1-3), 455–465. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(01\)00213-5](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(01)00213-5)
- 42) Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2010). The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: a bacterial enhanceosome?. *FEMS microbiology reviews*, *34*(5), 764–778. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00235.x>

- 43) Epshtein, V., Dutta, D., Wade, J., & Nudler, E. (2010). An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature*, *463*(7278), 245–249. <https://doi.org/10.1038/nature08669>
- 44) Epshtein, V., Mustaev, A., Markovtsov, V., Bereshchenko, O., Nikiforov, V., & Goldfarb, A. (2002). Swing-gate model of nucleotide entry into the RNA polymerase active center. *Molecular cell*, *10*(3), 623–634. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00640-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00640-8)
- 45) Evans, J. C., & Mizrahi, V. (2015). The application of tetracyclineregulated gene expression systems in the validation of novel drug targets in Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in microbiology*, *6*, 812. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00812>
- 46) Fedorec, A., Ozdemir, T., Doshi, A., Ho, Y. K., Rosa, L., Rutter, J., Velazquez, O., Pinheiro, V. B., Danino, T., & Barnes, C. P. (2019). Two New Plasmid Post-segregational Killing Mechanisms for the Implementation of Synthetic Gene Networks in Escherichia coli. *iScience*, *14*, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.03.019>
- 47) Flentie, K., Garner, A. L., & Stallings, C. L. (2016). Mycobacterium tuberculosis Transcription Machinery: Ready To Respond to Host Attacks. *Journal of bacteriology*, *198*(9), 1360–1373. <https://doi.org/10.1128/JB.00935-15>
- 48) Flynn, R. L., & Zou, L. (2010). Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *45*(4), 266–275. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.488216>
- 49) Gaudreault, M., Gingras, M. E., Lessard, M., Leclerc, S., & Guérin, S. L. (2009). Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *543*, 15–35. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-015-1_2
- 50) Gengenbacher, M., & Kaufmann, S. H. (2012). Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS microbiology reviews*, *36*(3), 514–532. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x>
- 51) Gentry, D. R., & Burgess, R. R. (1993). Cross-linking of Escherichia coli RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. *Biochemistry*, *32*(41), 11224–11227. <https://doi.org/10.1021/bi00092a036>
- 52) Ghosh, P., Ramakrishnan, C., & Chatterji, D. (2003). Inter-subunit recognition and manifestation of segmental mobility in Escherichia coli RNA polymerase: a case study with omega-beta' interaction. *Biophysical chemistry*, *103*(3), 223–237. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00271-5](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00271-5)
- 53) Girardin, R. C., Bai, G., He, J., Sui, H., & McDonough, K. A. (2018). AbmR (Rv1265) is a novel transcription factor of Mycobacterium tuberculosis that regulates host cell association and expression of the non-coding small RNA Mcr11. *Molecular microbiology*, *110*(5), 811–830. <https://doi.org/10.1111/mmi.14126>

- 54) Glyde, R., Ye, F., Jovanovic, M., Kotta-Loizou, I., Buck, M., & Zhang, X. (2018). Structures of Bacterial RNA Polymerase Complexes Reveal the Mechanism of DNA Loading and Transcription Initiation. *Molecular cell*, 70(6), 1111–1120.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.021>
- 55) Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5523), 1876–1882. <https://doi.org/10.1126/science.1059495>
- 56) Goldman, S. R., Ebricht, R. H., & Nickels, B. E. (2009). Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 927–928. <https://doi.org/10.1126/science.1169237>
- 57) Goldman, S. R., Nair, N. U., Wells, C. D., Nickels, B. E., & Hochschild, A. (2015). The primary σ factor in *Escherichia coli* can access the transcription elongation complex from solution in vivo. *eLife*, 4, e10514. <https://doi.org/10.7554/eLife.10514>
- 58) Goldman, S. R., Sharp, J. S., Vvedenskaya, I. O., Livny, J., Dove, S. L., & Nickels, B. E. (2011). NanoRNAs prime transcription initiation in vivo. *Molecular cell*, 42(6), 817–825. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.005>
- 59) Gourse, R. L., Ross, W., & Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Molecular microbiology*, 37(4), 687–695. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01972.x>
- 60) Grainger, D. C., & Busby, S. J. (2008). Global regulators of transcription in *Escherichia coli*: mechanisms of action and methods for study. *Advances in applied microbiology*, 65, 93–113. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00604-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00604-7)
- 61) Gries, T. J., Kontur, W. S., Capp, M. W., Saecker, R. M., & Record, M. T., Jr (2010). One-step DNA melting in the RNA polymerase cleft opens the initiation bubble to form an unstable open complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10418–10423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000967107>
- 62) Guérout-Fleury, A. M., Frandsen, N., & Stragier, P. (1996). Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 180(1-2), 57–61. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00404-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00404-0)
- 63) 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*, 42(7), 4606–4614. <https://doi.org/10.1093/nar/gku084>
- 64) Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 354–373. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux011>

- 65) Hahn, J., Thalmann, S., Migur, A., von Boeselager, R. F., Kubatova, N., Kubareva, E., Schwalbe, H., & Evguenieva-Hackenberg, E. (2017). Conserved small mRNA with an unique, extended Shine-Dalgarno sequence. *RNA biology*, *14*(10), 1353–1363. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1256534>
- 66) Harper, S., & Speicher, D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *681*, 259–280. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_14
- 67) Haugen, S. P., Berkmen, M. B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., & Gourse, R. L. (2006). rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, *125*(6), 1069–1082. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.034>
- 68) Haugen, S. P., Ross, W., & Gourse, R. L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature reviews. Microbiology*, *6*(7), 507–519. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1912>
- 69) Hayward, R. S., Igarashi, K., & Ishihama, A. (1991). Functional specialization within the alpha-subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *Journal of molecular biology*, *221*(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)80197-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80197-3)
- 70) Hecht, A., Glasgow, J., Jaschke, P. R., Bawazer, L. A., Munson, M. S., Cochran, J. R., Endy, D., & Salit, M. (2017). Measurements of translation initiation from all 64 codons in E. coli. *Nucleic acids research*, *45*(7), 3615–3626. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx070>
- 71) Hein, P. P., Kolb, K. E., Windgassen, T., Bellecourt, M. J., Darst, S. A., Mooney, R. A., & Landick, R. (2014). RNA polymerase pausing and nascent-RNA structure formation are linked through clamp-domain movement. *Nature structural & molecular biology*, *21*(9), 794–802. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2867>
- 72) Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature protocols*, *2*(8), 1849–1861. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
- 73) Henderson, K. L., Felth, L. C., Molzahn, C. M., Shkel, I., Wang, S., Chhabra, M., Ruff, E. F., Bieter, L., Kraft, J. E., & Record, M. T., Jr (2017). Mechanism of transcription initiation and promoter escape by E. coli RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(15), E3032–E3040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618675114>
- 74) Heyduk, E., & Heyduk, T. (2018). DNA template sequence control of bacterial RNA polymerase escape from the promoter. *Nucleic acids research*, *46*(9), 4469–4486. <https://doi.org/10.1093/nar/gky172>
- 75) Hnilicová, J., Jirát Matějčková, J., Šiková, M., Pospíšil, J., Halada, P., Pánek, J., & Krásný, L. (2014). Ms1, a novel sRNA interacting with the RNA polymerase core in mycobacteria. *Nucleic acids research*, *42*(18), 11763–11776. <https://doi.org/10.1093/nar/gku793>

- 76) Hockenberry, A. J., Pah, A. R., Jewett, M. C., & Amaral, L. A. (2017). Leveraging genome-wide datasets to quantify the functional role of the anti-Shine-Dalgarno sequence in regulating translation efficiency. *Open biology*, 7(1), 160239. <https://doi.org/10.1098/rsob.160239>
- 77) Hsu, L. M., Vo, N. V., & Chamberlin, M. J. (1995). Escherichia coli transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11588–11592. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11588>
- 78) Hu, Y., & Coates, A. R. (1999). Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, in stationary-phase Mycobacterium tuberculosis. *Journal of bacteriology*, 181(2), 469–476. <https://doi.org/10.1128/JB.181.2.469-476.1999>
- 79) Hu, Y., Morichaud, Z., Chen, S., Leonetti, J. P., & Brodolin, K. (2012). Mycobacterium tuberculosis RbpA protein is a new type of transcriptional activator that stabilizes the σ A-containing RNA polymerase holoenzyme. *Nucleic acids research*, 40(14), 6547–6557. <https://doi.org/10.1093/nar/gks346>
- 80) Hu, Y., Wang, Z., Feng, L., Chen, Z., Mao, C., Zhu, Y., & Chen, S. (2016). σ (E)-dependent activation of RbpA controls transcription of the furA-katG operon in response to oxidative stress in mycobacteria. *Molecular microbiology*, 102(1), 107–120. <https://doi.org/10.1111/mmi.13449>
- 81) Hubin, E. A., Fay, A., Xu, C., Bean, J. M., Saecker, R. M., Glickman, M. S., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2017). Structure and function of the mycobacterial transcription initiation complex with the essential regulator RbpA. *eLife*, 6, e22520. <https://doi.org/10.7554/eLife.22520>
- 82) Hubin, E. A., Lilic, M., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2017). Structural insights into the mycobacteria transcription initiation complex from analysis of X-ray crystal structures. *Nature communications*, 8, 16072. <https://doi.org/10.1038/ncomms16072>
- 83) Hubin, E. A., Tabib-Salazar, A., Humphrey, L. J., Flack, J. E., Olinares, P. D., Darst, S. A., Campbell, E. A., & Paget, M. S. (2015). Structural, functional, and genetic analyses of the actinobacterial transcription factor RbpA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(23), 7171–7176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504942112>
- 84) Hurwitz J. (2005). The discovery of RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry*, 280(52), 42477–42485. <https://doi.org/10.1074/jbc.X500006200>
- 85) Charette, S. J., Lambert, H., Nadeau, P. J., & Landry, J. (2010). Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. *Journal of immunological methods*, 353(1-2), 148–150. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.12.007>

- 86) Chen, H., Dutta, T., & Deutscher, M. P. (2016). Growth Phase-dependent Variation of RNase BN/Z Affects Small RNAs: REGULATION OF 6S RNA. *The Journal of biological chemistry*, 291(51), 26435–26442. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757450>
- 87) Chen, Y. A., & Aravin, A. A. (2015). Non-Coding RNAs in Transcriptional Regulation: The review for *Current Molecular Biology Reports*. *Current molecular biology reports*, 1(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0002-6>
- 88) Chen, Y. J., Liu, P., Nielsen, A. A., Brophy, J. A., Clancy, K., Peterson, T., & Voigt, C. A. (2013). Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nature methods*, 10(7), 659–664. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2515>
- 89) Jacob, W. F., Santer, M., & Dahlberg, A. E. (1987). A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of Escherichia coli affects translation of many proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(14), 4757–4761. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.14.4757>
- 90) Jennings, M. J., Barrios, A. F., & Tan, S. (2016). Elimination of truncated recombinant protein expressed in Escherichia coli by removing cryptic translation initiation site. *Protein expression and purification*, 121, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.12.001>
- 91) Jensen, D., Manzano, A. R., Rammohan, J., Stallings, C. L., & Galburt, E. A. (2019). CarD and RbpA modify the kinetics of initial transcription and slow promoter escape of the Mycobacterium tuberculosis RNA polymerase. *Nucleic acids research*, 47(13), 6685–6698. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz449>
- 92) Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., & Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and drug development technologies*, 9(4), 342–353. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0380>
- 93) Jin, H., Zhao, Q., Gonzalez de Valdivia, E. I., Ardell, D. H., Stenström, M., & Isaksson, L. A. (2006). Influences on gene expression in vivo by a Shine-Dalgarno sequence. *Molecular microbiology*, 60(2), 480–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05110.x>
- 94) Keller, A. N., Yang, X., Wiedermannová, J., Delumeau, O., Krásný, L., & Lewis, P. J. (2014). ϵ , a new subunit of RNA polymerase found in gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology*, 196(20), 3622–3632. <https://doi.org/10.1128/JB.02020-14>
- 95) Klocko, A. D., & Wassarman, K. M. (2009). 6S RNA binding to Esigma(70) requires a positively charged surface of sigma(70) region 4.2. *Molecular microbiology*, 73(2), 152–164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06758.x>
- 96) Klumpp, S., & Hwa, T. (2008). Growth-rate-dependent partitioning of RNA polymerases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20245–20250. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804953105>

- 97) Kouba, T., Koval, T., Sudzinova, P., Pospíšil, J., Brezovska, B., Hnilicova, J., Sanderova, H., Janoušková, M., Sikova, M., Halada, P., Sýkora, M., Barvík, I., Novacek, J., Trundova, M., Duskova, J., Skalova, T., Chon, U., Murakami, K., Dohnalek, J. & Krásný, L. (2020). Mycobacterial HelD is a nucleic acids-clearing factor for RNA polymerase. <https://doi.org/10.1101/2020.07.20.211821>
- 98) Kouba, T., Pospíšil, J., Hnilicová, J., Šanderová, H., Barvík, I., & Krásný, L. (2019). The Core and Holoenzyme Forms of RNA Polymerase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 201(4), e00583-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00583-18>
- 99) Krásný, L., Tiserová, H., Jonák, J., Rejman, D., & Sanderová, H. (2008). The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 69(1), 42–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06256.x>
- 100) Krásný, L., Vacík, T., Fucík, V., & Jonák, J. (2000). Cloning and characterization of the str operon and elongation factor Tu expression in *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of bacteriology*, 182(21), 6114–6122. <https://doi.org/10.1128/jb.182.21.6114-6122.2000>
- 101) Kriner, M. A., & Groisman, E. A. (2017). RNA secondary structures regulate three steps of Rho-dependent transcription termination within a bacterial mRNA leader. *Nucleic acids research*, 45(2), 631–642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw889>
- 102) Kung, J. T., Colognori, D., & Lee, J. T. (2013). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*, 193(3), 651–669. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146704>
- 103) Kuo, S. T., Jahn, R. L., Cheng, Y. J., Chen, Y. L., Lee, Y. J., Hollfelder, F., Wen, J. D., & Chou, H. D. (2020). Global fitness landscapes of the Shine-Dalgarno sequence. *Genome research*, 30(5), 711–723. <https://doi.org/10.1101/gr.260182.119>
- 104) Lago, M., Monteil, V., Douche, T., Guglielmini, J., Criscuolo, A., Maufrais, C., Matondo, M., & Norel, F. (2017). Proteome remodelling by the stress sigma factor RpoS/ σ^S in *Salmonella*: identification of small proteins and evidence for post-transcriptional regulation. *Scientific reports*, 7(1), 2127. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02362-3>
- 105) Lane, W. J., & Darst, S. A. (2010). Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis. *Journal of molecular biology*, 395(4), 671–685. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.062>
- 106) Lee, D. J., Minchin, S. D., & Busby, S. J. (2012). Activating transcription in bacteria. *Annual review of microbiology*, 66, 125–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150012>
- 107) Lee, J., & Borukhov, S. (2016). Bacterial RNA Polymerase-DNA Interaction-The Driving Force of Gene Expression and the Target for Drug Action. *Frontiers in molecular biosciences*, 3, 73. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00073>

- 108) Lloyd-Price, J., Startceva, S., Kandavalli, V., Chandraseelan, J. G., Goncalves, N., Oliveira, S. M., Häkkinen, A., & Ribeiro, A. S. (2016). Dissecting the stochastic transcription initiation process in live *Escherichia coli*. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 23(3), 203–214. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw009>
- 109) Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F. R., & Smith, I. (1999). Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 31(2), 715–724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01212.x>
- 110) Mao, C., Zhu, Y., Lu, P., Feng, L., Chen, S., & Hu, Y. (2018). Association of ω with the C-Terminal Region of the β' Subunit Is Essential for Assembly of RNA Polymerase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 200(12), e00159-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00159-18>
- 111) Mechold, U., Fang, G., Ngo, S., Ogryzko, V., & Danchin, A. (2007). YtqI from *Bacillus subtilis* has both oligoribonuclease and pAp-phosphatase activity. *Nucleic acids research*, 35(13), 4552–4561. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm462>
- 112) Miller, L. P., Crawford, J. T., & Shinnick, T. M. (1994). The rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(4), 805–811. <https://doi.org/10.1128/aac.38.4.805>
- 113) Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., & Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 892–897. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.892>
- 114) Mitra, A., Angamuthu, K., Jayashree, H. V., & Nagaraja, V. (2009). Occurrence, divergence and evolution of intrinsic terminators across eubacteria. *Genomics*, 94(2), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.004>
- 115) Morse, R., O'Hanlon, K., & Collins, M. D. (2002). Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the beta subunit of DNA-dependent RNA polymerase of gram-positive and gram-negative bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(Pt 5), 1477–1484. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1477>
- 116) Motácková, V., Sanderová, H., Zidek, L., Nováček, J., Padrta, P., Svenková, A., Korelusová, J., Jonák, J., Krásný, L., & Sklenár, V. (2010). Solution structure of the N-terminal domain of *Bacillus subtilis* delta subunit of RNA polymerase and its classification based on structural homologs. *Proteins*, 78(7), 1807–1810. <https://doi.org/10.1002/prot.22708>
- 117) Murakami K. S. (2013). X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase σ 70 holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*, 288(13), 9126–9134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430900>

- 118) Murakami K. S. (2015). Structural biology of bacterial RNA polymerase. *Biomolecules*, 5(2), 848–864. <https://doi.org/10.3390/biom5020848>
- 119) Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O., & Darst, S. A. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5571), 1285–1290. <https://doi.org/10.1126/science.1069595>
- 120) Newton-Foot, M., & Gey van Pittius, N. C. (2013). The complex architecture of mycobacterial promoters. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 93(1), 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.08.003>
- 121) Olivarius, S., Plessy, C., & Carninci, P. (2009). High-throughput verification of transcriptional starting sites by Deep-RACE. *BioTechniques*, 46(2), 130–132. <https://doi.org/10.2144/000113066>
- 122) Paget M. S. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), 1245–1265. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>
- 123) Pánek, J., Krásny, L., Bobek, J., Jezková, E., Korelusová, J., & Vohradsky, J. (2011). The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures. *Nucleic acids research*, 39(8), 3418–3426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1186>
- 124) Park, J. S., & Roberts, J. W. (2006). Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4870–4875. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600145103>
- 125) Park, J. S., Marr, M. T., & Roberts, J. W. (2002). E. coli Transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell*, 109(6), 757–767. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00769-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00769-9)
- 126) Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., & Gourse, R. L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118(3), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.009>
- 127) Pemberton, I. K., Muskhelishvili, G., Travers, A. A., & Buckle, M. (2000). The G+C-rich discriminator region of the tyrT promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *Journal of molecular biology*, 299(4), 859–864. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3780>
- 128) Periago, P. M., van Schaik, W., Abee, T., & Wouters, J. A. (2002). Identification of proteins involved in the heat stress response of Bacillus cereus ATCC 14579. *Applied and environmental microbiology*, 68(7), 3486–3495. <https://doi.org/10.1128/aem.68.7.3486-3495.2002>
- 129) Pina, A. S., Batalha, I. L., & Roque, A. C. (2014). Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: an overview. *Methods in molecular*

- biology (Clifton, N.J.), 1129*, 147–168. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_14
- 130) Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical?. *Annual review of microbiology*, *62*, 35–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162903>
- 131) Prusa, J., Jensen, D., Santiago-Collazo, G., Pope, S. S., Garner, A. L., Miller, J. J., Ruiz Manzano, A., Galburt, E. A., & Stallings, C. L. (2018). Domains within RbpA Serve Specific Functional Roles That Regulate the Expression of Distinct Mycobacterial Gene Subsets. *Journal of bacteriology*, *200*(13), e00690-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00690-17>
- 132) Prusa, J., Zhu, D. X., & Stallings, C. L. (2018). The stringent response and Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *Pathogens and disease*, *76*(5), fty054. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty054>
- 133) Rabatinová, A., Šanderová, H., Jiráť Matějčková, J., Korelusová, J., Sojka, L., Barvík, I., Papoušková, V., Sklenář, V., Židek, L., & Krásný, L. (2013). The δ subunit of RNA polymerase is required for rapid changes in gene expression and competitive fitness of the cell. *Journal of bacteriology*, *195*(11), 2603–2611. <https://doi.org/10.1128/JB.00188-13>
- 134) Rammohan, J., Ruiz Manzano, A., Garner, A. L., Prusa, J., Stallings, C. L., & Galburt, E. A. (2016). Cooperative stabilization of Mycobacterium tuberculosis rrnAP3 promoter open complexes by RbpA and CarD. *Nucleic acids research*, *44*(15), 7304–7313. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw577>
- 135) Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, *8*(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- 136) Rebets, Y., Tsolis, K. C., Guðmundsdóttir, E. E., Koepff, J., Wawiernia, B., Busche, T., Bleidt, A., Horbal, L., Myronovskyi, M., Ahmed, Y., Wiechert, W., Rückert, C., Hamed, M. B., Bilyk, B., Anné, J., Friðjónsson, Ó., Kalinowski, J., Oldiges, M., Economou, A., & Luzhetskyy, A. (2018). Characterization of Sigma Factor Genes in *Streptomyces lividans* TK24 Using a Genomic Library-Based Approach for Multiple Gene Deletions. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3033. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03033>
- 137) Revyakin, A., Liu, C., Ebright, R. H., & Strick, T. R. (2006). Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5802), 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.1131398>
- 138) Richardson J. P. (2003). Loading Rho to terminate transcription. *Cell*, *114*(2), 157–159. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00554-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00554-3)
- 139) Rojo F. (2001). Mechanisms of transcriptional repression. *Current opinion in microbiology*, *4*(2), 145–151. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00180-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00180-6)
- 140) Ross, W., Ernst, A., & Gourse, R. L. (2001). Fine structure of E. coli RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes & development*, *15*(5), 491–506. <https://doi.org/10.1101/gad.870001>

- 141) Ross, W., Vrentas, C. E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2013). The magic spot: a ppGpp binding site on E. coli RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Molecular cell*, *50*(3), 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.021>
- 142) Rudra, P., Prajapati, R. K., Banerjee, R., Sengupta, S., & Mukhopadhyay, J. (2015). Novel mechanism of gene regulation: the protein Rv1222 of Mycobacterium tuberculosis inhibits transcription by anchoring the RNA polymerase onto DNA. *Nucleic acids research*, *43*(12), 5855–5867. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv516>
- 143) Rustad, T. R., Minch, K. J., Ma, S., Winkler, J. K., Hobbs, S., Hickey, M., Brabant, W., Turkarslan, S., Price, N. D., Baliga, N. S., & Sherman, D. R. (2014). Mapping and manipulating the Mycobacterium tuberculosis transcriptome using a transcription factor overexpression-derived regulatory network. *Genome biology*, *15*(11), 502. <https://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1701638048134699>
- 144) Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A. K., & Singh, Y. (2010). The sigma factors of Mycobacterium tuberculosis: regulation of the regulators. *The FEBS journal*, *277*(3), 605–626. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07479.x>
- 145) Shephard, L., Dobson, N., & Unrau, P. J. (2010). Binding and release of the 6S transcriptional control RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, *16*(5), 885–892. <https://doi.org/10.1261/rna.2036210>
- 146) Shi, T., & Xie, J. (2011). Molybdenum Enzymes and Molybdenum Cofactor in Mycobacteria. *Journal of cellular biochemistry*. 112. 2721-8. <https://doi.org/10.1002/jcb.23233>.
- 147) Skordalakes, E., & Berger, J. M. (2003). Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell*, *114*(1), 135–146. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00512-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00512-9)
- 148) Smale, S. (2010). -Galactosidase Assay. Cold Spring Harbor protocols. 2010. pdb.prot5423. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5423>
- 149) Sriyothi, L. & Saravanaraman, P., Prathama, T., Cheemala, A., Baluchamy, S. (2018). Roles of Non-Coding RNAs in Transcriptional Regulation. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76125>
- 150) Srivastava, D. B., Leon, K., Osmundson, J., Garner, A. L., Weiss, L. A., Westblade, L. F., Glickman, M. S., Landick, R., Darst, S. A., Stallings, C. L., & Campbell, E. A. (2013). Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(31), 12619–12624. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308270110>
- 151) Srivatsan, A., & Wang, J. D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current opinion in microbiology*, *11*(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.001>

- 152) Stallings, C. L., & Glickman, M. S. (2011). CarD: a new RNA polymerase modulator in mycobacteria. *Transcription*, 2(1), 15–18. <https://doi.org/10.4161/trns.2.1.13628>
- 153) Stallings, C. L., Stephanou, N. C., Chu, L., Hochschild, A., Nickels, B. E., & Glickman, M. S. (2009). CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for Mycobacterium tuberculosis persistence. *Cell*, 138(1), 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.041>
- 154) Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jäger, J., & Joyce, C. M. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5193), 2022–2025. <https://doi.org/10.1126/science.7528445>
- 155) Sudalaiyadum Perumal, A., Vishwakarma, R. K., Hu, Y., Morichaud, Z., & Brodolin, K. (2018). RbpA relaxes promoter selectivity of M. tuberculosis RNA polymerase. *Nucleic acids research*, 46(19), 10106–10118. <https://doi.org/10.1093/nar/gky714>
- 156) Syed, A., & Gralla, J. D. (1998). Identification of an N-terminal region of sigma 54 required for enhancer responsiveness. *Journal of bacteriology*, 180(21), 5619–5625. <https://doi.org/10.1128/JB.180.21.5619-5625.1998>
- 157) Šíková, M., Janoušková, M., Ramaniuk, O., Páleníková, P., Pospíšil, J., Bartl, P., Suder, A., Pajer, P., Kubičková, P., Pavliš, O., Hradilová, M., Vítovská, D., Šanderová, H., Převorovský, M., Hnilicová, J., & Krásný, L. (2019). Ms1 RNA increases the amount of RNA polymerase in Mycobacterium smegmatis. *Molecular microbiology*, 111(2), 354–372. <https://doi.org/10.1111/mmi.14159>
- 158) Tabib-Salazar, A., Liu, B., Doughty, P., Lewis, R. A., Ghosh, S., Parsy, M. L., Simpson, P. J., O'Dwyer, K., Matthews, S. J., & Paget, M. S. (2013). The actinobacterial transcription factor RbpA binds to the principal sigma subunit of RNA polymerase. *Nucleic acids research*, 41(11), 5679–5691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt277>
- 159) Tagami, S., Sekine, S. I., & Yokoyama, S. (2011). A novel conformation of RNA polymerase sheds light on the mechanism of transcription. *Transcription*, 2(4), 162–167. <https://doi.org/10.4161/trns.2.4.16148>
- 160) Taneja, S., & Dutta, T. (2019). On a stake-out: Mycobacterial small RNA identification and regulation. *Non-coding RNA research*, 4(3), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2019.05.001>
- 161) Treviño-Quintanilla, L. G., Freyre-González, J. A., & Martínez-Flores, I. (2013). Anti-Sigma Factors in E. coli: Common Regulatory Mechanisms Controlling Sigma Factors Availability. *Current genomics*, 14(6), 378–387. <https://doi.org/10.2174/1389202911314060007>
- 162) Trotochaud, A. E., & Wassarman, K. M. (2005). A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nature structural & molecular biology*, 12(4), 313–319. <https://doi.org/10.1038/nsmb917>

- 163) Tsujikawa, L., Tsodikov, O. V., & deHaseth, P. L. (2002). Interaction of RNA polymerase with forked DNA: evidence for two kinetically significant intermediates on the pathway to the final complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3493–3498. <https://doi.org/10.1073/pnas.062487299>
- 164) Vassylyev D. G. (2009). Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks. *Current opinion in structural biology*, *19*(6), 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.10.004>
- 165) Vassylyev, D. G., Vassylyeva, M. N., Perederina, A., Tahirov, T. H., & Artsimovitch, I. (2007). Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, *448*(7150), 157–162. <https://doi.org/10.1038/nature05932>
- 166) Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., & D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, *56*(4), 958–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04601.x>
- 167) Volpe, E., Cappelli, G., Grassi, M., Martino, A., Serafino, A., Colizzi, V., Sanarico, N., & Mariani, F. (2006). Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, *118*(4), 449–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02378.x>
- 168) Vrentas, C. E., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R. H., & Gourse, R. L. (2005). Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes & development*, *19*(19), 2378–2387. <https://doi.org/10.1101/gad.1340305>
- 169) Vvedenskaya, I. O., Sharp, J. S., Goldman, S. R., Kanabar, P. N., Livny, J., Dove, S. L., & Nickels, B. E. (2012). Growth phase-dependent control of transcription start site selection and gene expression by nanoRNAs. *Genes & development*, *26*(13), 1498–1507. <https://doi.org/10.1101/gad.192732.112>
- 170) Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., & Kornberg, R. D. (2006). Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, *127*(5), 941–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.023>
- 171) Wassarman K. M. (2007). 6S RNA: a small RNA regulator of transcription. *Current opinion in microbiology*, *10*(2), 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.008>
- 172) Weiss, A., & Shaw, L. N. (2015). Small things considered: the small accessory subunits of RNA polymerase in Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews*, *39*(4), 541–554. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv005>
- 173) Williams, M. J., Kana, B. D., & Mizrahi, V. (2011). Functional analysis of molybdopterin biosynthesis in mycobacteria identifies a fused molybdopterin synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, *193*(1), 98–106. <https://doi.org/10.1128/JB.00774-10>

- 174) Winkelman, J. T., Winkelman, B. T., Boyce, J., Maloney, M. F., Chen, A. Y., Ross, W., & Gourse, R. L. (2015). Crosslink Mapping at Amino Acid-Base Resolution Reveals the Path of Scrunched DNA in Initial Transcribing Complexes. *Molecular cell*, 59(5), 768–780. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.037>
- 175) Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- 176) Wu, S., Howard, S. T., Lakey, D. L., Kipnis, A., Samten, B., Safi, H., Gruppo, V., Wizel, B., Shams, H., Basaraba, R. J., Orme, I. M., & Barnes, P. F. (2004). The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of Mycobacterium tuberculosis in vivo. *Molecular microbiology*, 51(6), 1551–1562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03922.x>
- 177) Yang, C., Hockenberry, A. J., Jewett, M. C., & Amaral, L. (2016). Depletion of Shine-Dalgarno Sequences Within Bacterial Coding Regions Is Expression Dependent. *G3 (Bethesda, Md.)*, 6(11), 3467–3474. <https://doi.org/10.1534/g3.116.032227>
- 178) Yang, X., Molimau, S., Doherty, G. P., Johnston, E. B., Marles-Wright, J., Rothnagel, R., Hankamer, B., Lewis, R. J., & Lewis, P. J. (2009). The structure of bacterial RNA polymerase in complex with the essential transcription elongation factor NusA. *EMBO reports*, 10(9), 997–1002. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.155>
- 179) Yurovsky, A., Amin, M. R., Gardin, J., Chen, Y., Skiena, S., & Futcher, B. (2018). Prokaryotic coding regions have little if any specific depletion of Shine-Dalgarno motifs. *PloS one*, 13(8), e0202768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202768>
- 180) Zachrdla, M., Padrta, P., Rabatinová, A., Šanderová, H., Barvík, I., Krásný, L., & Židek, L. (2017). Solution structure of domain 1.1 of the σ^A factor from *Bacillus subtilis* is preformed for binding to the RNA polymerase core. *The Journal of biological chemistry*, 292(28), 11610–11617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784074>
- 181) Zaw, M. T., Emran, N. A., & Lin, Z. (2018). Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of infection and public health*, 11(5), 605–610. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.005>
- 182) Zhang, N., & Buck, M. (2015). A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. *Biomolecules*, 5(2), 1012–1019. <https://doi.org/10.3390/biom5021012>
- 183) Zhang, Y., Zborníková, E., Rejman, D., & Gerdes, K. (2018). Novel (p)ppGpp Binding and Metabolizing Proteins of *Escherichia coli*. *mBio*, 9(2), e02188-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02188-17>
- 184) Zhao, S., Zhang, K., Jiang, S., Liu, Z., Wang, Z., Wang, Y., & Liu, B. (2019). Resonance assignments of sigma factor S binding protein Crl from *Escherichia coli*. *Biomolecular NMR assignments*, 13(1), 223–226. <https://doi.org/10.1007/s12104-019-09881-2>

- 185) Zhu, J. H., Wang, B. W., Pan, M., Zeng, Y. N., Rego, H., & Javid, B. (2018). Rifampicin can induce antibiotic tolerance in mycobacteria via paradoxical changes in rpoB transcription. *Nature communications*, 9(1), 4218. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06667-3>
- 186) Zuo, Y., & Steitz, T. A. (2015). Crystal structures of the E. coli transcription initiation complexes with a complete bubble. *Molecular cell*, 58(3), 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.010>
- 187) Zuo, Y., Wang, Y., & Steitz, T. A. (2013). The mechanism of E. coli RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Molecular cell*, 50(3), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.020>