

ABSTRAKT

Klíčovým enzymem bakteriální transkripce je DNA-závislá RNA-polymeráza (RNAP). Její aktivita musí být přesně kontrolována. Tato kontrola může nastat na úrovni rozeznání různých verzí promotorové DNA, v různém stavu nadšroubovicovitého vinutí. Dále také pomocí změn ve vnitrobuněčné koncentraci metabolitů, nebo pomocí vazby proteinů, které se nazývají transkripční faktory.

I když byla RNAP a její regulační síť intenzivně studována po desítky let, stále nové a nové regulátory jsou objevovány. Hlavním cílem této doktorské práce je představit několik z nich: i) HelD, nový protein, který se váže na RNAP, a jehož trojrozměrná struktura zatím není známa; ii) RNázu J1, enzym s novým mechanismem funkce; iii) Spx, důležitý regulátor genové exprese v *Bacillus subtilis*, jehož všechny funkce zatím nejsou popsány a iv) vliv nadšroubovicovitého stavu promotorové DNA na transkripci.

V Publikaci I jsme popsali HelD protein jako nového vazebného partnera RNAP z *Bacillus subtilis* a charakterizovali jsme jeho biochemické vlastnosti. HelD zvyšuje transkripci tím, že pomáhá recyklovat molekuly RNAP, a tato aktivace je závislá na ATP. V Publikaci III jsme prezentovali první vhléd do trojrozměrné struktury HelD pomocí metody SAXS a popsali jsme doménové složení HelD proteinu. A v Publikaci VI jsme vyřešili strukturu proteinového komplexu HelD:RNAP z *Mycobacterium smegmatis* pomocí kryogenické elektronové mikroskopie. Také jsme popsali téměř celý cyklus vazby HelD na RNAP a ovlivnění transkripce tímto proteinem.

V Publikaci V jsme pro protein RNázu J1 popsali nový mechanismus fungování, který nebyl dříve v bakteriích znám. Jedná se o mechanismus „torpédo“ a RNáza J1 jím pomáhá uvolňovat zaseklé komplexy RNAP na DNA.

K publikovaným rolím v regulaci stresové odpovědi jsme pro protein Spx v Publikaci II přidali pozorování, že Spx působí také v teplotním stresu. Dělá tak zároveň s buněčným alarmonem ppGpp. Dále jsme identifikovali Spx a ppGpp jako novou součást odolnosti vůči teplotnímu šoku (Publikace IV).

Poslední část této práce popisuje, jak důležitou roli hraje stav nadšroubovicovitého vinutí promotorové DNA na iniciaci transkripce z ribozomálních promotorů. Tato regulace je závislá na hlavním faktoru sigma, a popsali jsme ji pro více růstových fází. Stav nadšroubovicovitého vinutí má také vliv na transkripci závislou na alternativních faktorech sigma (Manuskript VII).

Shrnuto, tato práce přináší nové poznatky do problematiky zaměřené na fungování RNAP a celkově fungování transkripčního cyklu.