

**Univerzita Karlova**  
**Prírodovedecká fakulta**

Študijný program:

Genetika, molekulárna biológia a virológia

Študijný obor:

Molekulárna biológia a genetika prokaryotických a eukaryotických mikroorganizmov



**Anna Mária Paliesková**

Expresia, lokalizácia a interaktom proteínu RefZ v priebehu sporulácie u *Bacillus subtilis*.

Expression, localisation, and interactome of the RefZ protein during sporulation in *Bacillus subtilis*.

Diplomová práca

Školiteľ:

doc. Mgr. Libor Krásný, PhD.

Praha, 2023

**Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 24.4.2023

Bc. Anna Mária Paliesková

## **Pod'akovanie**

Moje pod'akovanie patrí Doc. Mgr. Liborovi Krásnému, PhD. a Mgr. Jířimu Pospíšilovi, PhD. za odborné rady, konzultácie, trpezlivosť a ochotu kedykoľvek pomôcť v priebehu vypracovania diplomovej práce. Moje pod'akovanie patrí aj celému tímu Laboratória mikrobiálnej genetiky a génovej expresie za ochotnú pomoc. V neposlednom rade ďakujem rodine a najbližším za podporu počas celého štúdia.

Práca bola financovaná z Projektu Národního institutu virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	RNA polymeráza.....	2
2.1	Podjednotky RNAP.....	2
3	Promótor.....	3
4	Faktory $\sigma$ .....	4
4.1	Sigma H ( $\sigma^H$ ).....	5
4.2	Sigma F ( $\sigma^F$ ).....	5
4.3	Sigma G ( $\sigma^G$ ).....	6
5	Transkripcia.....	7
5.1	Iniciácia.....	8
5.2	Elongácia.....	8
5.3	Terminácia.....	8
6	<i>Bacillus subtilis</i> .....	8
6.1	Sporulácia.....	9
6.1.1	Iniciácia sporulácie.....	10
6.1.2	Transkripčný faktor Spo0A.....	11
6.2	Určenie pozície asymetrického septa.....	11
6.3	Proteín RefZ.....	14
6.3.1	Funkcia RefZ.....	14
7	Ciele práce.....	19
8	Materiály a metódy.....	20
8.1	Zoznam prístrojov.....	20
8.1.1	Centrifúgy.....	20
8.1.2	Trepačky a termostaty.....	20
8.1.3	Elektroforézy.....	21
8.1.4	Zdroje napätia.....	21
8.1.5	Ďalšie prístroje.....	21
8.2	Zoznam použitých chemikálii.....	22
8.3	Vektory.....	26
8.4	Bakteriálne kmene.....	29
8.5	Kultivácia baktérii.....	30
8.6	Meranie optickej denzity.....	31
8.7	Tvorba glycerolovej konzervy.....	31
8.8	Izolácia chromozomálnej DNA.....	31
8.9	Izolácia plazmidovej DNA - Midiprep.....	32
8.10	Izolácia plazmidovej DNA-Midiprep a fenol-chloroformová extrakcia.....	33
8.11	Izolácia plazmidovej DNA-Mini prep.....	34

8.12	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	35
8.13	Klonovanie pomocou PCR	36
8.14	Horizontálna agarózová elektroforéza	37
8.15	Izolácia z gélu	38
8.16	Štiepenie DNA	39
8.17	Defosforylácia plazmidu	39
8.18	Ligácia	40
8.19	Transformácia <i>E. coli</i>	41
8.20	Príprava kompetentných buniek <i>B. subtilis</i>	41
8.21	Transformácia <i>B. subtilis</i>	42
8.22	AmyE test	42
8.23	Práca s proteínmi	43
8.23.1	Indukcia expresie proteínu	43
8.23.2	Izolácia proteínu metódou afinitnej chromatografie	44
8.23.3	SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)	44
8.23.4	Farbenie pomocou SimplyBlue™ SafeStain	46
8.23.5	Dialýza	46
8.23.6	Meranie koncentrácie proteínu	47
8.24	Imunoprecipitácia	48
8.25	Transkripcia <i>in vitro</i>	50
8.25.1	Vertikálna PAA elektroforéza	52
8.26	Štruktúrovaná iluminačná mikroskopia (SIM)	52
8.26.1	Príprava mikroskopického preparátu	52
8.27	TECAN	53
9	Výsledky	55
9.1	Promótorova aktivita <i>in vitro</i>	56
9.1.1	Príprava templátu pre transkripcie <i>in vitro</i>	56
9.1.2	Klonovanie a purifikácia faktoru Spo0A	57
9.1.3	Purifikácia proteínov ( $\sigma^H$ , $\sigma^F$ , $\sigma^G$ , RNAP) využívaných v transkripciách <i>in vitro</i>	60
9.2	Overenie promótorovej aktivity <i>refZ</i> transkripčnými experimentami <i>in vitro</i>	61
9.2.1	Titrácia faktoru $\sigma^F$ a $\sigma^G$	63
9.2.2	Transkripcia <i>in vitro</i> s faktorom Spo0A	63
9.3	Lokalizácia expresie RefZ <i>in vivo</i>	66
9.3.1	Klonovanie kmeňov s GFP značeným génom <i>refZ</i>	66
9.4	Meranie promótorovej aktivity <i>in vivo</i>	67
9.5	Lokalizácia RefZ v bunke - Mikroskopia SIM	68
9.6	Identifikácia interakčných partnerov RefZ	72

10	Diskusia.....	75
10.1	Promótorová aktivita úseku predchádzajúceho gén <i>refZ in vitro</i> .....	75
10.2	Promótorová aktivita génu <i>refZ in vivo</i> .....	76
10.2.1	Lokalizácia RefZ v sporulácii .....	78
10.3	Interaktom proteínu RefZ .....	79
11	Záver.....	83
12	Použitá literatúra.....	84
13	Prílohy .....	91

## Abstrakt

*Bacillus subtilis* je gram-pozitívna sporulujúca baktéria. Pri nepriaznivých životných podmienkach zahajuje sporulačný proces, ktorého výsledkom je rezistentná spóra. Hlavným regulátorom iniciácie sporulácie je transkripčný faktor Spo0A. Charakteristickým znakom sporulácie je tvorba asymetrického septa na póle bunky, ktorým je bunka rozdelená na väčšiu materskú bunku a menšiu prespóru. Asymetrické septum je umiestnené v 1/6 od najbližšieho pólu bunky, a proces lokalizácie je komplexný. Jedným z aktérov podieľajúcich sa na tejto lokalizácii je proteín RefZ, označovaný ako regulátor proteínu FtsZ, ktorý vytvára Z-kruh. Z-kruh je dôležitý pre formovanie vegetatívneho (v strede bunky) aj asymetrického septa. RefZ konkrétne napomáha relokizácii Z-kruhu z mediálnej časti bunky ku pólom v rannej fáze sporulácie. Okrem toho je RefZ DNA väzbový proteín, ktorý sa viaže na väzbové motívy RefZ (*RefZ binding motifs* [RBMs]) v blízkosti počiatkov replikácie (*ori*) chromozómov, čím podporuje presné umiestnenie ramien chromozómov počas sporulácie.

Celý proces sporulácie je regulovaný kaskádou priestorovo špecifických sporulačných faktorov  $\sigma$ , ktoré rozpoznávajú špecifické konzervované (konsenzus) sekvencie v promótorových oblastiach génov, čím umožňujú RNA polymeráze interagovať s promótorom konkrétneho génu a iniciovať jeho transkripciu. Takto faktory  $\sigma$  zabezpečujú priestorovo a časovo kontrolovanú expresiu génov v bunke. Aj keď je tento proces intenzívne študovaný, mnoho aspektov sporulácie je stále enigmatických.

Cieľom tejto práce bolo prispieť k hlbšiemu pochopeniu vybraných aspektov sporulácie. Prvým hlavným cieľom tejto práce bolo charakterizovať expresiu a lokalizáciu proteínu RefZ v modelovom organizme *Bacillus subtilis*. Pre identifikáciu potenciálnych promótorov génu *refZ* bola zvolená bioinformatická analýza, ktorá identifikovala dva promótory – jeden závislý na  $\sigma^H$  a druhý závislý na  $\sigma^{F/G}$  a ďalej väzbové miesta pre transkripčný faktor Spo0A. Aktivita nájdených promótorov a ich závislosť na Spo0A bola určená metódou transkripcie *in vitro*. Ďalej bola pomocou mikroskopie SIM charakterizovaná expresia a lokalizácia proteínu RefZ (RefZ-GFP) *in vivo* v troch sporulačných vývojových štádiách u kmeňov s génom *refZ-gfp* v ektopickom lokuse a s génom pre *refZ-gfp* v natívnom lokuse. V druhej časti diplomovej práce boli identifikovaní interakční partneri (interaktom) proteínu RefZ počas sporulácie. Zhrnuté, tieto výsledky prispeli ku vytvoreniu priestorovo-časového obrazu expresie, lokalizácie a interakciám RefZ v priebehu sporulácie.

**Kľúčové slová:** transkripcia, promótor, sporulačné faktory sigma, sporulácia, SpoA0, RefZ.

## Abstrakt

*Bacillus subtilis* je gram-pozitivní sporulující bakterie. Za nepříznivých životních podmínek zahajuje sporulační proces, jehož výsledkem jsou rezistentní spory. Hlavním regulátorem iniciace sporulace je transkripční faktor Spo0A. Charakteristickým znakem sporulace je tvorba asymetrického septa na buněčném pólu, které rozděljuje buňku na větší mateřskou buňku a menší prespóru. Asymetrické septum je umístěno v 1/6 od nejbližšího pólu buňky, a proces lokalizace je komplexní. Jedním z aktérů podílejících se na této lokalizaci je protein RefZ, který reguluje protein FtsZ, tvořící Z-kruh. Z-kruh je důležitý pro formování vegetativního (uprostřed buňky) i asymetrického septa. RefZ konkrétně napomáhá relokizaci Z-kruhu ze středu buňky k pólům v rané fázi sporulace. Kromě toho je RefZ protein vázající se na DNA, který se váže na vazebné motivy RefZ (*RefZ binding motives* [RBMs]) v blízkosti počátků replikace (*ori*) chromozomů, čímž podporuje přesné umístění ramen chromozomů během sporulace.

Celý proces sporulace je regulován kaskádou prostorově specifických sporulačních faktorů  $\sigma$ , které rozpoznávají specifické konzervované (konsenzus) sekvence v promotorových oblastech genů, čímž umožňují RNA polymeráze interagovat s promotorem konkrétního genu a zahájit jeho transkripci. Takto faktory  $\sigma$  zajišťují prostorově a časově řízenou expresi genů v buňce. Přestože je tento proces intenzivně studován, řada aspektů sporulace je stále enigmatická.

Cílem této práce bylo přispět k hlubšímu pochopení vybraných aspektů sporulace. Prvním hlavním cílem této práce pak bylo charakterizovat expresi a lokalizaci proteinu RefZ v modelovém organismu *Bacillus subtilis*. Pro identifikaci potenciálních promotorů genu *refZ* byla zvolena bioinformatická analýza, která identifikovala dva promotory – jeden závislý na  $\sigma^H$ , a druhý závislý na  $\sigma^{F/G}$  a dále vazebná místa pro transkripční faktor Spo0A. Aktivita nalezených promotorů a jejich závislost na Spo0A byla určena metodou transkripce *in vitro*. Dále byla pomocí mikroskopie SIM charakterizována exprese a lokalizaci proteinu RefZ (RefZ-GFP) *in vivo* ve třech sporulujících vývojových stádiích u kmenů s genem pro *refZ-gfp* v ektopickém lokusu a s genem pro *refZ-gfp* v nativním lokusu. Ve druhé části práce byli identifikováni interakční partneři (interaktom) proteinu RefZ během sporulace. Shrnuto, tyto výsledky přispěly k časoprostorovému obrazu exprese, lokalizace a interakcím proteinu RefZ během sporulace.

**Klíčová slova:** transkripce, promotor, sporulační faktory sigma, sporulace, Spo0A, RefZ.



## Abstract

*Bacillus subtilis* is a gram-positive sporulating bacterium. Under unfavorable conditions, it initiates the sporulation process that results in a resistant spore. The transcription factor Spo0A is a master regulator of sporulation initiation. The hallmark of sporulation is the formation of an asymmetric septum near a cell pole, which divides the cell into the larger mother cell and smaller prespore. The asymmetric septum is localized at 1/6 of the cell length relative to the nearer pole. One of the players involved in this localization is the RefZ protein, referred to as the FtsZ regulatory protein, which forms the Z-ring. The Z-ring is important for the formation of both the vegetative (mid-cell) and asymmetric septa. RefZ facilitates the relocalization of the Z-ring from midcell to the poles at an early stage of sporulation. RefZ also binds DNA (RefZ binding motifs [RBMs]) near the ori site of the chromosome, thereby promoting precise positioning of the chromosome arms during sporulation.

The entire sporulation process is controlled by a cascade of compartment-specific sporulation  $\sigma$  factors that recognize specific consensus sequences in the promoter regions of genes, thereby allowing RNA polymerase to initiate transcription of sporulation-specific genes. These  $\sigma$  factors ensure spatially and temporally controlled expression of genes in the cell. Although this process has been intensively studied, many aspects of sporulation are still enigmatic.

The overall aim of this Thesis was to provide detailed insights into selected aspects of sporulation. The first main aim of this Thesis was to characterize expression and localization of RefZ in the model organism *Bacillus subtilis*. Bioinformatic analysis was used to identify potential promoters of the *refZ* gene. This analysis identified  $\sigma^H$ ,  $\sigma^{F/G}$  dependent promoters and binding sites for the transcription factor Spo0A. *In vitro* transcriptional experiments were then used to test the activity of the predicted promoters and their dependence on Spo0A. By SIM microscopy, *in vivo* expression and localization of RefZ (RefZ-GFP) was characterized in three developmental stages of sporulation in strains with *refZ-gfp* at the ectopic locus and with *refZ-gfp* at the native locus. In the second part of the Thesis, the interaction partners (interactome) of the RefZ protein during sporulation were identified. Taken together, these results contributed to the spatio-temporal picture of RefZ expression, localization, and interactions during sporulation.

**Keywords:** transkription, promoter, sporulation sigma factors, sporulation, Spo0A, RefZ.

## Zoznam skratiek

$\Delta minCD$  – deletovaný gén *minCD*

$\Delta refZ$  – deletovaný gén *refZ*

$\Delta spoIIE$  – deletovaný gén *spoIIE*

Å – Angström

*B. subtilis* – *Bacillus subtilis*

Bp – báзовý pár

BSA – hovädzi sérový albumín

dH<sub>2</sub>O – destilovaná voda

E – jadro RNA polymerázy

*E. coli* – *Escherichia coli*

E $\sigma$  – holoenzým RNA polymerázy

G<sup>-</sup> – gramnegatívna baktéria

G<sup>+</sup> – grampozitívna baktéria

GFP – zelený fluorescenčný proteín

His-tag – histidínová kotva

HTH – helix-turn-helix

iH<sub>2</sub>O – injekčná voda

iNTP – iniciačný nukleozidtrifosfát

IPTG - Izopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktózid

kDa – kilodalton

ME -  $\beta$ -merkaptoetanol

Mg<sup>2+</sup> - kation horčíka

NTP – nukleozidtrifosfát

OD – optická denzita

*Ori* – počiatok replikácie chromozómu

PAA – polyakrylamid

PAGE – polyakrylamidová elektroforéza

RBM<sub>s</sub> – RefZ väzbové motívy

RE – restričná endonukleáza

RNAP – RNA polymeráza

RP<sub>c</sub> – uzatvorený komplex promótoru a RNAP

RP<sub>int</sub> – iniciačný komplex promótoru a RNAP

RP<sub>o</sub> – otvorený komplex promótoru a RNAP

SDS – dodecylsírany sodný

ssDNA – jednovláknová DNA

tzv. – takzvaný

UP element – *upstream* element, oblasť v proti smere transkripcie

WT – divoký typ

# 1 Úvod

Gram-pozitívna pôdna baktéria *Bacillus subtilis* využíva sporulačný cyklus ako jednu zo stratégií prežitia počas nepriaznivých životných podmienok, ak vegetatívny rast bunky už ďalej nie je možný. Počas sporulácie dochádza ku diferenciácii buniek, v rámci ktorej sa pôvodná bunka rozdelí asymetrickým septom na dva kompartmenty - väčšiu materskú bunku a menšiu prespóru. Konečným výsledkom je vysoko rezistentná spóra. Hlavným regulátorom iniciácie sporulácie je transkripčný faktor Spo0A (aktivátor /repressor) (Molle et al. 2003). Celý proces sporulácie je ďalej závislý na kaskáde sporulačných faktorov  $\sigma$ , ktorých aktivita je viazaná na určité sporulačné štádium (Fujita a Losick 2003; Losick a Stragier 1992). Faktory  $\sigma$  rozpoznávajú špecifické konsenzus sekvencie v promótorových oblastiach génov, čím umožňujú RNA polymeráze nasadnúť na konkrétny promótor génu a iniciovať jeho transkripciu. Prostredníctvom sporulačných faktorov  $\sigma$  je v rámci bunkových kompartmentov zabezpečená priestorovo a časovo kontrolovaná expresia génov.

Umiestnenie a lokalizácia asymetrického septa počas sporulačného štádia je komplexný proces. Jedným z hráčov podieľajúcich sa na umiestnení asymetrického septa v 1/6 od bližšieho póla bunky je RefZ (Barák a Muchová 2018). RefZ je označovaný ako kľúčový regulátor proteínu FtsZ, ktorý vytvára Z-kruh. Tento Z-kruh je esenciálny pre tvorbu vegetatívneho (v strede bunky) aj asymetrického septa. Tento Z-kruh je esenciálny pre tvorbu vegetatívneho (v strede bunky) aj asymetrického septa. V rannom štádiu sporulácie práve proteín RefZ napomáha relokizácii Z-kruhu z mediálnej časti bunky na pól, čo vedie k vytvoreniu asymetrického septa (Wagner-Herman *et al.* 2012). Okrem toho je RefZ DNA väzbový proteín, ktorý sa viaže na RefZ väzbové motívy (RBMs) v blízkosti *ori* chromozómov, čím podporuje presné umiestnenie ramien chromozómov počas sporulácie (Miller *et al.* 2016).

V súčasnosti chýbajú detailné informácie o expresii génu *refZ* a lokalizácii proteínu RefZ v rôznych fázach sporulácie. Rovnako nie je úplne definované s akými proteínmi interaguje. Táto diplomová práca je v prvej a hlavnej časti zameraná na štúdium expresie *refZ* pomocou transkripčných *in vitro* a mikroskopických *in vivo* prístupov. Transkripčnými experimentami *in vitro* sme charakterizovali transkripčnú aktivitu z promótorov génu *refZ* pod vplyvom zvyšujúcej sa koncentrácie špecifických faktorov  $\sigma$  a transkripčného regulátora Spo0A. Mikroskopicky bola overená expresia proteínu RefZ *in vivo* na základe detekcie fluorescenčného GFP signálu počas konkrétnych vývojových sporulačných štádií. V druhej časti diplomovej práce sme pomocou imunoprecipitačnej metódy identifikovali interakčných partnerov proteínu RefZ. Získané informácie umožnili vytvoriť časovo-priestorový obraz expresie, lokalizácie a interakcii RefZ v priebehu sporulácie.



Podjednotku  $\beta$  kóduje gén *rpoB*, jej proteínová veľkosť je približne 133 kDa (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/v4/gene?id=EC32328548BFB59D9026ACE351C946DBBC0932BC>).

Podjednotku  $\beta'$  kóduje gén *rpoC* o veľkosti približne 134 kDa (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/v4/gene?id=BC8B37355E6FADBA5F4636C3879E99003B0F3E84>). Tieto informácie sa vzťahovali na *B. subtilis*. Podjednotky  $\beta$  a  $\beta'$  svojím tvarom a usporiadaním udávajú jadru RNAP charakteristický tvar pripomínajúci krabie klepeto (**Obr. 1**). Vďaka takémuto usporiadaniu je medzi podjednotkami  $\beta$  a  $\beta'$  vytvorený kanál o veľkosti 27 Å (2,7 nm) (Murakami a Darst 2003). Vo vnútri kanálu je lokalizované katalytické jadro RNAP s naviazaným  $Mg^{2+}$  na záporne nabitú aspartát (Sosunov 2005).

Podjednotka  $\omega$  je u *B. subtilis* kódovaná génom *rpoZ* s proteínovou veľkosťou okolo 7,6 kDa (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/v4/gene?id=921933B6B893083F151AABDEDCBC65F2E55677BE>). Je najmenšou podjednotkou jadra RNAP a nemá esenciálnu funkciu.

Jadro RNAP (E) je konzervované naprieč baktériami, avšak u niektorých grampozitívnych baktérii zo skupiny *Firmicutes*, kam patrí napríklad *Bacillus subtilis*, boli popísané ešte dve podjednotky a to delta ( $\delta$ ) a epsilon ( $\epsilon$ ).

Podjednotka  $\delta$  je kódovaná génom *rpoE*, ktorého expresia je najvyššia počas prechodu medzi exponenciálnou a stacionárnou fázou rastu bunky (López de Saro et al. 1999). U *B. subtilis* je podjednotka  $\delta$  viazaná na podjednotku  $\beta'$  RNAP (Pei et al. 2020).

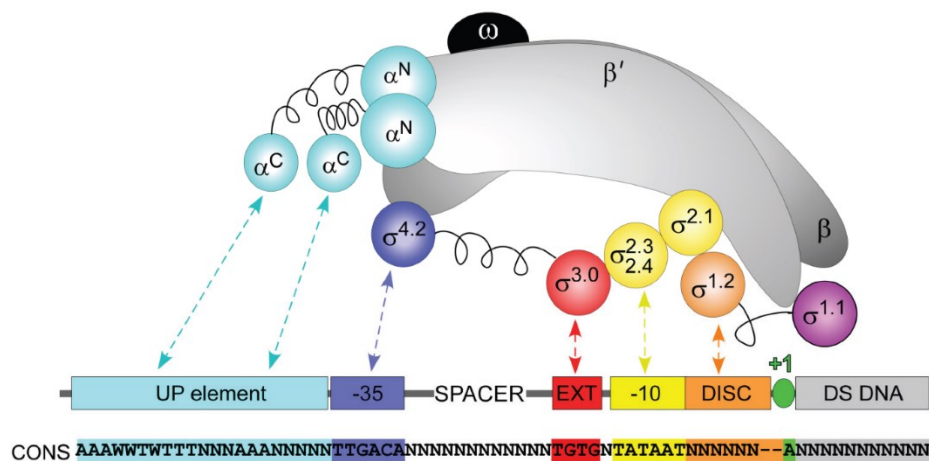
Podjednotka  $\epsilon$  je malá pomocná podjednotka RNAP kódovaná génom *rpoY*, ktorá bola pôvodne pomenovaná ako  $\omega_1$  (Keller et al. 2014). Táto podjednotka je umiestená v dutine RNAP, vytvorenej N-terminálnymi doménami podjednotiek  $\alpha/2$  a časťami podjednotiek  $\beta$  a  $\beta'$  (Newing et al. 2020).

Doteraz popisované podjednotky tvoria už spomínané jadro RNAP, ktoré je schopné elongácie v rámci transkripcie, avšak neumožňuje jej iniciáciu. Aby bolo možné iniciovať transkripciu, je nevyhnutná väzba faktoru  $\sigma$  ( $\sigma$ ) na RNAP ( $E\sigma$ , holoenzým RNAP). U *B. subtilis* primárnym a zároveň esenciálnym faktorom  $\sigma$  je faktor  $\sigma^A$ , zabezpečujúci expresiu väčšiny génov počas vegetatívneho rastu. V odpovedi na stres a pri zmene podmienok sú u *B. subtilis* využívané alternatívne faktory  $\sigma$ . Faktory  $\sigma$  špecifické v sporulačnom vývojovom štádiu *B. subtilis* popisujem v kapitole 4 Faktory  $\sigma$ .

### 3 Promótor

Promótorová oblasť DNA sa nachádza pred génom, v proti smere jeho transkripcie a je pre proces transkripcie esenciálna. Táto oblasť je rozdelená na -10 a -35 konsenzus sekvencie, medzi ktorými sa nachádza medzerník, tzv. *spacer*. Označenie -10 a -35 určuje vzdialenosť od +1 nukleotidu, z ktorého je iniciovaná transkripcia. Konsenzus sekvencie sú obvykle hexaméry DNA a sú rozpoznávané konkrétnymi doménami faktoru  $\sigma$ . Hlavný faktor  $\sigma$  u *B. subtilis*,  $\sigma^A$ , rozpoznáva nasledujúcu konsenzus

sekvenciu: -10 (5'-TATAAT-3') sa nachádza v pozícii -7 až -12 od +1 nukleotidu (Helmann 1995). Za ňou nasleduje medzerník o dĺžke 16-19 nukleotidov. Sekvencia -35 (5'-TTGACA-3') sa nachádza v pozícii -30 až -35 proti smeru transkripcie (zhrnuté v Haugen et al. 2008; Ruff et al. 2015). Oproti hlavnému faktoru  $\sigma$ , konsenzus sekvencie rozpoznávané alternatívnymi faktormi  $\sigma$  sa vyznačujú väčšou variabilitou a nie všetky sú identifikované. Sila expresie z daného promótoru môže byť tiež ovplyvnená transkripčnými faktormi. Tieto transkripčné faktory po naviazaní na DNA/RNAP môžu viesť ku aktivácii iniciácie transkripcie alebo naopak, k jej potlačeniu. Niektoré transkripčné faktory dokonca môžu mať dvojitý charakter. V takom prípade fungujú buď ako aktivátory alebo ako represory, podľa cieľového promótoru (Pérez-Rueda a Collado-Vides 2000).



**Obrázok 2:** Schematické znázornenie interakcie  $E\sigma$  s promótorovou sekvenciou u *E. coli*

Jednotlivé interakcie  $E\sigma$  s promótorovou oblasťou génu sú znázornené farebne. Modrou farbou je znázornená interakcia  $\alpha$  podjednotky s UP elementom, tmavo modrou interakcia  $\sigma^{4.2}$  s -35 hexamérnou sekvenciou, červenou farbou interakcia  $\sigma^3$  s rozšírenou promótorovou oblasťou (EXIT), žltou interakcia  $\sigma^{2.3}$  a  $\sigma^{2.1}$  domén faktorov  $\sigma$  s -10 hexamérnou sekvenciou, oranžovou interakcia  $\sigma^{1.2}$  s diskriminátorom (DISC). Zelenou farbou je znázornený +1 nukleotid, za ktorým je šedou znázornená DNA sekvencia. Medzi -35 a rozšírenou promótorovou oblasťou -10 je znázornený medzerník (SPACER). CONS sekvencia predstavuje všeobecný konsenzus sekvencie. Prevzaté a upravené podľa Ruff *et al.* (2015).

## 4 Faktory $\sigma$

Bakteriálne faktory  $\sigma$  interagujú s jadrom RNA polymerázy, čím vytvárajú holoenzým RNAP ( $E\sigma$ ). Vďaka tomu je RNAP schopná rozpoznať definovanú promótorovú oblasť a iniciovať transkripciu (Haldenwang 1995). *B. subtilis* má 19 známych faktorov  $\sigma$  (Rodriguez Ayala et al. 2020). Sporulačný proces je pod kontrolou piatich alternatívnych faktorov  $\sigma$ , ktorých aktivita je priestorovo a časovo riadená. Medzi alternatívne sporulačné faktory  $\sigma$  patria: H, E, F, G, K (Stragier a Losick 1996). Väčšina faktorov  $\sigma$  je po syntéze v neaktívnom stave, pokiaľ nenastanú morfológické podmienky vyžadované pre ich aktiváciu. V neaktívnom stave môžu byť udržiavané faktormi anti- $\sigma$ . Aktivácia faktorov  $\sigma$  je sprostredkovaná faktormi anti-anti  $\sigma$ , ktoré naopak fungujú proti inhibičnej aktivite anti- $\sigma$ . V nasledujúcich kapitolách sa zameriam na sporulačné faktory  $\sigma$  H, F a G, keďže sú pre túto diplomovú

prácu najdôležitejšie. V ďalších podkapitolách sú popísané faktory  $\sigma$ , ktorých aktivita bola študovaná v tejto práci alebo sú relevantné pre túto prácu.

#### 4.1 Sigma H ( $\sigma^H$ )

Faktor  $\sigma^H$  kódovaný génom *sigH* (starší názov *Spo0H*) je alternatívny faktor  $\sigma$  (Dubnau et al. 1988), prepisovaný zo  $\sigma^A$  závislého promótoru (Weir et al. 1991). Transkripcia *sigH* je priamo inhibovaná väzbou transkripčného represora AbrB (Strauch 1995). Transkripcia represora AbrB je inhibovaná zvyšujúcou sa hladinou hlavného regulátora iniciácie sporulácie, faktora Spo0A, konkrétne jeho fosforylovanou formou (Spo0A~P). Výsledkom takejto regulácie je zvýšenie expresie *sigH* a celkovej hladiny tohto faktoru  $\sigma$  (Perego et al. 1988; Britton et al. 2002).

Konsenzus sekvencie promótorov, ktoré sú rozpoznávané faktorom  $\sigma^H$ , majú vyššiu toleranciu odchýlok v rámci sekvencie oproti hlavnému faktoru  $\sigma^A$ . V pozícii -10 sa jedná o sekvenciu R--GAATww, v pozícii -35 sa jedná o sekvenciu R-AGGAWWW. Medzi nimi sa nachádza medzerník o dĺžke 11-12 nukleotidov. Ku písmenu R prislúcha A alebo G, ku W prislúcha A alebo T (Britton et al. 2002).

Faktor  $\sigma^H$  riadi expresiu génov, ktoré zabezpečujú prechod z exponenciálnej do stacionárnej fázy rastu, vrátane génov riadiacich prechod do sporulačného štádia až konečnému formovaniu spóry (Grossman 1995). Pod priamou kontrolou  $\sigma^H$  je 87 génov a u mnohých iných je ním ovplyvňovaná transkripcia. Zároveň niektoré gény s promótorom závislým na  $\sigma^H$  majú ďalšie promótory rozpoznávané inými faktormi  $\sigma$ . Patrí sem napr. gén kódujúci Spo0A, ktorého expresia je kontrolovaná aj z promótoru závislého na  $\sigma^A$  (Britton et al. 2002).  $\sigma^H$  zároveň riadi expresiu operónu *spoIIAA-spoIIAB-spoIIAC/sigF*. Z tohto operónu je riadená expresia anti-anti  $\sigma$  faktoru SpoIIAA, anti- $\sigma$  faktoru SpoIIAB a faktoru  $\sigma^F$ , čo je prvý faktor  $\sigma$  vznikajúcej spóry (De Hoon et al. 2010).

#### 4.2 Sigma F ( $\sigma^F$ )

Faktor  $\sigma^F$  je kódovaný génom *sigF* (starší názov *spoIIAC*), ktorý je súčasťou trojcistronného operónu *spoIIAA-spoIIAB-sigF* (Schmidt et al. 1990). Zostávajúce gény operónu kódujú regulačné proteíny anti- $\sigma$ , respektíve anti-anti  $\sigma$  faktory.

Proteíny SpoIIAA, SpoIIAB a  $\sigma^F$  sú syntetizované v bunke pred jej rozdelením asymetrickým septom v tzv. *predivisional cell*. V takejto bunke je SpoIIAB (anti- $\sigma$  faktor) viazaný na faktor  $\sigma^F$  a tým zabraňuje expresii génov budúcej prespóry z promótorov závislých na  $\sigma^F$  (Duncan a Losick 1993). V prespóre nastupuje SpoIIAA (anti-anti  $\sigma$  faktor), ktorý sa viaže na  $\sigma^F$ -SpoIIAB komplex a vyvážuje SpoIIAB zo  $\sigma^F$ , čím sa  $\sigma^F$  stáva aktívnym. Vnútrobnková koncentrácia ATP stimuluje tvorbu  $\sigma^F$ -SpoIIAB komplexu, naopak ADP vedie k vytvoreniu komplexu medzi SpoIIAA-SpoIIAB (Alper et al. 1994). Ústredným prvkom aktivácie  $\sigma^F$  je membránovo viazaná špecifická fosfatáza SpoIIE, ktorá



defosforyluje SpoIIAA~P, tým ju aj aktivuje a vzniká SpoIIAA, ktoré inhibuje SpoIIAB (Duncan et al. 1995).

Faktor  $\sigma^F$  rozpoznáva konsenzus sekvencie s vyššou variabilitou oproti  $\sigma^A$ . V literatúre sa uvádza predpokladaný konsenzus sekvencie v pozícii -35 GYATA, v pozícii -10 GG- - A - AHTR. Písmenu H prislúcha A/C/T, k písmenu Y prislúcha C/T, písmenu R prislúcha A/G. Tieto sekvencie sú oddelené medzerníkom o dĺžke 14 nukleotidov (Wang et al. 2006).

Podľa Wang *et al.* (2006)  $\sigma^F$  reguluje expresiu 48 génov budúcej spóry (prespóry), ktoré sú usporiadané do 36 transkripčných jednotiek. Gény patriace do  $\sigma^F$  regulónu možno rozdeliť na gény, ktoré kódujú regulačné proteíny a gény kódujúce štruktúrne proteíny a enzýmy, ktoré priamo ovplyvňujú odolnosť a morfogénu budúcej spóry (Wang et al. 2006). Medzi regulačné gény patrí napr. *sigG* (starší názov *spoIIIIG*), kódujúci faktor  $\sigma^G$ , čo je druhý sporulačný faktor  $\sigma$  prespóry (Sun et al. 1991), ďalej *spoIIR*, ktorého proteínový produkt SpoIIR vedie ku aktivácii faktoru  $\sigma^E$  (Karow et al. 1995).

### 4.3 Sigma G ( $\sigma^G$ )

Druhým alternatívnym sporulačným faktorom  $\sigma$  prespóry je faktor  $\sigma^G$ , ktorý je kódovaný génom *spoIIIIG* (Sun et al. 1989). V počiatočnom štádiu sporulácie je jeho expresia riadená faktorom  $\sigma^F$  (Sun et al. 1991; Partridge et al. 1991). Sporulačný faktor  $\sigma^G$  zostáva po syntéze v neaktívnom stave, pokiaľ nie je dokončený *engulfment* (pohltenie prespóry materskou bunkou) (Doan et al. 2009). Po dokončení *engulfment*-u je medzi materskou bunkou a prespórou vytvorený vnútrobunkový kanál, tzv. *feeding tube*. Tento kanál je tvorený proteínmi materskej bunky SpoIIIAA až SpoIIIAH a proteínom prespóry SpoIIQ. Predpokladá sa, že aktivita faktoru  $\sigma^G$  je závislá na vytvorení tohto kanála (Camp a Losick 2009).

Proteín, ktorý udržiava faktor  $\sigma^G$  v neaktívnom stave pokiaľ nie je dosiahnuté požadované sporulačné vývojové štádium (dokončený *engulfment*), je faktor anti- $\sigma$  CsfB (iný uvádzaný názov Gin). Transkripcia génu *csfB* je pod kontrolou faktoru  $\sigma^F$ . CsfB zároveň zabraňuje aktivácii faktoru  $\sigma^G$  v materskej bunke. Faktor anti- $\sigma$  CsfB v neskorom sporulačnom štádiu blokuje v materskej bunke aktivitu faktoru  $\sigma^E$  (Decatur a Losick 1996; Karmazyn-Campelli et al. 2008; Serrano et al. 2015). Aktiváciou faktoru  $\sigma^G$  sa stáva faktor  $\sigma^F$  neaktívnym. Na prepnutie  $\sigma^F$  závislej transkripcie génov na  $\sigma^G$  závislú transkripciu sa podieľa malý proteín Fin (starší názov YabK) (Camp et al. 2011).

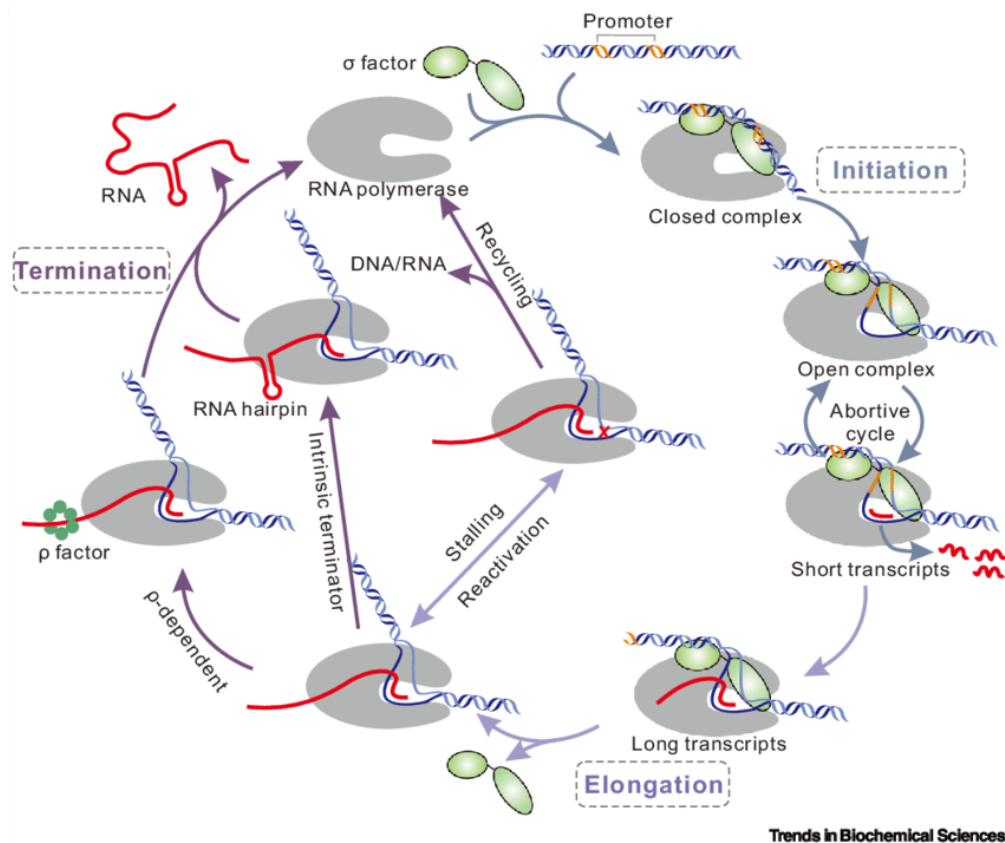
Plne funkčný faktor  $\sigma^G$  umožňuje aktiváciu auto-regulačných slučiek, ktoré zvyšujú vnútrobunkovú hladinu tohto faktoru  $\sigma$  vďaka efektívnemu rozpoznávaniu vlastného promótoru (Sun et al. 1991; Serrano et al. 2004).

Tak ako u predchádzajúcich spomínaných faktoroch  $\sigma$  ( $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ), aj faktor  $\sigma^G$  je schopný rozpoznávať vyššie portfólio -10 a -35 sekvencií. Dokonca konsenzus sekvencie promótorov, ktoré sú riadené faktormi  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  sú si vzájomne vysoko podobné. Rozdielnosť je v -10 sekvencii vo vysoko

konzervovanom G nukleotide, ktorý sa nachádza *upstream* na poslednom mieste tejto sekvencie (Wang et al. 2006). Predpokladaný konsenzus sekvencie pre faktor  $\sigma^G$  je nasledovný. V pozícii  $-35$  sa jedná o sekvenciu GHATA, v pozícii  $-10$  sa jedná o sekvenciu MAWAMTA. Písmenu H prislúcha A/C/T, ku M prislúcha A/C, ku W prislúcha A/T (Wang et al. 2006). Podľa Haldenwang (1995) je medzerník medzi týmito sekvenciami dlhý 18 nukleotidov. Podľa Wang *et al.* (2006) bolo v regulóne  $\sigma^G$  identifikovaných 95 génov. Rovnako ako u  $\sigma^F$ , aj regulón  $\sigma^G$  možno rozdeliť na gény kódujúce regulačné proteíny a gény, ktoré priamo ovplyvňujú morfogénu (Wang et al. 2006). Jedným z regulačných génov je práve *spoVT*, kódujúci DNA väzbový proteín SpoVT, ktorý v bunke ovplyvňuje prepisovanie ďalších génov s promótorom závislým na  $\sigma^G$  (Bagyan et al. 1996).

## 5 Transkripcia

V procese nazývanom transkripcia je DNA na základe komplementarity prepisovaná do RNA prostredníctvom DNA závislej RNA polymerázy (RNAP). Tento proces je súčasťou centrálnej dogmy a je prvotným krokom génovej expície. Transkripcia je rozdelená na tri fázy, ktorými sú iniciácia, elongácia a terminácia. Proces transkripcie je znázornený nižšie (**Obr. 3**).



**Obrázok 3: Schematické znázornenie transkripčného cyklu.**

Schematické znázornenie transkripčného cyklu, ktorý začína vytvorením holoenzýmu RNAP s faktorom  $\sigma$ , rozpoznávaním promótorovej oblasti, ktorá je súčasťou iniciácie, vytvorením uzatvoreného komplexu a následnou abortívnou transkripciou a prechodom do elongačnej fázy. Terminácia transkripcie je znázornená, ako závislá na Rho a nezávislá na Rho faktore. Prevzaté a upravené podľa Hu a Liu (2022).

## 5.1 Iniciácia

U baktérii je prvotnou fázou transkripcie iniciácia, ktorá sa začína rozpoznaním a naviazaním holoenzýmu RNAP ( $E\sigma$ ) na promótorovu sekvenciu DNA. Naviazaním vzniká uzatvorený komplex RNAP-promótorova DNA, označovaný ako R<sub>Pc</sub> (R-RNAP, P-promótor, c-closed). V tomto komplexe je DNA stále dvojláknová. Následne izomeráciou a niekoľkými stupňami medzi stavov dochádza ku rozpleteniu dvojláknovej DNA v oblasti približne 12-13 bázových párov medzi -10 oblasťou až +2 miestom. Vzniká tým otvorený komplex R<sub>Po</sub> (R-RNAP, P-promótor, o-opened) označovaný ako transkripčná bublina (Chen et al. 2010). Následne za prítomnosti NTP je vytvorený iniciačný transkripčný komplex (R-P<sub>int</sub>). Do tohto komplexu je vtiahnutá DNA nachádzajúca sa po smere transkripcie mechanizmom, ktorý sa označuje ako *scrunching*. RNAP sa teda spočiatku nepohybuje, ale vŕahuje do seba DNA (Winkelman et al. 2016). V rámci tohto komplexu môže dochádzať ku syntéze krátkych RNA transkriptov (v závislosti na promótori), k tzv. abortívnej transkripcii, počas ktorej RNAP neopúšťa promótor. Konečným krokom iniciácie transkripcie je uvoľnenie RNAP z promótoru po syntéze RNA transkriptu o kritickej dĺžke 11-15 nukleotidov a vytlačení faktoru  $\sigma$  z RNAP (zhrnuté v Lee a Borukhov 2016).

## 5.2 Elongácia

Po uvoľnení RNAP z promótoru nastáva produktívna fáza transkripcie nazývaná elongácia. Počas elongácie dochádza ku predlžovaniu vlákna RNA podľa DNA, počas ktorého je na 3'OH koniec RNA pripojovaný NTP substrát svojím  $\alpha$ -fosfátom. Pripojenie NTP je sprostredkované nukleofilným útokom vďaka  $Mg^{2+}$  v katalytickom jadre RNAP (Hinton 2016).

## 5.3 Terminácia

Konečným krokom transkripcie je terminácia. Ku termináciám, ktorá je opísaná hlavne u *E. coli*, môže dochádzať 2 základnými spôsobmi. Prvým typom je vnútorná (Rho-nezávislá) terminácia, ktorá je závislá na vytvorení RNA vlásenky (terminálneho segmentu) elongačným komplexom RNAP (Larson et al. 2008). Terminálny komplex je tvorený čisto alebo prevažne uridínovými nukleotidmi. Druhým typom je terminácia závislá na Rho RNA translokáze, ktorej aktivita je závislá na ATP. Rho-translokázou vznikajú štrukturálne zmeny v elongačnom komplexe, ktoré vedú ku uvoľneniu RNA (Molodtsov et al. 2023)

## 6 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* je gram-pozitívna, tyčinkovitá baktéria. Ak v prostredí nastanú stresové podmienky, ako je nedostatok živín, je schopná zmeniť génovú expresiu a prejsť z vegetatívneho rastu do sporulácie, pričom asymetrickým delením vytvorí veľmi odolnú spóru. Samotné vytvorenie spóry baktérii trvá približne 7 hodín pri 37°C (Piggot a Hilbert 2004). Ako náhle spóra zaznamená priaznivé podmienky, je schopná „vyklíčiť“ (germinovať) a môže prejsť do vegetatívneho štádia a bunky sa môžu opäť deliť.

## 6.1 Sporulácia

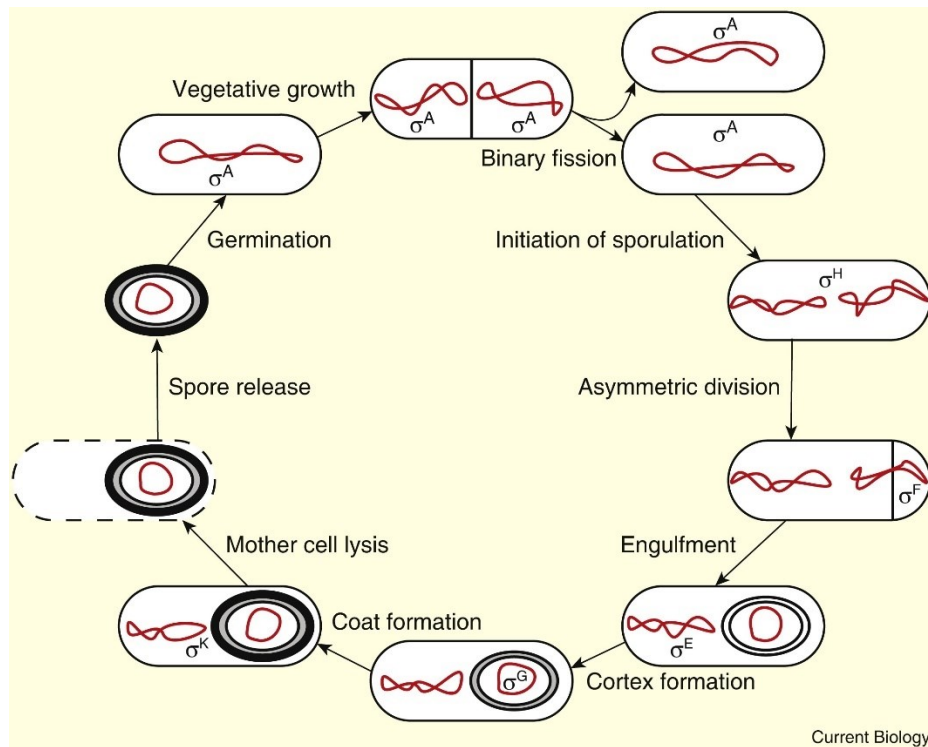
Sporulačný proces u baktérie *B. subtilis* je jednou zo stratégií prežitia, ktoré baktérie využívajú na to, aby prežili environmentálne zmeny a podmienky, ktoré nie sú priaznivé pre bakteriálny rast. Sporulácia je základný príklad diferenciacie bunky v reakcii na stresové podmienky. Cieľom je produkcia spór. Spóry sú veľmi odolné, neaktívne, spiace bunky, ktoré uskladňujú bakteriálny genóm pokiaľ sa nezlepšia podmienky prostredia (McKenney et al. 2013; Paredes-Sabja et al. 2011).

Počas prechodu z vegetatívneho rastu do sporulácie nastáva morfológická zmena chromozómov, kedy sú chromozómy „natiahnuté“ pozdĺž celej dĺžky bunky, čím tvoria takzvaný axiálny filament, zachytené na póloch oblasti počiatku replikácie, *ori* (Bylund et al. 1993). Pri tvorbe axiálneho filamentu sú dôležité proteíny RacA a DivIVA. RacA je proteín podobný kinetochóru, ktorý sa viaže v blízkosti *ori* chromozómov. RacA umožňuje ukotvenie počiatku replikácie chromozómov na póloch bunky prostredníctvom väzby na C-terminálnu doménu DivIVA. DivIVA lokalizuje na póloch bunky (Ben-Yehuda et al. 2003, van Baarle et al. 2013).

Po tom, ako je vytvorený axiálny filament, dochádza ku re-lokalizácii Z-kruhu (Z-ring) z mediálnej časti bunky (kde sa podieľa na vegetatívnom delení; Z-kruh je tvorený proteínom FtsZ - proteín podobný tubulínu) smerom k pólom. Môžu tak vzniknúť dva Z-kruhy, pričom len jeden z nich bude nakoniec vytvárať sporulačné septum. Doposiaľ však nie je známe, čo je rozhodujúcim faktorom o tom, ktorý z nich bude napokon zachovaný. V rámci re-lokalizácie vytvára Z-kruh prechodné vlákna v podobe špirály. Proces re-lokalizácie je závislý na prítomnosti Spo0A~P, zvýšenej hladine proteínu FtsZ a syntéze charakteristického sporulačného proteínu SpoIIE (Ben-Yehuda a Losick 2002; Levin a Losick 1996; Feucht et al. 1996). SpoIIE prostredníctvom FtsZ lokalizuje na mieste budúceho asymetrického septa (Levin et al. 1997).

Asymetrickým delením je bunka rozdelená na väčšiu materskú bunku a menšiu prespóru. Vytvorením asymetrického septa sa jeden z dvoch dcérskych chromozómov z 30% nachádza v prespóre a zo 70% v materskej bunke, čím vzniká dočasná genetická asymetria. Zbytok chromozómu z materskej bunky je následne vtiahnutý pomocou translokázy SpoIIIE do prespóry (Wu a Errington 1994). Materská bunka obklopí svojou membránou prespóru, čím dôjde k pohlteniu čiže *engulfmentu* (Sharp a Pogliano 1999). Týmto spôsobom sa vytvorí prespóra obklopená dvoma membránami v cytozole materskej bunky. Vnútorý obal (*cortex*) je tvorený modifikovaným peptidoglykánom, ktorý sa líši od vegetatívneho peptidoglykánu v modifikovanom murámovom-d-laktámovom cukre a v nižšom počte peptidových prepojení medzi glykánovými vláknami (Popham 2002). Vonkajší obal (*coat*) je zložený zo 70 rôznych proteínov, ktoré sú produkované materskou bunkou (McKenney a Eichenberger 2012). Materská bunka lyzuje a dozretá spóra je uvoľnená do prostredia (Hosoya et al. 2007).

Proces sporulácie je riadený hlavným sporulačným transkripčným faktorom Spo0A a kaskádou šiestich faktorov  $\sigma$ :  $\sigma^A$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^K$ . Aktivita týchto faktorov  $\sigma$  je kompartmentovo špecifická (Fujita a Losick 2003; Losick a Stragier 1992). Proces sporulácie je zhrnutý na obrázku nižšie (**Obr. 4**).



**Obrázok 4: Sporulačný cyklus *B. subtilis*.**

Schéma znázorňuje zjednodušený sporulačný cyklus baktérie *B. subtilis*. V jednotlivých fázach životného cyklu baktérie sú znázornené priestorovo a časovo špecifické faktory  $\sigma$ . Červenou farbou sú znázornené chromozómy. Počas vegetatívneho rastu je baktéria rozdelená symetrickým delením na dve totožné dcérske bunky s jednou kópiou chromozómu. Iniciáciou sporulácie sa chromozómy usporiadajú do axiálneho filamentu prichytením origin oblasti chromozómov na póloch bunky. Vytvorením asymetrického septa na póle bunky je bunka rozdelená na dva kompartmenty a to väčšiu materskú bunku a menšiu prespóru, tým je aktivovaný prvý skorý faktor  $\sigma^F$  charakteristický pre prespóru. Následne sa aktivuje prvý skorý  $\sigma$  faktor materskej bunky  $\sigma^E$ . Engulfmentom vzniká štádium „bunka v bunke“, aktivuje sa neskorý druhý  $\sigma$  faktor prespóry  $\sigma^G$  a formuje sa kôra prespóry (znázornená blede šedou farbou). V materskej bunke sa aktivuje  $\sigma^K$ , formuje sa plášť prespóry (znázornené čiernou farbou okolo kôry prespóry), materská bunka sa rozpadá (znázornené prerušovanou čiarou) a uvoľňuje sa zrelá spóra. Po odznení stresu spóra môže začať germinovať (klíčiť) a následne prejsť do vegetatívneho rastu. Prevzaté a upravené podľa De Hoon *et al.* (2010).

### 6.1.1 Iniciácia sporulácie

Ku počiatku vývojového štádia sporulácie dochádza až vtedy, ak rast bunky v dôsledku nepriaznivých životných podmienok, napr. pri hladovaní, už ďalej nie je možný. Iniciácia sporulácie je aktivovaná prostredníctvom histidín kinázových receptorov (KinA, KinB a KinC) na povrchu bunky (Stephenson a Hoch 2002). Histidín kinázy sú schopné auto-fosforylácie, čo vedie k následnému prenosu fosfátovej skupiny z histidín kináz na Spo0F. Vzniká tak fosforylovaná forma Spo0F~P, ktorá odovzdáva fosfát Spo0B za vzniku Spo0B~P. Nakoniec je fosfátová skupina zo Spo0B~P prenesená na

Spo0A, čím vzniká aktivovaná forma Spo0A~P (Jiang et al. 2000). Ďalšie informácie o transkripčnom faktore Spo0A sú zhrnuté v nasledujúcej kapitole.

### 6.1.2 Transkripčný faktor Spo0A

Transkripčný faktor Spo0A je kódovaný génom *spo0A*, pričom jeho proteínová veľkosť je približne 29,5 kDa. Spo0A je proteín viažuci DNA a hlavný regulátor iniciácie sporulácie. V tejto kapitole nadväzujem na mechanizmus aktivácie proteínu Spo0A, ktorý bol popísaný v kapitole 6.1.1 Iniciácia sporulácie. Predtým ako je bunka rozdelená asymetrickým septom, je na základe pozitívnej spätnej väzby zvýšená transkripcia gén *Spo0A* zo sporulačného promotora závislého  $\sigma^H$  (zhrnuté v De Hoon et al. 2010).

Fosforylovaná forma Spo0A ovplyvňuje viac ako 500 génov počas skorého štádia vývoja, aktivuje gény nevyhnutné pre sporuláciu a 121 génov je priamo pod jeho kontrolou (Molle et al. 2003). Aktívna forma Spo0A~P pôsobí ako transkripčný regulátor (aktivátor/represor). Tieto regulačné vlastnosti sú sprostredkované interakciou C-terminálnej domény Spo0A so špecifickými DNA sekvenciami (5'-TGNCGAA-3') označovanými ako „0A-boxy“, ktoré sa nachádzajú v blízkosti promotórov cieľových génov (Stephenson a Hoch 2002). Fujita *et al.* (2005) rozdelili gény regulónu Spo0A na štyri kategórie na základe odpovede na Spo0A. Prvou skupinou sú gény aktivované pri nízkej hladine Spo0A. V druhej skupine sú gény, ktoré pre aktiváciu vyžadovali vysokú prahovú hladinu Spo0A. Do tretej skupiny patria gény, ktorých prejav bol inhibovaný pri nízkej hladine Spo0A. V poslednej, štvrtej skupine, sú gény inhibované pri vysokej prahovej hladine Spo0A. Do druhej skupiny génov, ktoré sú aktivované vysokou prahovou hladinou Spo0A, patrí gén *refZ* (starší názov *yttP*), ktorému bude ďalej venovaná celá kapitola 6.3 Proteín RefZ.

V skratke teda regulón Spo0A~P pozostáva z génov s nízkou alebo vysokou prahovou hladinou Spo0A (Fujita et al. 2005). Gény zabezpečujúce remodeláciu chromozómov do axiálneho filamentu a gény zapojené do formovania asymetricky umiestneného (polárneho) septa v sporulujúcej bunke, sú taktiež aktivované Spo0A~P (Molle et al. 2003). Spo0A~P zároveň pôsobí ako pozitívny regulátor expresie génov z promotórov závislých na  $\sigma^H$  tým, že Spo0A~P blokuje expresiu *abrB*. Produkt génu *abrB* inak pôsobí ako represor faktoru  $\sigma^H$  (Weir et al. 1991).

## 6.2 Určenie pozície asymetrického septa

To, akým mechanizmom bunka *B. subtilis* umiestňuje deliace septum počas vegetatívneho rastu, je v súčasnosti pomerne dobre známe. Avšak to, akým spôsobom je určená pozícia polárneho asymetrického septa počas sporulácie, stále nie je úplne objasnená u *B. subtilis* (Barák a Muchová 2018). Prvým zjavným morfológickým znakom sporulácie je polárne bunkové delenie, ktoré sa začína prechodom Z-kruhu (tvorený proteínom FtsZ) zo stredu bunky po špirálovitej trajektórii smerom ku obom jej pólom. Tento mechanizmus je závislý na sporulačno špecifickej zvýšenej transkripcii operónu *ftsAZ* a prítomnosti SpoIIE (Ben-Yehuda a Losick 2002). Multifunkčný proteín SpoIIE lokalizuje

s polárnymi Z-kruhmi, avšak jeden z kruhov neskôr zanikne a ďalší dozreje do sporulačného septa (Barák a Muchová 2018). Spoločná lokalizácia je umožnená priamou interakciou SpoIIE cez doménu II s proteínom FtsZ (Lucet et al. 2000). SpoIIE preto slúži ako dobrý marker pre označenie miesta septácie. Sporulačné septum je umiestnené približne v 1/6 celkovej dĺžky bunky od jedného z pólov, pričom SpoIIE, RefZ a MinCD majú kľúčovú úlohu pri jeho presnej lokalizácii. Je zrejme, že pri formovaní Z-kruhov v tejto polohe musí dôjsť ku prekonaniu negatívnych účinkov systému Min, ktorý lokalizuje na póloch bunky a zrejme reguluje pozíciu asymetrického septa zo strany budúcej prespóry (Barák a Muchová 2018).

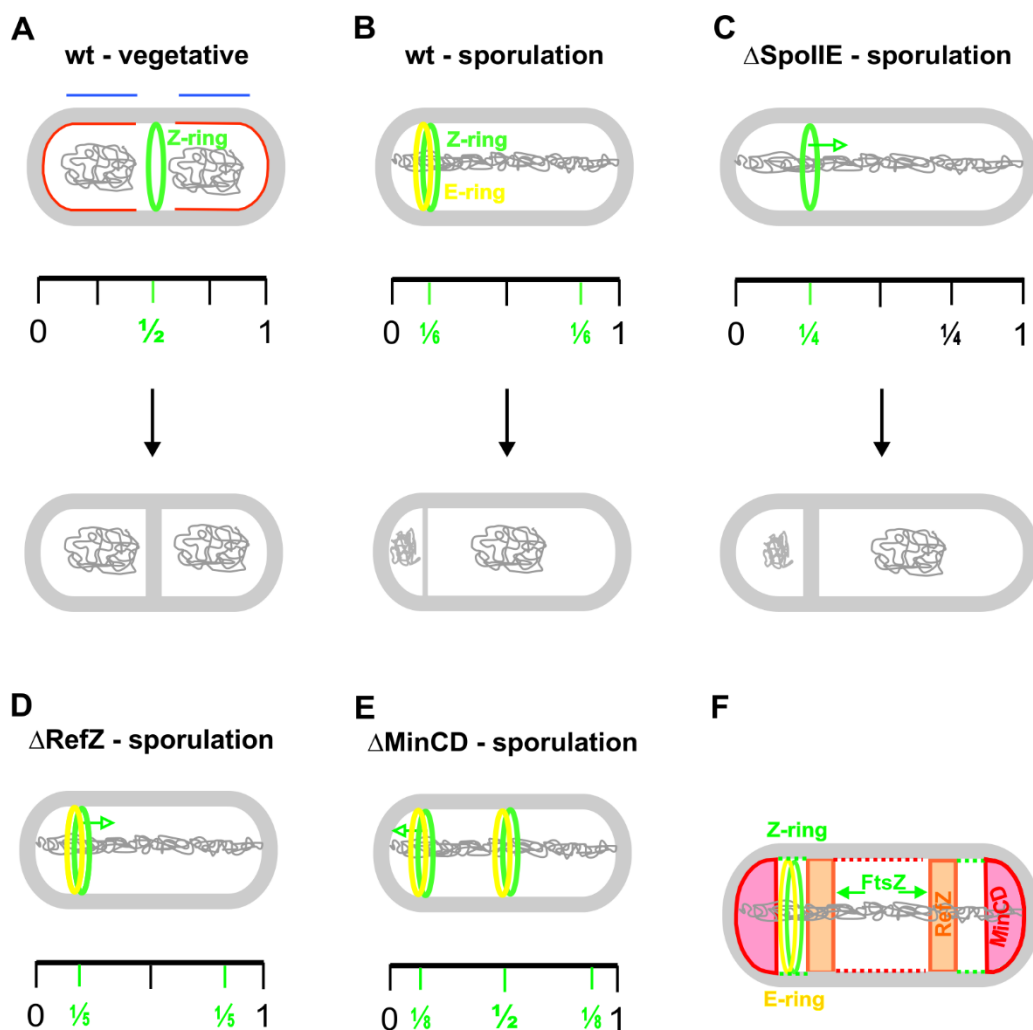
Neprítomnosť SpoIIE znižuje efektívnosť tvorby asymetrického septa a zároveň spôsobuje posun miesta septácie z 1/6 v priemere do 1/4 bunkovej dĺžky od najbližšieho bunkového póla (Barák a Muchová 2018). Zároveň bolo ukázané, že sporulačné septum v kmeni  $\Delta spoIIE$  bolo užšie, než sporulačné septum divokého typu (WT), pričom bolo skôr podobné vegetatívne septu. Takéto bunky zároveň nemôžu vytvárať spóry (Barák a Youngman 1996; Illing a Errington 1991). Avšak to, ako SpoIIE pomáha rozpoznať miesto asymetrického bunkového delenia, nie je stále jasné.

Proteín RefZ takisto ovplyvňuje mechanizmus určujúci presnú lokalizáciu sporulačného septa. V prípade jeho neprítomnosti ( $\Delta refZ$ ) bunky umiestňujú asymetrické septum ďalej od pólu bunky približne do 1/5 dĺžky bunky (Barák a Muchová 2018). Bližšie informácie o proteíne RefZ a jeho funkcii sú uvedené v kapitole 6.3 Proteín RefZ.

Systém Min sa tiež podieľa na umiestnení asymetrického septa. V bunkách, v ktorých chýbajú proteíny MinCD, je asymetrické septum posunuté oveľa bližšie ku pólu bunky, a to v priemere do 1/8 jej celkovej dĺžky. Okrem toho môže byť sporulačné septum u buniek s deléciou Min systému ( $\Delta minCD$ ) umiestnené v blízkosti stredovej časti bunky s nižšou frekvenciou a presnosťou (Barák a Muchová 2018).

Výsledky od Barák a Muchová (2018a) spoločne naznačujú, že v tomto konkrétnom štádiu vývoja systém Min blokuje tvorbu sporulačného septa v blízkosti pólov a zároveň RefZ blokuje tvorbu asymetrického septa ďalej než v 1/6 dĺžky bunky. Tento model ukazuje, ako sa spomínané proteíny podieľajú na rozpoznávaní miesta tvorby asymetrického septa (Barák a Muchová 2018).

Dôvodom, prečo je dôležité umiestnenie sporulačného septa práve v tejto polohe, je zabezpečenie morfolologickej asymetrie počas sporulácie pre priestorovo špecifickú génovú expresiu v menšej prespóre a väčšej materskej bunke (Errington 1996). Ďalším možným dôvodom je, že bunka po rozdelení v 1/6 dĺžky bunky je dostatočne veľká na uskladnenie jedného chromozómu a zároveň dostatočne malá, aby bola relatívne odolná (Barák et al. 2019). Poloha vegetatívneho septa a sporulačného septa v rôznych bakteriálnych kmeňoch je znázornená nižšie (**Obr. 6**).



**Obrázok 6: Modely určenia miesta delenia počas vegetatívneho rastu a sporulácie u baktérie *B. subtilis*.**

- A)** Počas vegetatívneho rastu, po segregácii chromozómov (znázornené šedou farbou vo vnútri bunky) sa v strede bunky vytvára septum, vplyvom faktorov oklúzie (znázornené modrou farbou nad nukleoidmi), kedy v strede bunky uvoľnía miesto a zároveň vplyvom Min systému (znázornené červenou farbou) je blokována tvorba Z-prstencov na póloch bunky (znázornené zelenou farbou).
- B)** Počas sporulácie u divokého kmeňa je Z-kruh vytváraný s vysokou presnosťou približne v  $1/6$  dĺžky od jedného póla bunky.
- C)** Neprítomnosťou SpoIIIE v bunke ( $\Delta spoIIIE$ ) je asymetrické septum tvorené v priemere v  $1/4$  dĺžky bunky od najbližšieho pólu, septum je podobné vegetatívne septu, pričom oproti divokému typu sporulačného septa je hrubšie. Pri presnej lokalizácii sporulačného septa má SpoIIIE kľúčovú úlohu.
- D)** Neprítomnosťou RefZ v bunke ( $\Delta refZ$ ) je asymetrické septum posunuté ďalej od pólu bunky v priemere na  $1/5$  dĺžky bunky od najbližšieho pólu. RefZ má mierny vplyv na lokalizáciu sporulačného septa.
- E)** Neprítomnosťou MinCD v bunke ( $\Delta minCD$ ) je asymetrické septum posunuté výrazne bližšie ku pólu bunky v priemere na  $1/8$  dĺžky bunky od najbližšieho pólu. Zároveň v takýchto bunkách môže byť sporulačné septum umiestnené v blízko stredu bunky s nižšou frekvenciou a presnosťou.
- F)** Nakreslený model ukazuje schopnosť Z-kruhu (zelená farba) a E-kruhu (žltá farba) rozpoznať asymetrické miesto septácie v úzkom priestore, ktoré je tvorené negatívnymi regulátormi bunkového delenia RefZ (oranžová farba) a MinCD (červená farba). Prevzaté a upravené podľa Barák a Muchová (2018).



## 6.3 Proteín RefZ

Proteín RefZ je kódovaný génom *refZ* (starší uvádzaný názov *yttP*). Veľkosť tohto génu je 624 bp a kóduje proteín o veľkosti približne 24,24 kDa. Proteín RefZ nemá esenciálnu funkciu (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/v4/gene?id=C5F67C3ACB06A5029B4AE69A065BC55622372404>). Názov RefZ, bol podľa Wagner-Herman *et al.* (2012) odvodený od jeho funkcie, ako regulátor proteínu FtsZ (***Regulator of FtsZ***), konkrétne uľahčuje prechod Z-kruhu, tvoreného FtsZ proteínom zo stredu bunky ku jej pólom.

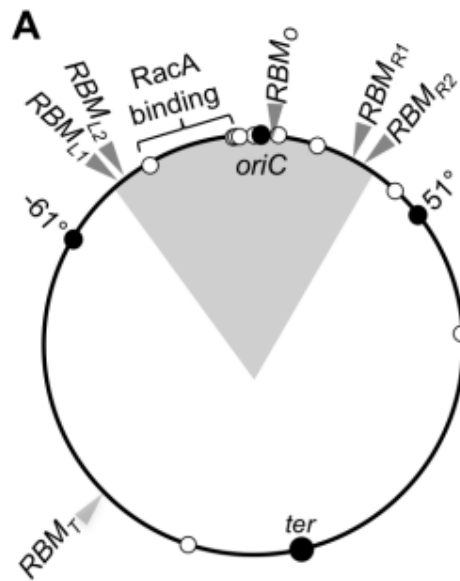
### 6.3.1 Funkcia RefZ

Proteín RefZ má niekoľko funkcií, ktoré budú popísané v tejto kapitole.

RefZ je TetR DNA väzbový proteín, ktorý obsahuje konzervovaný helix-turn-helix (HTH) DNA väzbový motív na jeho aminokyselinovom konci. (Wagner-Herman *et al.* 2012). Wagner-Herman *et al.* (2012) identifikovali za pomoci chromatinovej imunoprecipitácie (ChIP-seq) 6 väzbových miest proteínu RefZ na chromozóme, ktoré sú označované ako RBMs (***RefZ binding motifs***). Z týchto 6 sekvencií je 5 lokalizovaných v jednom štvrtkruhu cirkulárneho chromozómu proximálne od *oriC* oblasti (**Obr. 8**). Iba jedno z väzbových miest v oblasti 225°C v géne *hrcA* sa nachádza v blízkosti replikačnej terminačnej sekvencie (*ter*). RBMs lokalizované v blízkosti *oriC* (RBM<sub>L1</sub>, RBM<sub>L2</sub>, RBM<sub>0</sub>, RBM<sub>R1</sub>, RBM<sub>R2</sub>) majú palindromatické a konzervované sekvencie o dĺžke 20 bp, naopak väzbový motív (RBM<sub>T</sub>) v blízkosti *ter* je degenerovaný bez konzervovanej palindromatickej sekvencie (Wagner-Herman *et al.* 2012; Miller *et al.* 2016). Sekvencie 6 RBMs a ich rozmiestnenie na cirkulárnom chromozóme sú ukázané nižšie (**Obr. 8**).

Miller *et al.* (2016) identifikovali, že sa RefZ na päť *OriC*-proximálnych RBMs s najväčšou pravdepodobnosťou viaže v podobe diméru alebo ako dvojica dimérov. Na RBM<sub>T</sub> sa s najväčšou pravdepodobnosťou viaže RefZ ako dimér (Miller *et al.* 2016).

Zároveň komplex RefZ-RBM prispieva ku presnému zachyteniu chromozomálnych ramien v prespóre počas sporulácie vzhľadom na rovinu asymetrického delenia. Konkrétne mutanti  $\Delta refZ$  aj mutanti RBM5mu (s bodovou mutáciou vo všetkých piatich *oriC*-proximálnych RBMs) vedú k tomu, že pri takýchto podmienkach je v prespóre zachytená aj časť chromozómu, ktorá by sa za normálnych okolností v nej nenachádzala (Miller *et al.* 2016). Tieto výsledky sú v súlade so štúdiou autorov Barák a Muchová, kedy ukázali posun asymetrického septa z 1/6 na 1/5 celkovej dĺžky bunky u buniek  $\Delta refZ$  (Barák a Muchová 2018).

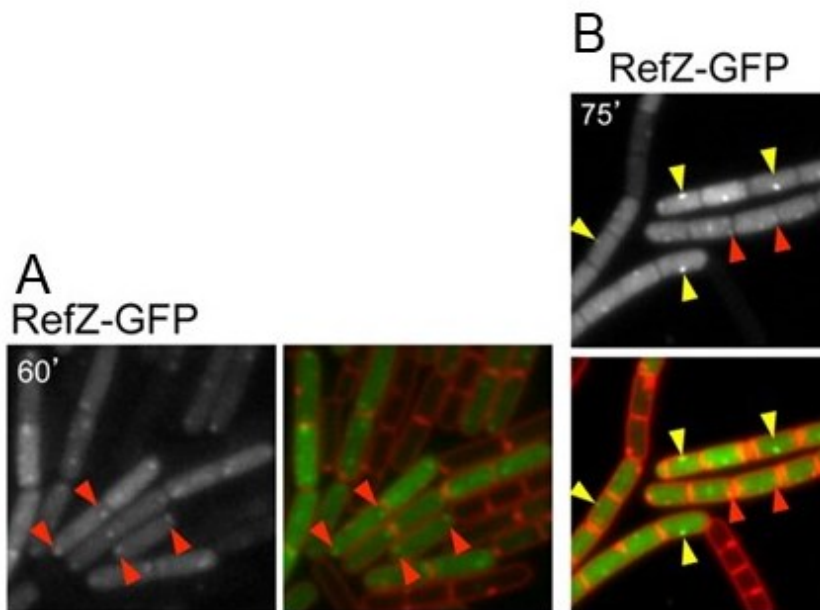


**Obrázok 8: Schematické znázornenie umiestenia väzbových miest na cirkulárnom chromozóme *B. subtilis*.**

Na cirkulárnom chromozóme je čiernymi bodkami označený počiatok *oriC* a terminátor *ter*. Veľká šedý trojuholník označuje umiestnenie hlavných RBMs miest a malými šedými trojuholníkmi označujú presnejšie rozmiestnenie týchto väzbových miest na chromozóme. Prevzaté a upravené podľa Miller *et al.* (2016).

Umelá indukcia syntézy RefZ v bunke počas vegetatívneho rastu spôsobuje rozrušenie FtsZ kruhu do špirál, bodov a oblúkov. To následne spôsobuje blokáciu delenia buniek (Wagner-Herman et al. 2012). Pri iniciácii sporulácie je FtsZ-kruh najskôr vytvorený v strede bunky (Ben-Yehuda a Losick 2002), presun zo stredu bunky ku pólom podporuje RefZ (Wagner-Herman et al. 2012). Chýbanie proteínu RefZ spôsobuje, že FtsZ zostáva dlhšie v strede bunky, ako špirálový medziprodukt, predtým, ako je presunutý ku pólom bunky. Tento efekt je ešte viac podporený pri chýbaní oboch proteínov RefZ a SpoIIE, kedy len 12% buniek pri porovnaní s WT (42%) malo v rovnakom čase od iniciácie sporulácie vytvorený polárny FtsZ prstenec (Wagner-Herman et al. 2012).

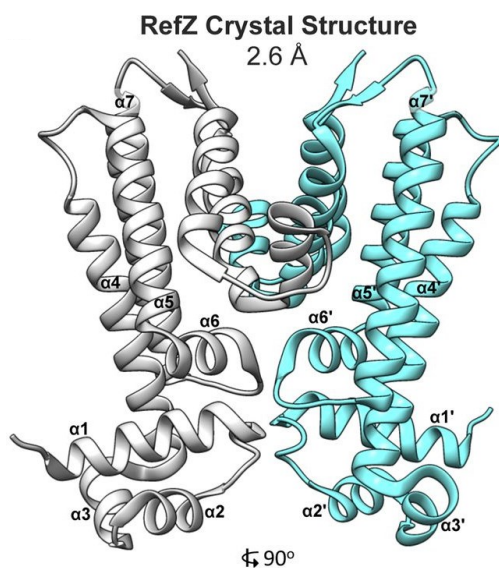
RefZ sa lokalizuje v blízkosti pólov bunky počas tvorby axiálneho filamentu (60 minút po indukcií sporulácie) a zároveň pred nástupom polárneho delenia (**Obr. 9**). V čase polárnej septácie (75 minút po indukcií sporulácie) je RefZ lokalizovaný hlavne v strede bunky, obvykle na bunkovej membráne alebo v jej blízkosti (**Obr. 9**) (Wagner-Herman et al. 2012).



**Obrázok 9: Lokalizácia RefZ v rôznych fázach sporulácie *B. subtilis*.**

- A)** Lokalizácia RefZ-GFP (zelená farba) v slabých polárnych ložiskách (označené červenými šípkou) v skorom štádiu sporulácie (60 min. po indukcii sporulácie).
- B)** Lokalizácia RefZ-GFP v čase 75 min. po indukcii sporulácie v strede bunky (označené žltou šípkou) na bunkovej membráne alebo v jej blízkosti. Prevzaté a upravené podľa Wagner-Herman *et al.* (2012).

Brown *et al.* (2019) identifikovali kryštálovú štruktúru RefZ (**Obr. 10**). Zistili, že RefZ je schopný vytvárať homodimér, pričom každá podjednotka je tvorená desiatimi helixami, ktoré sú prepojené slučkami (*loops*) a ohybmi (*turns*). Alfa helixy 1-2 vytvárajú HTH väzbovú doménu, alfa helixy 4-10 vytvárajú regulačnú doménu. Helixy 8-10 regulačnej domény s antiparalélnymi alfa helixami 8'-10' vytvárajú štvor-helixový dimerizačný motív (Brown *et al.* 2019).



**Obrázok 10: Kryštálová štruktúra RefZ.**

Kryštálová štruktúra homodiméru RefZ pri rozlíšení 2.6 Å. Podjednotky sú znázornené šedou farbou a tyrkysovou farbou. Prevzaté a upravené podľa Brown *et al.* (2019).

Najnovší model pôsobenia RefZ počas sporulácie navrhli Brown *et al.* (2019). Podľa neho je RefZ pripravený inhibovať polymeráciu FtsZ v blízkosti pólov prostredníctvom špecifickej väzby RefZ na polárne lokalizované RBMs na DNA. Doposiaľ všetky publikované články naznačujú, že aktivita RefZ pôsobí ako negatívny regulátor skladania Z-kruhu (Wagner-Herman *et al.* 2012; Miller *et al.* 2016; Barák a Muchová 2018), a preto nebolo jasné, akým spôsobom by RefZ mohol v blízkosti pólov pôsobiť pri presnom umiestnení polárneho deliaceho aparátu počas sporulácie. Brown *et al.* (2019) v ich modeli navrhujú, že RefZ pôsobí, ako lokálny inhibítor FtsZ. Pričom jeho primárnou funkciou nie je inhibovanie formovania polárnych Z-kruhov, ale skôr slúži na doladenie miesta, kde sa formujú polárne Z-kruhy a to v bezprostrednej blízkosti RBMs. Toto bolo dokázané na základe porovnávacej analýzy mutantov rLOF (*RefZ loss of function*).

Žiaden z týchto variantov rLOF proteínu RefZ, ktoré mali zvýšenú alebo zníženú schopnosť dimerizovať neboli schopné zachytávať chromozómy tak, ako divoký typ. To znamená, že bola negatívne ovplyvnená inhibičná funkcia RefZ a všetky tieto varianty mali fenotyp, ako variant  $\Delta refZ$ . Tieto výsledky sú v súlade s modelom, v ktorom RefZ sprostredkováva presné zachytenie chromozómov moduláciou FtsZ aktivity (Brown *et al.* 2019). Brown *et al.* (2019) preto navrhli, že dynamický proces vymieňania monomérskej-dimérskej formy RefZ, pri ktorom nie je zachovaný špecifický oligomérny stav je dôležitý pre správne fungovanie RefZ. Podľa nich jednou z možností je, že RefZ viazaný na RBMs vo forme diméru, disociuje z DNA vo forme monoméru po spojení s FtsZ (Brown *et al.* 2019).

V najnovšej štúdií od Millera a Hermana (2022) skúmali vznik syntetických defektov počas sporulácie kombináciou  $\Delta refZ$  s deléciami génov, ktoré sa podieľajú na regulácii FtsZ a/alebo na zachytení chromozómov počas sporulácie. Kombinácia  $\Delta refZ$  s deléciami *ezrA*, *sepF*, *parA* a *minD* nemajú detekovateľný vplyv na sporuláciu. Deléciou oboch génov *refZ* a *noc* dochádza ku syntetickým defektom sporulácie, ktoré sa vyznačujú aberantným delením a zastavením sporulácie. V takýchto prípadoch dochádza ku iniciácii sporulácie, ale bunka sa nedelí polárne a pokiaľ sa delí polárne, tak nedochádza ku aktivácii prvého faktoru  $\sigma^F$  špecifického pre prespóru. Ďalšia skupina buniek  $\Delta refZ$  a  $\Delta noc$  vykazovala rozsiahle poruchy regulácie bunkového delenia, kedy bunky tvorili buď extra septum alebo ho nesprávne umiestňovali (Miller a Herman 2022). Výsledky štúdie autorov Miller a Herman (2022) teda naznačujú, že RefZ a Noc synteticky prispievajú ku regulácii bunkového delenia a podpore vývoja spór.

Štúdia Britton *et al.* (2002) priradila vtedy gén známy pod názvom *yttP* (*refZ*) do regulónu  $\sigma^H$ . Zároveň predikovali konsenzus sekvencie -10 a -35. Iniciačný nukleotid +1 nebol identifikovaný. Predikovaný konsenzus sekvencie s 11 nukleotidmi dlhým medzerníkom je nasledovný (Britton *et al.* 2002): -10 CTTGAATAG; -35 ACAGGAACA. Ako už bolo spomínané v kapitole transkripčný faktor Spo0A, *refZ* patrí do Spo0A regulónu, pričom jeho expresia je aktivovaná vysokou prahovou hladinou

Spo0A (Fujita et al. 2005). Ako ďalší transkripčný aktivátor *refZ* sa uvádza PhoP (Prágai et al. 2004), naopak, ako represor expresie *refZ* je uvádzaný proteín CcpA (Blencke et al. 2003). Zároveň nami vykonanou bio-informatickou analýzou bol predikovaný doposiaľ neznámy promótor, závislý na faktoroch  $\sigma^F$  alebo  $\sigma^G$ , ktorý sa nachádza v proti smere transkripcie od  $\sigma^H$  závislého promótoru predikovaného autormi Britton *et al.* (Britton et al. 2002). Expresia *refZ* nebola doteraz experimentálne overená a v súčasnosti dostupné údaje boli len dedukované, čo viedlo ku vypracovaniu tejto diplomovej práce vid' Ciele práce.

## 7 Ciele práce

- Prvým hlavným cieľom je charakterizácia expresie a lokalizácie RefZ v modelovom organizme *Bacillus subtilis*, konkrétne:
  - identifikovať promótor/y génu *refZ*,
  - charakterizovať reguláciu promótoru/ov génu *refZ*,
  - definovať lokalizáciu RefZ v bunke počas sporulácie a určiť promótory zodpovedné za prípadne rozdielnu časovo-priestorovú expresiu.
- Druhým hlavným cieľom je určiť interakčných partnerov RefZ.

## 8 Materiály a metódy

### 8.1 Zoznam prístrojov

#### 8.1.1 Centrifúgy

- **Avanti J-26XPI (Beckman Coulter)**

Chladená centrifúga s vymeniteľnými rotormi

Rotor JA-10 s maximálnou kapacitou 6 kyviat (0,5l), maximálne zrýchlenie 17 700xg.

Rotor JA-25.50 s maximálnou kapacitou 8 kyviat (50ml), maximálne zrýchlenie 25 000xg.

- **Allegra X-15R Centrifuge (Beckman)**

Chladená centrifúga s výkyvným rotorom SX4750A, maximálne zrýchlenie 5 250xg

Maximálna kapacita 28 kyviat (50ml) alebo 56 kyviat (15ml)

- **Microfuge® 20R (Beckman Coulter)**

Chladená centrifúga s maximálnou kapacitou 24 mikroskúmaviek (2ml).

Rotor FA241.5, maximálne zrýchlenie 20 627xg.

- **Mini-Centrifuge (Rotilabo)**

Stolná centrifúga určená na krátke stáčanie vzoriek. Maximálna kapacita 6 mikroskúmaviek (2ml).

Maximálne zrýchlenie 2 000xg.

- **Universal 320 R (Hettich)**

Chladená centrifúga s vymeniteľnými rotormi

Rotor 1420-B s maximálnou kapacitou 24 mikroskúmaviek (2 ml), maximálne zrýchlenie 21 382xg.

Rotor 1620-A s maximálnou kapacitou 6 kyviat (50 ml), maximálne zrýchlenie 9 509xg.

#### 8.1.2 Trepáčky a termostaty

- **Bio RS-24 Mini-Rotator**

Rotátor s vertikálnym otáčaním.

- **Block Heater SBH 130D (STUART)**

Blokový termostat využívaný na inkubáciu s maximálnou kapacitou 36 mikroskúmaviek (1,5ml).

Teplotné rozmedzie 24-130°C.

- **Horizontal Shaker HS250 BS1 (IKA laborortechnik)**

Horizontálna trepačka s časovačom využívaná na inkubáciu bunkových kultúr v Erlenmayerových bankách. Maximálne otáčky 500 rpm.

- **Mini Rocker MR 1 (BIOSAN)**

Stolná trepačka s preklápaním využívaná pri farbení SDS-PAGE proteínových gélov, 5-30 kmit/min.

- **Multi Bio RS24 (BIOSAN)**

Rotátor s nastaviteľným vertikálnym otáčaním a časovačom. Maximálna kapacita 26 mikroskúmaviek.

- **Multi – Functional Shaker PSU 20 (BIOSAN)**  
Stolná trepačka s nastaviteľným typom trepania – recipročné, vibračné, orbitálne. Otáčky 20-250 rpm.
- **Thermo Shaker Ts 100C (Biosan)**  
Termostat s kapacitou 24 mikroskúmaviek (1,5ml) s možnosťou ich trepania. Teplotné rozmedzie 24-100 °C, otáčky 250-1400 rpm.
- **Thermostat (Brouwer)**  
Termostat využívaný na kultiváciu bunkových kultúr v Erlenmayerových bankách a na Petriho miskách .
- **Vortex Genie 2 (Scientific industries)**  
Vortex s voliteľným režimom dotykovým/kontinuálnym. Nastaviteľné otáčky v rozmedzí 600-3200 rpm.

### 8.1.3 Elektroforézy

- **Owl™ P10DS Dual Gel System (ThermoFisher Scientific)**  
Vertikálna elektroforéza využívaná na analýzu fragmentov RNA značených izotopom.
- **Xcell SureLock™ Mini Cell Electrophoresis System (ThermoFisher Scientific)**  
Vertikálna elektroforéza využívaná pri analýze proteínov spolu s komerčne dostupnými gélni NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris od firmy ThermoFisher Scientific.
- **Owl™ EasyCast B1A Mini Gel Electrophoresis System (ThermoFisher Scientific)**  
Horizontálna elektroforéza využívaná na analýzu fragmentov DNA.

### 8.1.4 Zdroje napätia

- **Enduro 300V Power Supplies (LABNET INC.)**  
Zdroj napätia pre elektroforetické zariadenia s maximálnym napätím 300V.
- **PowerPac 3000 (Bio Rad)**  
Zdroj napätia pre elektroforetické zariadenia s maximálnym napätím 300V.

### 8.1.5 Ďalšie prístroje

- **Amersham™ Typhoon (GE Healthcare)**  
Zobrazovací systém používaný pre skenovanie citlivých dosiek osvietených rádioaktívnymi gélni.
- **BAS-MS2040 (FUJI)**  
Kazeta s citlivou doskou na vyhodnotenie transkripcií *in vitro*.
- **ABJ 220-4NM**  
Laboratórna analytická váha (minimum 1 mg-maximum 220 g).
- **EG 2200 (Kern)**  
Laboratórna analytická váha (minimum 0,01 g – maximum 2200 g).
- **Quit™ 4 fluorometer (Invitrogene)**



Fluorometer využívaný na meranie koncentrácie proteínov.

- **GD-4534 (Scie-Plas)**

Vákuová sušička využívaná na sušenie polyakrylamidových gélov.

- **KNFLAB (LABPORT)**

Vákuová pumpa

- **MINI 900EP15 Contamination And Radiation Monitor (ThermoFisher Scientific)**

Geigerov – Müllerov príručný počítač rádioaktivity s citlivosťou 0,5 – 2000 cps.

- **Nanodrop™ Lite (ThermoFisher Scientific)**

Spektrofotometer využívaný na určenie koncentrácie DNA.

- **T100 Thermal Cycler (BioRad)**

PCR cyklovač.

- **pH/ION 510 (Oakton Instruments)**

pH meter.

- **UP200S (Hielscher)**

Sonikačné zariadenie s možnosťou výmeny sond.

- **UV-1601PC UV Visible (Shimadzu)**

Spektrofotometer s viditeľným svetlom a UV.

- **UVT-20M (Herolab)**

Transluminátor využívaný na fluorescenčnú excitáciu vzoriek na elektroforetickom géle.

- **Slide A Lyzer Dialysis Cassette (ThermoFisher Scientific)**

Dialyzačná kazeta využívaná na výmenu proteínového pufru.

- **DeltaVision OMX™**

Zobrazovací systém optimalizovaný na poskytovanie stabilnej platformy pre super rozlíšenie štruktúrovanej iluminačnej mikroskopie (SIM).

Objektív: 60x 1,42, PlanApo N olejový imerzný objektív.

Softvér: softWoRx™ Imaging Workstation software.

- **Tecan Spark® 10M - Multimode Plate Reader (TECAN)**

Čítačka mikrodštičiek, ktorá je schopná merať absorbanciu, fluorescenciu, luminiscenciu a polarizáciu fluorescencie. Má možnosť nastaviteľnej teploty.

## 8.2 Zoznam použitých chemikálii

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP – M.G.P

Agaróza pre molekulárnu biológiu – Amresco

Amónium persulfát (APS) – Sigma

Ampicilín (Amp) – Biotika

Brómfenolová modrá – Dr. G. Gruber & Co.

BSA (Hovädzí sérový albumín) – Sigma  
 $C_6H_5Na_3O_7$  (citrónan sodný) - Lachema, a.s  
Coomassie Brilliant blue G-250 – Serva  
Dithiotreitol (DTT) – Serva  
dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP) – Roche  
Dusičnan vápenatý ( $Ca(NO_3)_2$ ) – Penta  
EDTA (celý názov) – Lachema  
Erytromycín – Serva  
Etanol 70% – Penta  
Etanol 96% – Penta  
Etyléndiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Lachema, a.s  
Expand High Fidelity PCR System – Roche  
Fenol – AppliChem  
Fenylalanín – Thermo Fisher  
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) – P – LAB  
Formamid – Penta  
Fosforečnan draselný ( $KH_2PO_4$ ) - Penta  
Gel Red – Biotium  
Glukóza - Lachema  
Glycerol – Sigma  
GranuCult® Nutrient broth – Sigma  
Heptahydrát síranu horečnatého ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) – Penta  
Hydrogénfosforečnan draselný ( $K_2HPO_4$ ) – Ducheta Biochemie  
Hydrogénfosforečnan sodný ( $Na_2HPO_4$ ) – Lach-Ner  
Hydroxid sodný (NaOH) – Penta  
 $CH_3COONa$  (Octan sodný) – Lachema, a.s  
Chlorid draselný (KCl) – Lachema  
Chlorid horečnatý ( $MgCl_2$ ) – Penta  
Chlorid sodný (NaCl) – Lach-Ner  
Chlorid vápenatý ( $CaCl_2$ ) – Lach-Ner  
Chloroform – Penta  
iH<sub>2</sub>O (Aqua pro injection) – Braun

Imidazol – Sigma  
Izopropanol – Lach–Ner  
Izopropyl-β-D-thiogalaktózid (IPTG) – Merck  
Jód – Fisher Scientific  
Kanamycín – Serva  
Kazamínobová kyselina - Difco  
Kvasinkový extrakt – Difco  
Kyselina boritá (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) – Penta  
Kyselina fosforečná (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) – Penta  
Linkomycín - Sigma  
Loading buffer – Takara  
ME (β-merkaptóetanol) – Serva  
Merkaptóetanol – Serva  
NileRed – Sigma  
Ni-NTA agaróza – Qiagen  
NTP (ATP, UTP, CTP, GTP) – Roche  
NuPAGE™ LDS Sample pufor (4x) – Invitrogen  
PAA (Polyakrylamid) – Serva  
Proteín inhibítor kokteíl – Sigma  
Restričné endonukleázy (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *DpnI*) – New England Biolabs  
rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) – New England Biolabs  
SAP pufor – NEB  
SimplyBlue™ SafeStain – Invitrogen  
Síran amónny ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) - Lachner s.r.o  
Síran horečnatý (MgSO<sub>4</sub>) – Penta  
Síran železnatý (FeSO<sub>4</sub>) – Lachema  
Spektinomycín – Sigma  
T4 DNA Ligační pufr – Takara  
T4 DNA Ligáza – Takara  
Tetracyklín – Sigma  
Tetrametyletyléndiamín (TEMED) – Serva  
Tris-HCl – Serva

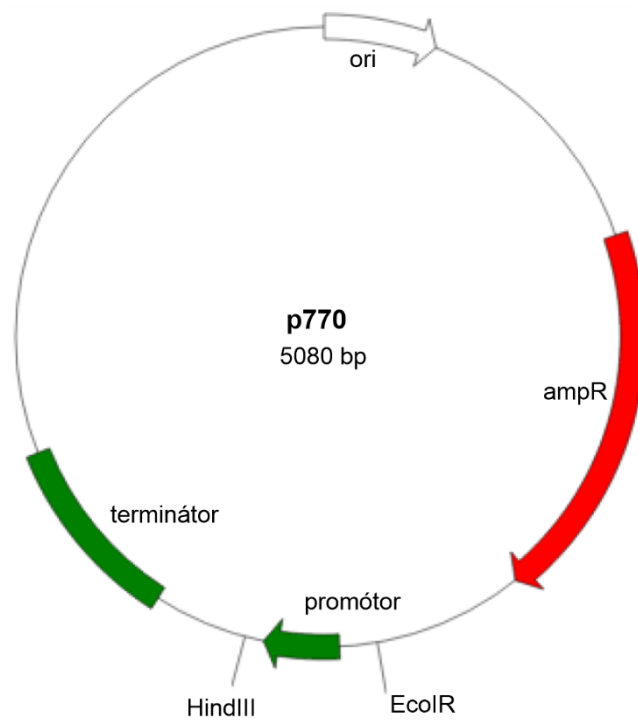
Tryptofán - Oxid

Tryptón – Oxid

### 8.3 Vektory

#### Plazmid p770

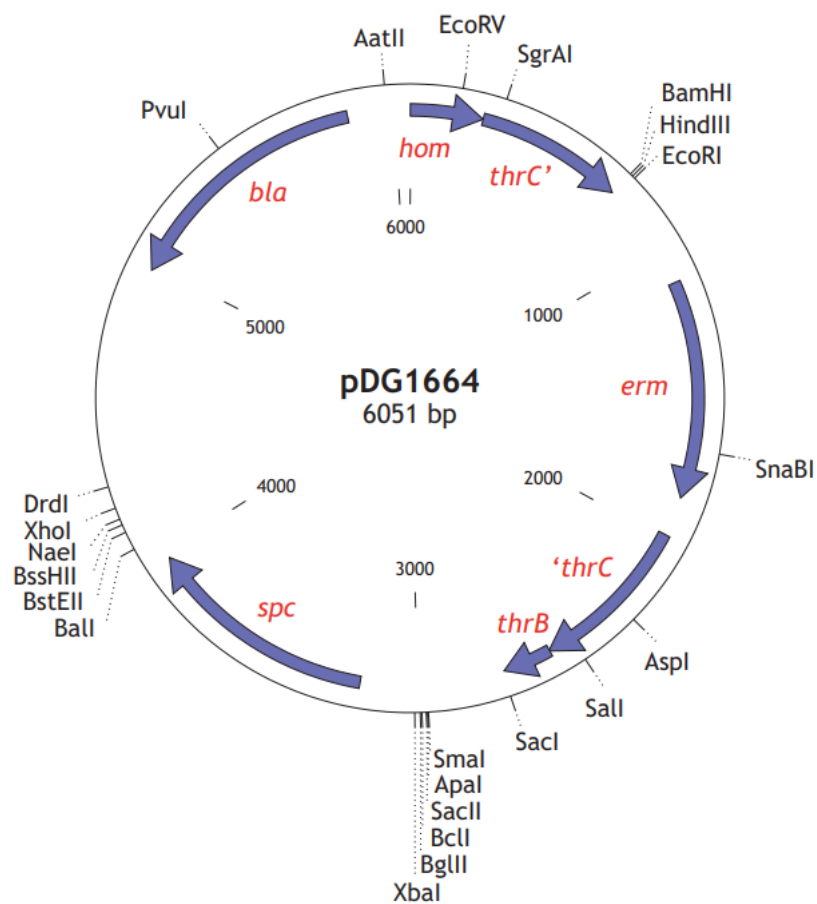
Od laboratórnej skupiny Richarda Grouse (Ross et al. 1990) získalo naše laboratórium plazmid p770. Tento plazmid bol využitý na vloženie celej promótorovej oblasti génu *refZ* medzi restriktčné miesta *EcoRI* a *HindIII* pomocou restriktčných endonukleáz. Plazmid s vloženým promótorom bol využitý v transkripčných reakciách *in vitro*. Plazmid p770 obsahuje počiatok replikácie, gén kódujúci  $\beta$ -laktamázu poskytujúcu rezistenciu na ampicilín a terminátor nezávislý na faktore Rho. Schéma plazmidu je znázornená nižšie (**Obr. 11**).



**Obrázok 11: Schéma plazmidu p770.** Mapa plazmidu bola skonštruovaná v programe SnapGene Viewer. Dostupné na adrese <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>.

## Plazmid pDG1664

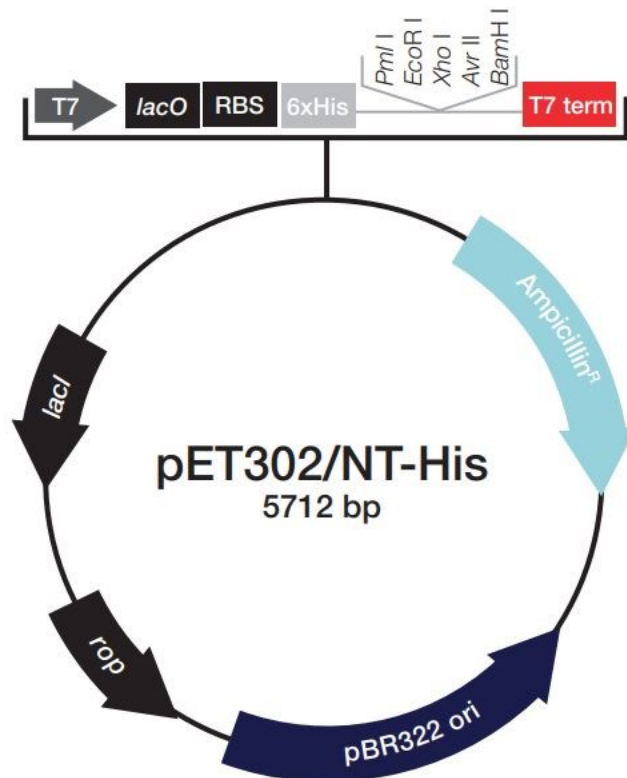
Plazmid pDG1664 umožňuje integrovať klonovaný fragment do *thrC* lokusu chromozómu u *B. subtilis*. Tento plazmid slúžil na vytvorenie bakteriálnych kmeňov, ktoré obsahovali *refZ* s GFP značením. Inzerty boli vložené medzi restričné miesta *EcoRI* a *BamHI* pomocou restričných endonukleáz *EcoRI* a *BamHI*. Plazmid pDG1664 obsahuje gén kódujúci  $\beta$ -laktamázu poskytujúci rezistenciu na ampicilín, gén *erm* kódujúci rRNA adenine N-6-metyltransferázu, ktorá poskytuje rezistenciu na erytromycín a linkomycín, ďalej gén *spc*, ktorý kóduje spektinomycín adenyltransferázu a umožňuje rezistenciu na spektinomycín. Na plazmide sa ďalej nachádzajú *thrC'* lokusy (5' a 3' segmenty *thrC* génu *B. subtilis* 168). Schéma plazmidu je znázornená nižšie (Obr. 12).



Obrázok 12: Schéma plazmidu pDG1664. Prevzaté z (Salahshourifar et al. 2002).

## Plazmid pET302

Plazmid pET302 (5712 bp) je expresný vektor vhodný na klonovanie génov a následnú nadprodukciiu proteínov. Obsahuje T7 inducibilný promótor, sekvenciu 6xHis-tag (6 histidínová kotva), gén poskytujúci rezistenciu na ampicilín. Do plazmidu bol vložený gén kódujúci Spo0A metódou klonovania PCR. Za 6xHis-tag bolo vložené TEV miesto klonovaním PCR, toto miesto sa prirodzene na plazmide nenachádza. Plazmid bol využitý na nadprodukciiu proteínu Spo0A. Schéma plazmidu je znázornená nižšie (**Obr. 13**).



**Obrázok 13:** Schéma plazmidu pET302. Prevzaté z manuálu of firmy Invitrogen.

## 8.4 Bakteriálne kmene

Tabuľka 1: Zoznam bakteriálnych kmeňov.

Číslo kmeňa	Genotyp	Pôvod
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44; <math>\Delta</math>lacU169(<math>\Phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15); hsdR17; recA1; endA1; gyrA96; thi-1; rel-A1</i>	laboratórna zásoba
DE3 (BL21)	F- <i>ompT hsdS(rB- mB-) gal dcm <math>\lambda</math>(DE3)</i>	laboratórna zásoba
RLG 6904/LK5	DH5 $\alpha$ , pDG1664	(Guérout-Fleury et al. 1996)
LK1177	DH5 $\alpha$ , p770 Pveg (38/+1, +1G)	(Krásný a Gourse 2004)
LK1425	BL21 (DE3), pET22b (+) <i>sigF</i> -6His	(Sudzinová et al. 2021)
LK1423	BL21 (DE3), pET22b (+) <i>sigG</i> -6His	laboratórna zásoba
LK3764	MM295, pSG61154 (+) <i>refZ-3xFLAG</i>	Imrich Barák, SAV,BA,SK
LK1365	BL21 (DE3), pET3/ <i>sigA</i>	(Sudzinová et al. 2021)
LK1208	BL21 (DE3), <i>sigH</i> -6His	(Sudzinová et al. 2021)
LK3209	BL21 (DE3), pET302/NT-His/CarD_NO tag	laboratórna zásoba
LK1495	DH5 $\alpha$ , p770/P <i>spoIIQ</i> (-251/+9)	(Sudzinová et al. 2021)
LK2994	DH5 $\alpha$ , p770 (+) <i>PhelD</i> Full	laboratórna zásoba
LK3357	DH5 $\alpha$ , pDG1664 (+) <i>refZ-gfp</i> (SigH závislý promótor)	Táto práca
LK3523	DH5 $\alpha$ , pDG1664 (+) <i>refZ-gfp</i> (SigG/SigF,SigH závislý promótor)	Táto práca
LK3813	DH5 $\alpha$ , pDG1664 (+) <i>refZ-gfp</i> (Shine Dalgarno)	Táto práca
LK3228	DH5 $\alpha$ , p770 (+) <i>refZ</i> Full (SigG/SigF,SigH závislý promótor)	Táto práca
LK3604	DH5 $\alpha$ , pET302 (+) <i>spo0A</i> -6His	Táto práca
LK3607	BL21(DE3), pET302 (+) <i>spo0A</i>	Táto práca
<b><i>B. subtilis</i></b>		
LK1629	PY79, prototrof PS $\beta$	(Youngman et al. 1984)
LK3129	PY79, KO <i>refZ</i>	Imrich Barák, SAV,BA,SK
LK2813	PY79, <i>refZ-GFP</i>	Imrich Barák, SAV,BA,SK
LK2711	Basys Bio (168trp+)	Olivier Delumeau
LK1723	PY79, MH5636 $\beta^-$ -10His	(Qi a Hulett 1998)
LK1741	MO1099, <i>trcC pheA1, amyE::ery</i> MLS	(Krásný a Gourse 2004)
LK3379	PY79, <i>refZ-gfp</i> (SigH závislý promótor)	Táto práca
LK3503	PY79, <i>refZ-gfp</i> (Full - SigG/SigF,SigH závislý promótor)	Táto práca
LK3814	PY79, <i>refZ-gfp</i> (Shine Dalgarno)	Táto práca
LK3783	PY79, <i>refZ-3xFLAG</i>	Táto práca



## 8.5 Kultivácia baktérii

### Zloženie médií:

**Tabuľka 2:** Zloženie LB média.

Látka	Množstvo
Tryptón	10 g
Kvasinkový extrakt	5 g
NaCl	10g
dH <sub>2</sub> O	doplniť do 1L

**Tabuľka 3:** Zloženie DSM média.

Látka	Množstvo
Nutrient broth	8 g
10% (w/v) KCl	10 ml
1,2% (w/v) MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 ml
1 M NaOH	~1.5 ml (pH to 7.6)

**Tabuľka 4:** Aditíva DSM média.

Látka	Konečná koncentrácia
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,001 M
MnCl <sub>2</sub>	0,00001 M
FeSO <sub>4</sub>	0,001 mM

Bakteriálne kmene *B. subtilis* a *E. coli* boli kultivované v tekutom LB médiu/DSM médiu s príslušným antibiotikom alebo bez antibiotika. Kultivácia prebiehala v 50ml Falconových skúmavkách (v objeme 5-10 ml média) alebo v Erlenmayerových bankách (maximálne v objeme 1/3 objemu banky). Baktérie boli kultivované v 37°C za neustáleho premiešavania na trepačke. Na nočný rast boli baktérie nasadené sterilnou špičkou z glycerolovej konzervy/misky s bakteriálnymi kolóniami do LB média s príslušným antibiotikom/bez antibiotika, kultivácia prebiehala 16 hodín pri 37°C za neustáleho premiešavania na trepačke.

Na pevnom LB médiu s 1,5% agarom boli baktérie kultivované v 37°C.

## 8.6 Meranie optickej denzity

Postup:

Odobratá bakteriálna kultúra bola zriedená s dH<sub>2</sub>O v pomere 1:9. Na spektrofotometri UV – 1601PC bola odmeraná optická denzita (OD) pri vlnovej dĺžke 600 nm. Z nameranej hodnoty OD<sub>600</sub> bola vypočítaná OD nezriedenej kultúry.

## 8.7 Tvorba glycerolovej konzervy

Z novo vytvorených kmeňov v rámci tejto diplomovej práce boli vytvorené glycerolové konzervy. Z bakteriálnej kultúry vypestovanej v tekutom LB médiu (kultivovanom cez noc) bolo odobratých 850 µl, ku ktorým bolo pridaných 150 µl sterilného glycerolu. Zmes bola dôkladne premiešaná a uskladnená v -80°C. Tieto podmienky umožňujú uchovávať bakteriálne kmene dlhú dobu bez akéhokoľvek poškodenia.

## 8.8 Izolácia chromozomálnej DNA

Na izoláciu chromozomálnej DNA bol využitý komerčný High Pure PCR Template Preparation Kit od firmy Roche Life Science.

Zloženie pufru 10x PBS: 18mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27 mM KCl, 1,37 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Postup:

1. Bunky boli kultivované cez noc v 10 ml LB média (postup kultivácie podľa postupu v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii).
2. Z bakteriálnej kultúry bol odpipetovaný 1 ml do sterilnej mikroskúmavky.
3. Bunky boli centrifugované pri podmienkach 3000xg, 5 min, 23°C. Supernatant bol následne odpipetovaný.
4. Pelet bol resuspendovaný v 200 µl 1xPBS.
5. Ďalej bolo pridaných 5 µl lyzozýmu o koncentrácii 10 mg/ml (0,01 g lyzozým + 10 mM Tris-HCl pH8 do 1 ml). Nasledovala inkubácia v termobločku 15 min v 37°C.
6. Po pridaní 200 µl Binding pufru bola vzorka okamžite premiešavaná do momentu, pokiaľ nebola číra.
7. Po pridaní 40 µl Proteináza K bola vzorka okamžite premiešavaná, do momentu pokiaľ nebola číra.
8. Nasledovala inkubácia v termobločku 10 min v 70°C.
9. Ku vzorke bolo pridaných 100 µl izopropanolu.
10. Vzorka bola prepipetovaná do predpripravenej filtračnej kolónky a bola centrifugovaná pri podmienkach 8 000xg, 1 min, 23°C.
11. Filtračná kolónka bola prenesená do čistej mikroskúmavky. Na kolónku bolo nanosených 500 µl Inhibitor removal buffer. Centrifugácia prebiehala pri podmienkach 8 000xg, 1 min, 23°C.

12. Filtračná kolónka bola opäť prenesená do čistej mikroskúmavky. Na kolónku bolo nanosených 500 µl Wash pufru. Centrifugácia prebiehala pri podmienkach 8 000xg, 1 min, 23°C. Tento krok bol vykonaný 2x.
13. Pretečený supernatant bol vyliaty a kolónka bola centrifugovaná 10 sek na maximálne zrýchlenie.
14. V nasledujúcich krokoch je popísaná elúcia chromozomálnej DNA z kolónky. Filtračná kolónka bola premiestená do čistej mikrocentrifugačnej skúmavky.
15. Na kolónku bolo nanosených 200 µl Elution pufru o teplote 70°C.
16. Chromozomálna DNA bola eluovaná z kolónky centrifugáciou pri podmienkach 8 000xg, 1 min, 23°C.
17. Koncentrácia izolovanej chromozomálnej DNA bola odmeraná na NANODROPT™ LITE.

## **8.9 Izolácia plazmidovej DNA - Midiprep**

Na získanie väčších výťažkov izolovanej plazmidovej DNA bol využitý komerčný kit Wizard® Plus Midiprep DNA Purification System od firmy Promega.

Postup:

1. Bunky boli kultivované cez noc v 100 ml LB média (postup kultivácie podľa postupu v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii).
2. Nočná kultúra bola ponechaná na ľade po dobu 15 minút (to zabezpečilo zastavenie rastu kultúry).
3. Vychladené bunky boli centrifugované pri podmienkach 5 251xg, 10 min, 4°C.
4. Supernatant bol vyliaty a pelet bol vortexovaním resuspendovaný v 3 ml Cell Resuspension Solution.
5. Následne boli pridané 3 ml Cell Lysis Solution, obsah falkonky bol premiešaný jemným preklápaním.
6. Nasledovalo pridanie 3 ml Cell Neutralization Solution, obsah falkonky bol premiešaný jemným preklápaním.
7. Roztok bol centrifugovaný pri podmienkach 27 000xg, 10 min, 4°C.
8. Supernatant bol opatrne preliaty do čistej 50ml Falkonconovej skúmavky.
9. Ku supernatantu bolo pridaných 7,5 ml Wizard Midiprep DNA Purification Resin, obsah falkonky bol premiešaný.
10. Kolona bola pripojená na vákuové odsávanie, roztok s Resinom bol nanosený na kolónu, roztok pod vplyvom vákua pretiekol cez kolónu.
11. Po pretečení roztoku cez kolónku bolo pridaných 30 ml Column Wash Solution na premytie.
12. Po poslednom premytí a pretečení Column Wash Solution, kolóna bola nechaná na vákuovom odsávaní ešte 30 sek. Po 30 sek, bola kolóna odpojená z vákuového odsávania.
13. Skalpelom bola odrezaná spodná časť kolóny, ktorá obsahovala filter. Táto časť bola vložená do 1,5ml mikroskúmavky a nasledovala centrifugácia za podmienok 12 000xg, 1 min, 23°C.

14. Po centrifugácii bola kolóna prenesená do čistej 1,5ml mikroskúmavky, na kolónu bolo nanesených 300 µl injekčnej vody o teplote 65°C a kolóna bola ponechaná v izbovej teplote po dobu 1 min.
15. Centrifugácia za podmienok 13 200xg, 30 sek, 23°C, kolóna bola odstránená.
16. Nasledovala centrifugácia za podmienok 12 000xg, 5 min, 23°C, odstránenie zvyškov rezinu.
17. Roztok bol prepipetovaný do čistej 1,5ml mikroskúmavky. Pipetou bol odmeraný objem supernatantu a plazmidová DNA bola následne zrážaná.

#### **Zrážanie plazmidovej DNA:**

18. K supernatantu bol pridaný octan sodný (CH<sub>3</sub>COONa, 3M) pH 5,2 (1/10 objemu supernatantu), roztok bol premiešaný preklápaním.
19. Ku roztoku bol pridaný 96% EtOH (2,2 násobok objemu supernatantu) a roztok bol dôkladne premiešaný.
20. Po pridaní EtOH bol roztok vložený na 10 min do -80°C.
21. Po chladení nasledovala centrifugácia pri podmienkach 13 200xg, 20 min, 4°C. Supernatant bol odpipetovaný.
22. Ku peletu bolo pridaných 100 µl 70% EtOH, pelet bol resuspendovaný vortexovaním.
23. Centrifugácia pri podmienkach 13 200xg, 20 min, 4°C. Supernatant bol nasledovne odpipetovaný.
24. Pelet bol sušený v exikátore, ktorý bol pripojený na vákuovú pumpu po dobu približne 10 min.
25. Po vysušení bol pelet rozpustený v 50 µl injekčnej vody. Koncentrácia izolovanej plazmidovej DNA bola odmeraná na NANODROPT<sup>™</sup> LITE.

### **8.10 Izolácia plazmidovej DNA-Midiprep a fenol-chloroformová extrakcia**

Plazmid využívaný v transkripcii *in vitro* bol izolovaný komerčným kitom Wizard® plus MidiPrep DNA purification systém od firmy Promega. Vďaka tejto metóde je možné získať vyššie výťažky izolovaného plazmidu. Na odstránenie prípadných RNAáz z izolovanej plazmidovej DNA bola využitá fenol chloroformová extrakcia.

Postup izolácie plazmidovej DNA je totožný, ako v kapitole Izolácia plazmidovej DNA-Midiprep po krok 16. V tejto kapitole sa nadväzuje na krok 16, krokom 1 pre túto kapitolu.

Postup:

1. Ku izolovanej plazmidovej DNA bol pridaný fenol v pomere vzorka : fenol = 1 : 1. Zmes v mikroskúmavke bola vložená na otočnú trepačku na 5 minút.
2. Zmes bola následne centrifugovaná pri podmienkach 13 200xg, 5 min, 24°C.
3. Horná vodná fáza bola odpipetovaná do sterilnej mikroskúmavky, ku ktorej bolo pridaných fenol a chloroform v pomere fenol : chloroform : vzorka = 0,5 : 0,5 : 1.
4. Nasledovalo premiešavanie a centrifugácia rovnakým spôsobom, ako v predchádzajúcich krokoch.
5. Horná vodná fáza bola odpipetovaná do sterilnej mikroskúmavky, ku ktorej bol pridaný chloroform v pomere vzorka : chloroform = 1 : 1.

6. Nasledovalo premiešavanie a centrifugácia rovnakým spôsobom, ako v predchádzajúcich krokoch.
7. Horná vodná fáza bola odpipetovaná do sterilnej mikroskúmavky. Nasledujúce kroky popisujú zrážanie plazmidovej DNA, podľa postupu uvedenom v kapitole 8.9 Izolácia plazmidovej DNA – Midiprep.

### 8.11 Izolácia plazmidovej DNA-Mini prep

Súprava QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) od firmy QIAGEN bol využitý na izoláciu plazmidovej DNA *E. coli*.

Postup:

1. Bunky *E. coli* s požadovaným plazmidom boli kultivované v 5 ml LB média počas noci spôsobom ako je uvedené v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii.
2. Nočná kultúra bola ponechaná na ľade po dobu 15 minút.
3. Vychladené bunky boli centrifugované pri podmienkach 5 251xg, 10 min, 4 °C, supernatant bol vyliaty.
4. Pelet bol resuspendovaný v 250 µl pufre P1 a prepipetovaný do mikroskúmavky.
5. Následne bolo pridaných 250 µl pufra P2, obsah mikroskúmavky bol premiešaný preklápaním 4x.
6. Nasledovalo pridanie 350 µl pufra N3, obsah mikroskúmavky bol po pridaní okamžite premiešaný preklápaním 4x.
7. Mikroskúmavky boli centrifugované pri podmienkach 13 200xg, 10 min, 24°C.
8. Supernatant bol opatrne prepipetovaný na Spin Column, ktorá bola centrifugovaná pri podmienkach 13 200xg, 1 min, 24°C, tekutina, ktorá pretiekla cez Spin Column bola vyliata.
9. Na kolónu Spin Columns bolo pridaných 500 µl pufra PB a nasledovala centrifugácia pri podmienkach 13 200xg, 10 min, 24°C, tekutina, ktorá pretiekla cez Spin Column bola vyliata. *Tento krok je, nutný v prípade izolácie plazmidu z kmeňov kódujúcich endonukleázu endA<sup>+</sup> (napr. DE3, TGI).*
10. Následne bolo pridaných 750 µl pufra PE.
11. Centrifugácia pri podmienkach 13 200xg, 10 min, 24°C, pretečená tekutina bola vyliata a kolóna bola centrifugovaná pri rovnakých podmienkach, aby boli odstránené zbytky pufra PE.
12. Kolóna bola následne prenesená do 1,5ml mikroskúmavky, bolo pridaných 30 µl injekčnej vody.
13. Po dvoch minútach bola plazmidová DNA eluovaná do mikroskúmavky centrifugáciou pri podmienkach 13 200xg, 1 min, 24°C.

## 8.12 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) bola využitá na amplifikáciu určitých sekvencií DNA. Ako templát bola využitá chromozomálna DNA z *B. subtilis*. Použité primere sú uvádzané v kapitole Výsledky (Tabuľka 19, Tabuľka 20). V nižšie uvedených tabuľkách je rozpísaná reakčná zmes PCR (Tabuľka 5) a amplifikačný program PCR (Tabuľka 6).

**Tabuľka 5:** Reakčná zmes PCR.

Reakčná zmes	Objem [ $\mu$ l]
10x pufr s MgCl <sub>2</sub>	5
10mM dNTP (mix)	1
primer forward (100 pmol/ $\mu$ l)	1
primer reverse (100 pmol/ $\mu$ l)	1
templátová DNA (1 $\mu$ g)	1
Expand High Fidelity PCR System	0,75
iH <sub>2</sub> O (injekčná voda)	40,25

Namiešaná zmes bola premiešaná a následne vložená do cycleru T100 Thermal Cycler s nastaveným programom uvedeným v Tabuľke 5.

**Tabuľka 6:** Amplifikačný program PCR.

Počet cyklov	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas [s]
1x	95	120
1x	95	15
	56	30
	72	60
5x	95	15
	52	30
	72	60
24x	95	15
	48	30
	72	60

Správnosť reakcie PCR bola overená na horizontálnej agarózovej elektroforéze podľa postupu uvedeného v kapitole 8.14 Horizontálna agarózová elektroforéza.

### 8.13 Klonovanie pomocou PCR

Klonovanie pomocou PCR (PCR cloning, Unger et al. 2010) bolo využité na vytvorenie plazmidového konštruktu pET302 obsahujúceho Spo0A s histidínovou kotvou.

#### Postup:

1. Podľa Tabuľky 7 bola namiešaná reakčná zmes.

Mega primer (PCR produkt) bol pripravený postupom, uvedenom v kapitole 8.12 Polymerázová reťazová reakcia PCR. Použité primery v PCR sú uvedené v kapitole 9.1.2 Klonovanie a purifikácia faktoru Spo0A. Ako templátová DNA bol použitý plazmid pET302.

Tabuľka 7: Reakčná zmes PCR.

Reakčná zmes	Plazmid+inzert	Plazmid
	Objem [μl]	Objem [μl]
5x Phusion buffer HF	10	10
10 mM dNTP	1	1
100 ng Mega primer (PCR produkt)	2	-
20 ng templátová DNA (pET302)	4	4
Phusion polymerase	0,8	0,8
DMSO	1,5	1,5
iH <sub>2</sub> O	30,7	36

2. Namiešaná zmes bola premiešaná a následne vložená do cycleru T100 Thermal Cycler s nastaveným programom uvedeným v Tabuľke 8.

Tabuľka 8: Amplifikačný program PCR.

Počet cyklov	Teplota [°C]	Čas [s]
1x	98	30
30x	95	30
	52	60
	72	300
1x	72	420

3. Takto pripravený plazmid (z inzertom/bez inzertu) bol štiepený restriktívnou endonukleázou *DpnI* (1 μl) 3 hod, pri teplote 37°C. Inaktivácia prebiehala 20 min, pri teplote 80°C. Štiepený plazmid bez inzertu slúži ako negatívna kontrola.
4. Štiepený plazmid bol následne transformovaný do buniek *E. coli* podľa postupu uvedenom v kapitole 8.19 Transformácia *E. coli*.

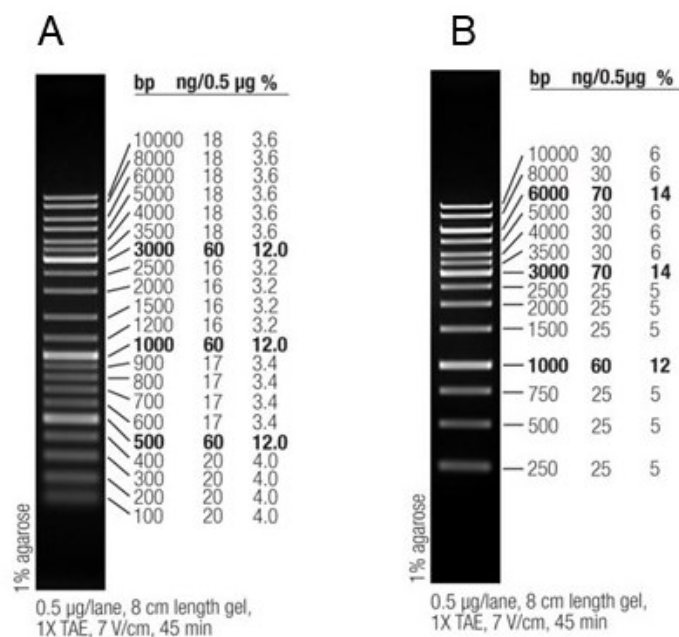
## 8.14 Horizontálna agarózová elektroforéza

Zloženie pufru:

50xTAE: 2M Tris-acetát, 50mM EDTA (pH 8,0)

Postup:

1. Bola poskladaná aparátúra OWL™ EASYCAST B1A.
2. 1% agarózový gél bol pripravený v Erlenmayerovej banke rozpustením 0,5 g agarózy v 50 ml pufru 1xTAE. Roztok bol ochladený a následne bolo pridaných 5 µl (riedenie 1:10 000) fluorescenčného farbiva nukleových kyselín Gel Red.
3. Roztok bol premiešaný a preliaty do pripravenej aparátúry. Do roztoku v aparátúre bol vložený hrebeň, čím boli po zatuhnutí gélu (približne 30 minút) vytvorené jamky, do ktorých boli nanášané vzorky.
4. Po zatuhnutí bol gél zaliaty pufrom 1xTAE, tak aby gél a elektródy aparátúry boli pod hladinou pufru. Z gélu bol následne vybratý hrebeň.
5. Na gél bol vždy nanášaný veľkostný marker. Používané markery: GeneRuler™ 1kbDNA ladder od firmy Thermo Scientific, GeneRuler DNA Ladder MIX od firmy Thermo Scientific (**Obr. 14**).



**Obrázok 14: Využívané DNA markery**

A) GeneRuler DNA Ladder MIX od firmy Thermo Scientific.

B) GeneRuler™ 1kb DNA ladder od firmy Thermo Scientific.

6. Vzorky nanášané na gél boli zmiešané so 6x Loading Dye od značky Biolabs v pomere 1:6.
7. Aparátúra bola pripojená na zdroj napätia POWER PAC 3000, na ktorom bolo nastavené napätie 5V/cm po dobu približne 60 minút.



## 8.15 Izolácia z gélu

Na izoláciu z gélu bola využívaná súprava QIAquick Gel Extraction kit od firmy QIAGEN.

Postup:

1. Na UV lampe bol skalpelom z gélu vyrezaný band nášho záujmu. Vyrezaný gél bol vložený do mikroskúmavky.
2. Gél bol odvážený na laboratórnej váhe EG 2200. Ku gélu bol pridaný pufr QG (3 násobné množstvo hmotnosti gélu – množstvo QG pufru odpovedalo v  $\mu\text{l}$  3x hmotnosti gélu v mg).
3. Gél bol následne rozpustený v  $50^{\circ}\text{C}$  (po dobu približne 10 minút), s 2 minútovými intervalmi premiešavania na vortexe.
4. Ku rozpustenému gélu bol pridaný izopropanol (množstvo izopropanolu  $\mu\text{l}$  v odpovedá hmotnosti gélu v mg). Roztok bol premiešaný preklápaním 4x.
5. Vzniknutá zmes bola prepipetovaná na kolónu QIAprep so silikagélou membránou a kolóna bola vložená do čistej mikroskúmavky.
6. Nasledovala centrifugácia pri podmienkach 17 900xg, 1 min,  $23^{\circ}\text{C}$  (tieto podmienky boli zachované v rámci celého postupu). Pretečená zmes cez membránu na kolóne bola odliata. Týmto spôsobom bol odstránený zbytok agarózy.
7. Na kolónu bolo nanesených 500  $\mu\text{l}$  pufru QG, kolóna bola centrifugovaná za rovnakých podmienok po dobu 1 min, pretečená tekutina bola vyliata.
8. Na kolónu bolo pridaných 750  $\mu\text{l}$  pufru PE, kolóna bola centrifugovaná za rovnakých podmienok po dobu 1 minúty, pretečená tekutina bola vyliata.
9. Kolóna bola opätovne centrifugovaná, čím bolo zabezpečené odstránenie zbytku pufru.
10. Kolóna bola prenesená do čistej mikroskúmavky a DNA bola eluovaná do 30  $\mu\text{l}$  injekčnej vody. Po pridaní  $\text{iH}_2\text{O}$  na kolónu, kolóna bola ponechaná v laboratórnej teplote po dobu 2-3 minút a následne bola centrifugovaná za rovnakých podmienok 1 minútu.

## 8.16 Štiepenie DNA

Izolované plazmidy (podľa postupu uvedenom v kapitole 8.9 Izolácia plazmidovej DNA-Midiprep/ 8.11 Izolácia plazmidovej DNA-Miniprep) a PCR produkty (Inzert) (podľa postupu uvedenom v kapitole 8.12 Polymerázová reťazová reakcia (PCR) boli štiepené restriktčnými endonukleázami (RE). Použité RE s príslušným pufrom sú zhrnuté v Tabuľke 9.

Postup:

1. Reakčná zmes bola namiešaná podľa Tabuľky 10, následne premiešaná a ponechaná 1 hod 30 min v 37°C.
2. RE boli inaktivované, tak ako je uvedené v Tabuľke 9.
3. Správnosť štiepenia bola overená na 1% agarózovom géle, podľa postupu uvedenom v kapitole 8.14 Horizontálna agarózová elektroforéza.

**Tabuľka 9:** Zoznam restriktčných endonukleáz a pufov.

Restriktčná endonukleáza (RE)	Pufor	Značka	Plazmid	Inaktivácia
<i>EcoRI</i> -HF <i>BamHI</i> -HF	rCutSmart	NEB	pDG1664	Pridanie EDTA, izolácia z gélu
<i>EcoRI</i> -HF <i>HindIII</i> -HF	NEBuffer 2.1r	NEB	p770	Pridanie EDTA, izolácia z gélu

**Tabuľka 10:** Reakčná zmes pre štiepenie plazmidov.

Zložka	Množstvo [μl]
DNA (1-2 μg)	
10x pufor	2
RE (A)	1
RE (B)	1
iH <sub>2</sub> O	
	celkový objem 20 μl

## 8.17 Defosforylácia plazmidu

Štiepené plazmidy restriktčnými endonukleázami boli defosforylované fosfatázou rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), ktorá defosforyluje 5' koniec DNA.

Enzým: rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) od značky NEB

Pufor: 10x rSAP pufor od značky NEB

Postup:

1. Reakčná zmes bola namiešaná podľa Tabuľky 11.
2. Zmes bola následne premiešaná a bola ponechaná 1 hod v 37°C.

3. Fosfatáza rSAP bola inaktivovaná inkubáciou 15 min v 65°C.

**Tabuľka 11:** Zloženie defosforylačnej zmesi.

Zložka	Množstvo [μl]
Plazmid (1 μg)	
10x rSAP pufor	1 μl
rSAP	1 μl
iH <sub>2</sub> O	
	celkový objem 10 μl

### 8.18 Ligácia

Do štiepených a defosforylovaných plazmidov boli vložené štiepené PCR inzerty ligačnou reakciou, vďaka čomu boli získané plazmidy s príslušným inzertom. Pomer plazmidu a inzertu bol 1:3 až 1:10.

Enzým: T4 DNA ligáza od značky Takara

Pufor: 10x T4 DNA ligačný pufor od značky Takara

Postup:

1. Ligačná zmes bola namiešaná podľa Tabuľky 12, premiešaná a ponechaná v 16°C v termobločku počas noci.
2. Následne bola vykonaná transformácia buniek do *E. coli* podľa postupu uvedenom v kapitole 8.19 Transformácia *E. coli*.

**Tabuľka 12:** Zloženie ligačnej zmesi.

Zložka	Množstvo [μl]
Plazmid (50ng-100ng)	
Inzert v pomere 1:3-10	
10x T4 DNA ligačný pufor	2
T4 DNA ligáza	1
iH <sub>2</sub> O	
ATP (10 mM)	2
	celkový objem 20 μl

### 8.19 Transformácia *E. coli*

Podľa Hanahan (1983) bola vykonaná transformácia buniek *E. coli* teplotným šokom. Využívané kompetentné bunky *E. coli*: DH5alpha, DE3 (BL21).

Postup:

1. Kompetentné bunky *E. coli* boli pripravené v laboratóriu. Kompetentné bunky *E. coli* uskladňované v  $-80^{\circ}\text{C}$  boli vybraté na ľad, na ktorom boli ponechané do úplného rozmrznutia.
2. Ku ligačnej zmesi/plazmidu bolo pridaných 100  $\mu\text{l}$  kompetentných buniek *E. coli*. Ako negatívna kontrola slúžila  $\text{iH}_2\text{O}$  spolu s kompetentnými bunkami *E. coli*. Bunky boli ponechané na ľade 20 min.
3. Bunky boli inkubované 90 sek. v  $42^{\circ}\text{C}$ , následne boli prenesené na ľad, na ktorom boli ponechané 3 minúty.
4. Ku bunkám bolo napipetovaných 800  $\mu\text{l}$  LB média bez antibiotika. Nasledovala kultivácia na trepačke v 120 rpm, 1 hod,  $37^{\circ}\text{C}$ .
5. Po kultivácii boli bunky centrifugované (6000xg, 1 min,  $24^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant bol vyliatí, tak aby v mikroskúmavke ostalo časť média, v ktorom boli bunky následne resuspendované.
6. Resuspendované bunky boli vysiate sterilnou hokejkou na misky s tuhým LB agarom s príslušným antibiotikom.
7. Vysiate bunky boli inkubované v termostate v  $37^{\circ}\text{C}$  cez noc.
8. Narastené bunky boli kvantifikované. Na miskách s negatívnou kontrolou nenarástli žiadne bunky.

### 8.20 Príprava kompetentných buniek *B. subtilis*

Touto metódou boli pripravené kompetentné bunky s genotypom PY79 *B. subtilis* KO RefZ (LK3129).

**Zloženie roztokov:**

Spizizenove soli 10x: 151 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 804 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 440 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 34 mM  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ; 8 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

SPI: 1x Spizizenove soli; 0,02% Kazamínové kyseliny; 0,10% yeast extract; 0,5% Aminokyseliny (fenylalanín, tryptofán); 0,5% glukóza

SPII: 1x Spizizenove soli; 0,045% Aminokyseliny (fenylalanín, tryptofán); 0,5mM  $\text{CaCl}_2$ ; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5% glukóza

Postup:

1. Bunky *B. subtilis* PY79 z glycerolovej konzervy (LK3129) boli naočkované do LB média na nočný rast, tak ako je popísané v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii.
2. Bunky boli z nočnej kultúry prenasadené na  $\text{OD}_{600} = 0,03$  do objemu 2x50 ml SPI média v dvoch 300 ml Erlenmayerových bankách.
3. Optická denzita bola meraná len u jednej z kultúr.
4. Po dosiahnutí stacionárnej fázy ( $\text{OD}_{600} = 1$ ) bolo 10 ml bunkovej kultúry, z banky, ktorá nebola meraná (aby nedošlo ku kontaminácii) prenasadených do 90 ml SPII.

5. Prenasadené bunky boli ponechané 90 minút pri 37°C na trepačke.
6. Bunková kultúra bola následne ponechaná na ľade po dobu 15 minút.
7. Bunky boli centrifugované 1 467xg, 5 min, 4°C.
8. Supernatant bol preliaty do sterilnej Erlenmayerovej banky. Bakteriálny pelet aj supernatant boli ponechané na ľade.
9. Do ďalšej sterilnej nádoby bolo odobratých 9 ml supernatantu, ku ktorému bol pridaný 1 ml glycerolu. Zmes bola dôkladne premiešaná.
10. V zmesi supernatantu s glycerolom bol resuspendovaný pelet.
11. Z resuspendovaných buniek boli vytvorené alikvóty o objeme 500 µl.

### **8.21 Transformácia *B. subtilis***

Podľa Dubnau a Davidoff-Abelson (1971) bola vykonaná transformácia buniek *B. subtilis*.

Postup:

1. Kompetentné bunky *B. subtilis* boli pripravené v laboratóriu.  
Kompetentné bunky *B. subtilis* uskladňované v -80°C boli rozmrazené v 37°C v termobločku do úplného rozmrazenia.
2. Ku plazmidu bolo napipetovaných 100 µl kompetentných buniek *B. subtilis*. Ako negatívna kontrola slúžila iH<sub>2</sub>O spolu so 100 µl kompetentných buniek *B. subtilis*.
3. Nasledovala kultivácia na trepačke v 120 rpm, 1 hod, 37°C.
4. Po kultivácii boli bunky vysiate sterilnou hokejkou na misky s tuhým LB agarom s príslušným antibiotikom.
5. Vysiate bunky boli inkubované v termostate v 37°C cez noc.
6. Narastené bunky boli kvantifikované. Na miskách s negatívnou kontrolou nenarástli žiadne bunky. Pokiaľ bol inzert vložený do plazmidu, boli bunky schopné rásť na LB agare s daným antibiotikom.

### **8.22 AmyE test**

Tento test je využívaný overenie správneho vloženia inzertu do miesta *amyE*. Vložením do tohto miesta nastáva rozrušenie génu *amyE*, ktorý kóduje α-amylázu a tým bunka stráca schopnosť štiepiť škrob (Bron et al. 1999).

Postup:

1. Najskôr boli pripravené misky s tuhým agarom s požadovaným antibiotikom.
2. Na misky bola rovnomerne naliata tenká vrstva (približne 5 ml) rozpusteného 1% agaru s 1% škrobom. Takto pripravené misky sa nechali zatuhnúť.
3. Na misky boli prečiarknuté požadované kolónie.
4. Baktérie boli kultivované v 37°C v termostate cez noc.

5. Druhý deň prebiehalo testovanie schopnosti štiepiť škrob pomocou jódových pár nasledujúcim postupom: do väčšej sklenenej Petriho misky boli nasypané kryštáliky jódu, na ne bola priložená miska s bunkami.
6. Na základe sublimácie jódových pár bolo médium s 1% škrobom zafarbené do fialova. Baktérie, ktoré boli schopné štiepiť škrob vytvárajú okolo seba „haló“ bez fialového zafarbenie. V takom prípade nenastalo vloženie inzertu do mieste *amyE*.

## 8.23 Práca s proteínmi

Metódou afinitnej chromatografie boli prostredníctvom agarózy Ni-NTA od firmy QIAGEN izolované proteíny, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú kotvu His-Tag, ktorá má vysokú afinitu ku niklovým iónom. Takýmto spôsobom boli izolované  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ , jadro RNAP z *B. subtilis* a transkripčný faktor Spo0A.

### 8.23.1 Indukcia expresie proteínu

Zloženie pufra:

Pufor P: 300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5% glycerol, 3 mM  $\beta$ -mercaptoetanol

Postup:

1. Bunky *E. coli* DE3 (BL21) z glycerolovej konzervy boli naočkované do LB média, tak ako je popísané v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii. Tieto bunky obsahovali plazmid s vloženým génom, ktorý kodoval požadovaný proteín na izoláciu.
2. Bunky z nočného rastu boli prenasadené do čerstvého LB média na OD<sub>600</sub> = 0,03.
3. Po dosiahnutí požadovaného OD<sub>600</sub> ((OD<sub>600</sub> ( $\sigma^F/\sigma^G$ ) = 0,6-0,8; OD<sub>600</sub> (Spo0A) = 0,8)) bola kultúra prenesená do laboratórnej teploty, kde bola indukovaná expresia proteínu pridaním IPTG ( $\sigma^F/\sigma^G$  0,8 mM IPTG, Spo0A 0,3 mM IPTG). V prípade RNAP po dosiahnutí požadovaného OD<sub>600</sub> ((OD<sub>600</sub> = 1)) neprebíhala indukcia IPTG, ale kultúra bola schladená 20 minút na ľade.
4. Kultúra bola indukovaná na trepačke v laboratórnej teplote 3 hodiny ( $\sigma^F/\sigma^G$ ) a 4 hodiny (Spo0A).
5. Kultúra bola následne chladená 20 minút na ľade.
6. Bunky ochladenej kultúry boli centrifugované pri podmienkach 6000xg, 10 min, 4°C.
7. Supernatant bol odstránený, pelet bol resuspendovaný v 40 ml pufra P a následne prepipetovaný do sterilnej 50ml Falconovej skúmavky.
8. Následne prebiehala centrifugácia 5 251xg, 15 min, 4°C. Supernatant bol odstránený.
9. Pelet bol uschovaný do -80°C.

### 8.23.2 Izolácia proteínu metódou afinitnej chromatografie

Zloženie pufra:

Pufor P: 300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5% glycerol, 3 mM β-mercaptoetanol

Postup:

1. Pelety uchované v -80°C boli vybraté na ľad, kde boli ponechané do úplného rozmrazenia. Po rozmrazení boli pelety resuspendované v 15 ml pufra P (s 1 mM PMSF).
2. Na rozbitie buniek bol využívaný ultrazvukový sonikátor. Vzorky boli sonikované na ľade 15 x 10 sek s 1 minútovým intervalom (bunky *E. coli*), 20 x 10 sek s 1 min intervalom (bunky *B. subtilis*)
3. Zosonikované bunky boli centrifugované pri podmienkach 27 000xg, 10 min, 4°C. Supernatant bol opatrne preliaty do čistej 50ml Falconovej skúmavky, tak aby nedošlo ku uvoľneniu peletu.
4. Agaróza Ni-NTA od firmy QIAGEN (1 ml) bola 2x premytá 12,5 ml pufrom P centrifugáciou pri podmienkach 2 000xg, 3 min, 4°C.
5. Ku takto premytej agaróze Ni-NTA bol pridaný supernatant s proteínom. Zmes bola ponechaná v ľade vo vodorovnej polohe na trepačke pri podmienkach 110 RPM, 1 hodinu.
6. Na kolónu afinitnej chromatografie bola pripojená 5 cm dlhá silikónová hadička, ktorá zabezpečovala rýchlejší prietok kolónou. Takto pripravená kolóna bola vložená na 50ml Erlenmayerovej banky, kolóna bola premytá 10 ml pufrom P a následne bola vložená do chladničky. Týmto spôsobom bola zabezpečená ekvilibrácia.
7. Na preekvilibrovanú kolónu bola preliata zmes agarózy Ni-NTA so supernatantom a supernatant sa nechal pretiecť.
8. Kolóna bola premytá 30 ml pufra P.
9. Následne bola kolóna premytá 30 ml pufra P s 30mM imidazolom.
10. Po premytí bola silikónová hadičky odstránená. Kolóna bola vložená do mikroskúmavky.
11. Nasledovalo eluovanie piatich frakcii pufrom P s 400mM imidazolom. Každá frakcia bola eluovaná 500 µl do čistej mikroskúmavky.
12. Frakcie boli analyzované na géle SDS-PAGE.

### 8.23.3 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

SDS polyakrylamidová elektroforéza bola využitá na overenie veľkosti proteínov, čistoty a účinnosti postupov v súvislosti s prácou s proteínmi. V rámci tejto techniky je využívané denaturačné činidlo SDS (sódium dodecyl sulfát), ktoré určuje proteínom jednotný negatívny náboj, vďaka čomu je možná separácia proteínov v polyakrylamidovom géli (boli využívané komerčné predpripravené NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris gély od firmy ThermoFisher Scientific) podľa ich veľkosti.

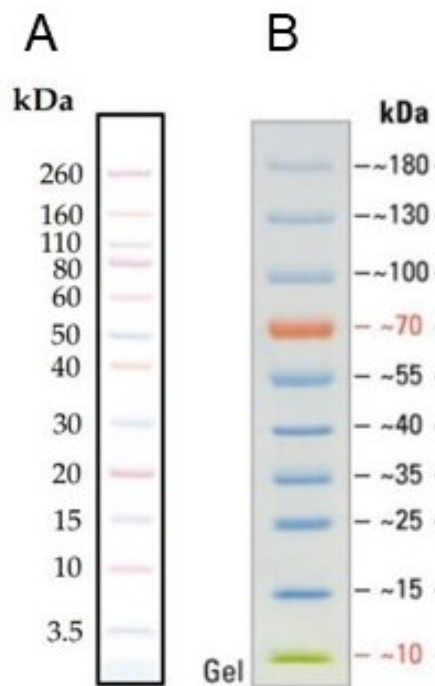
Zloženie roztokov:

Pufor 4 x SDS: 500 mM Tris-HCl (pH 8); 40 % glycerol; 0,4 % SDS; 0,2 % brómfenolová modrá; 8 % β-mercaptoetanol.

Pufor NuPAGE MESS SDS (Invitrogen): 1000 mM MES; 1000 mM základ Tris (pH 7,3); 2 % SDS, 20 mM EDTA.

Postup:

1. Bola použitá Aparatúra XCELL SURELOCK™ MINI CELL. Do aparatúry bol vložený predpripravený NuPAGE® Novex 4–12% Bis–Tris gél.
2. Gél v aparatúre bol zaliaty pufrom 1× NuPAGE® MES SDS Running buffer.
3. Vzorky boli zmiešané s pufrom 4xSDS, vložené do termostatu THERMOSTAT 5320 na 5 min pri 95°C.
4. Takto pripravené vzorky boli nanesené na gél. Ako proteínový marker bol použitý Novex™ Sharp Pre-Stained, Protein standards od firmy Invitrogen, PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa od firmy Thermo Scientific™ (**Obr. 15**).



**Obrázok 15: Využívané proteínové marke.**

**A)** Novex™ Sharp Pre-Stained, Protein standards od firmy Invitrogen,

**B)** PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa od firmy Thermo Scientific™.

5. Aparatúra bola pripojená na zdroj napätia POWER PAC 3000 pri podmienkach 200 V, 35 min.
6. Aparatúra bola rozobratá, gél bol vložený do krabíčky, kde bol farbený pomocou SimplyBlue™ SafeStain.



#### 8.23.4 Farbenie pomocou SimplyBlue™ SafeStain

Postup:

1. Gél SDS-PAGE bol vložený do plastovej krabičky a zaliaty 100 ml dH<sub>2</sub>O. Krabička s gélom bola vložená do mikrovlnnej rúry a gél bol zahrievaný 1 minútu.
2. Následne bol položený na kývačku na 1 minútu.
3. Voda bola odstránená. Premytie takýmto spôsobom bolo vykonané ešte 2x.
4. Po premytí, bolo ku gélu pridaných 15 ml farbiva SimplyBlue™ SafeStain. Gél bol zahrievaný 45 sek v mikrovlnnej rúre.
5. Gél bol umiestnený na 5 minút na kývačku.
6. Farbivo bolo odstránené, ku gélu bolo pridaných 100 ml dH<sub>2</sub>O. Gél s vodou bol opäť položený na kývačku, na ktorej bol ponechaný 10 minút. Takéto odfarbovanie bolo opakované, pokiaľ nebolo dosiahnuté požadované odfarbenie.

#### 8.23.5 Dialýza

Dialyzačná metóda umožňuje prostredníctvom dialyzačnej kazetky (Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette od firmy Thermo Scientific) previest' proteín v jednom pufre do druhého podľa potreby.

Zloženie dialyzačných pufrov:

Dialyzačný (storage) pufor: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 50% glycerol, 3 mM β-mercaptoetanol.

Pufor TEV: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 5% glycerol.

Premývací pufor (Spo0A): 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 2 mM ME, 5% glycerol.

Postup:

1. Dialyzačná kazetka s požadovaným objemom a veľkosťou pórov bola vložená do penového plaváku. V tomto plaváku bola namočená na 2 minúty do dialyzačného pufru.
2. Pomocou injekčnej striekačky bola proteínová vzorky nanosená do kazetky, tak aby v kazetke nezostal vzduch po jej nanosení.
3. Kazetka so vzorkou bola umiestnená do penového plaváku a ponorená do 500 ml dialyzačného pufru. Na dno pufru bolo ponorené magnetické miešadlo, ktoré na zabezpečilo premiešavanie pufru.
4. Dialýza prebiehala cez noc. Ďalší deň bol dialyzačný pufor vymenený za čerstvý (500 ml) a dialýza prebiehala ďalšie 4 hodiny.
5. Pomocou injekčnej striekačky bol proteín z kazetky odsatý. Po dialýze proteínu do požadovaného pufru, bol proteín uschovaný do 4°C, v prípade storage pufru do -20°C.
6. Čistota proteínu bola analyzovaná na SDS-PAGE géle, koncentrácia bola určená postupom, ktorý je uvedený v kapitole Meranie koncentrácie proteínu.

### 8.23.6 Meranie koncentrácie proteínu

Koncentrácia proteínov bola určená pomocou Bradfordovej metódy (Bradford 1976) a pomocou Qubit merania.

#### 8.23.6.1 Bradfordova metóda

Zloženie Bradfordovho činidla: Comossie Brilliant Blue G-250 (100mg) v 50 ml etanolu, 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100 ml) a doplnené do 1 l dH<sub>2</sub>O.

Postup:

1. Na vytvorenie kalibračnej krivky bolo použité BSA (hovädzie sérum albumín) so zásobnou koncentráciou 400 ng/μl, ktoré bolo použité ako štandard. Štandardy boli pripravené podľa Tabuľky 13.

**Tabuľka 13:** Zloženie štandardov kalibračnej krivky.

Štandard	BSA [μl]	BSA [μg]	iH <sub>2</sub> O [μl]	Bradfordové činidlo [μl]
1	5	2	95	900
2	10	4	90	900
3	15	6	85	900
4	20	8	80	900
5	25	10	75	900

2. Vzorky na meranie koncentrácie boli pripravené podľa nasledujúcej Tabuľky 14.

**Tabuľka 14:** Zloženie meraných vzoriek.

Vzorka [μl]	iH <sub>2</sub> O [μl]	Bradfordové činidlo [μl]
2	98	900
4	96	900

3. Vzorky boli premiešané a 5 min inkubované pri izbovej teplote.
4. Na spektrofotometri bolo odmeraná optická densita (OD) štandardov a vzoriek pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .
5. Na základe OD<sub>595</sub> štandardov bola zostrojená kalibračná krivka s rovnicou. Podľa tejto rovnice a OD<sub>595</sub> vzoriek bola vypočítaná koncentrácia proteínových vzoriek.

#### 8.23.6.2 Qubit meranie

Na odmeranie koncentrácie pomocou metódy Qubit bol využitý komerčný Qubit™ Protein Assay Kit od firmy ThermoFisher Scientific. Toto meranie umožňuje presnejšie meranie koncentrácie vzorky s nižším šumom, vďaka fluorescenčnému farbivu, ktoré selektívne viaže svoj cieľový proteín, DNA alebo RNA.

Postup:

1. Najskôr bol pripravený Working solution pre všetky vzorky (na vzorku = 199  $\mu$ l Buffer + 1  $\mu$ l reagent).
2. Boli namiešané 3 štandardy (190  $\mu$ l Working solution + 10  $\mu$ l štandard), ktoré slúžili na vytvorenie kalibračnej krivky.
3. Proteínová vzorka (2  $\mu$ l) bola zmiešaná s Working solution (198  $\mu$ l) a 15 min inkubovaná v izbovej teplote.
4. Proteínová vzorka bola odmeraná na zariadení 3 fluorometer.

## 8.24 Imunoprecipitácia

Imunoprecipitačná metóda slúži na izoláciu proteínových komplexov pomocou protilátky, ktorá sa špecificky viaže na daný proteín. Proteínový komplex je následne z protilátky eluovaný.

Zloženie pufru:

Lyzačný pufr: 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

Postup:

1. Bunky *B. subtilis* z glycerolovej konzervy boli naočkované na nočný rast do LB média, tak ako je popísané v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii. Tieto bunky obsahovali gén kódujúci požadovaný proteín s obsahujúcim 3xFLAG peptidom na C-konci.
2. Bunky z nočného rastu boli prenasadené do DSM média na OD<sub>600</sub> = 0,1. Predtým boli do DSM média pridané aditíva.
3. Od prenasadenia bola kultúra ponechaná na trepačke pri podmienkach 150 RPM, 6 hod, 37°C.
4. Po 6 hodinách kultivácie bolo z kultúry odobratých 20 ml do sterilnej 50ml Falconovej skúmavky. Bakteriálna kultúra bola následne centrifugovaná pri podmienkach 5 251xg, 10 min, 4°C.
5. Supernatant bol zliaty a pelet bol uschovaný do -80°C do ďalšieho spracovania.
6. V nasledujúcich krokoch je popísaná príprava bakteriálneho lyzátu. Bunky boli z -80°C vybraté a ponechané na ľade do úplného rozmrznutia.
7. Rozmrazené bunky boli resuspendované v 4 ml lyzačného pufru s pridanými aditívami (1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, Proteín inhibitor kokteil 5  $\mu$ l/ml pufru).
8. Na rozbitie buniek bol využívaný ultrazvukový sonikátor. Sonikácia buniek prebiehala na ľade 20 x 10 sek s 1 minútovým intervalom.
9. Bunky boli centrifugované pri podmienkach 4 000xg, 10 min, 4°C. Supernatant bol následne preliaty do sterilných 5ml eppendorfových skúmaviek.
10. Koncentrácia proteínov v supernatante bola odmeraná postupom popísaným v kapitole Meranie koncentrácie proteínov – Bradfordová metóda.
11. Do 2ml mikroskúmaviek (Costar® Low Binding Snap Cap Microcentrifuge Tube) bolo odpipetovaných 1,5 ml supernatantu.

12. V nasledujúcich krokoch je popísaná príprava afinitného gélu M2 (SIGMA-ALDRICH). Afinitný gél M2 (35  $\mu$ l) bol prepláchnutý lyzačným pufrom (1 ml) a centrifugovaný 60 sek na stolnej centrifúge.
13. Po centrifugácii bol odpipetovaný supernatant, tak aby nad afinitným gélom M2 ostalo malé množstvo lyzačného pufru. To zabezpečilo lepšiu manipuláciu s gélom M2.
14. Takto premytý gél M2 (35  $\mu$ l) boli pridané ku 1,5 ml supernatantu.
15. Zmes supernatantu a gélu M2 bola ponechaná cez noc na rotátore v 4°C.
16. Nasledujúci deň boli vzorky stočené na stolnej centrifúge 60 sek. Supernatant bol následne odpipetovaný.
17. Afinitný gél M2 bol premytý 500  $\mu$ l lyzačného pufru, stočené 60 sek na stolnej centrifúge a následne bol odpipetovaný supernatant. Takýmto spôsobom bol afinitný gél M2 premytý ešte 3x pričom po druhom premytí boli prepipetované do čistej mikrocentrifugačnej skúmavky (Costar® Low Binding Snap Cap Microcentrifuge Tube) .
18. V nasledujúcich krokoch je popísaná elúcia požadovaného proteínu peptidom 3xFLAG od značky SIGMA-ALDRICH. Bol pripravený elučný roztok zmiešaním TBS (150 ng/ml) a peptidu 3xFLAG (5  $\mu$ g/ $\mu$ l).
19. Ku afinitnému gélu M2 bolo pridaných 60  $\mu$ l elučného roztoku.
20. Vzorky boli inkubované 3 hod 30 min na rotátore v 4°C.
21. Vzorky boli napokon centrifugované pri podmienkach 5000xg, 1 min, 4°C.
22. Následne bol opatrne odobratý supernatant od afinitného gélu M2 do čistej mikrocentrifugačnej skúmavky.
23. Vzorky boli analyzované na géle SDS-PAGE.

## 8.25 Transkripcia *in vitro*

Transkripcia *in vitro* (Sudzinová et al. 2021) bola vykonaná na plno dĺžkovom promotore génu *refZ* vloženom do plazmidu p770. V rámci tejto promotorovej sekvencie sa v proti smere transkripcie od *refZ* nachádza predpokladaný konsenzus sekvencie pre faktor  $\sigma^H$ , faktory  $\sigma^F/\sigma^G$  a väzbové miesta pre Spo0A. Nákres celej promotorovej oblasti je uvedený v kapitole 9.1.1 Príprava templátu pre transkripcie *in vitro* (**Obr. 11**).

Zloženie roztokov:

Dilučný pufo: 50% glycerol, 100 mM NaCl, 50 mM Tris–HCl (pH 8)

Transkripčný pufo (1x koncentrovaný): 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 40 mM Tris–HCl (pH 8)

STOP pufo: 0,05% brómfenolová modrá, 95% formamid, 0,05% xylene cyanol, 20 mM EDTA (pH 8)

Postup:

### 1. Rekonštitúcia RNAP s konkrétnym faktorom $\sigma$ :

Jadro RNAP bolo rekonštituované so  $\sigma^H/\sigma^F/\sigma^G$  /dilučným pufo v 37°C po dobu 30 min. Konečná koncentrácia rekonštituovaných proteínov bola: RNAP 300 nM;  $\sigma^H$  3000 nM; finálne koncentrácie faktorov  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  v riediacich radách sú zhrnuté v Tabuľke 15 a Tabuľke 16. Finálna koncentrácia  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  bola 6000 nM v transkripčných reakciách s faktorom Spo0A. Finálna koncentrácia RNAP v transkripciách bola 30 nM.

**Tabuľka 15:** Riediaci rada faktoru  $\sigma^F$ .

Riediaci rada $\sigma^F$					
Pomer RNAP: $\sigma^F$	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80
Zásobná koncentrácia (nM)	3000	6000	12000	24000	48000
Finálna koncentrácia v transkripcii (nM)	150	300	600	1200	2400
$\sigma^F$ ( $\mu$ l) o koncentracii 48 000 nM	5	5	5	5	10
Dilučný pufo ( $\mu$ l)	5	5	5	5	0

**Tabuľka 16:** Riediaci rada faktoru  $\sigma^G$ .

Riediaci rada $\sigma^G$					
Pomer RNAP: $\sigma^G$	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80
Koncentrácia zásobná (nM)	3000	6000	12000	24000	48000
Finálna koncentrácia v transkripcii (nM)	150	300	600	1200	2400
$\sigma^G$ ( $\mu$ l) o o koncentracii 48 000 nM	5	5	5	5	10
Dilučný pufo ( $\mu$ l)	5	5	5	5	0

### 2. Master mix bol pripravený podľa Tabuľky 17

**Tabuľka 17:** Zloženie master mixu na jednu reakciu.

Zloženie	Objem [ $\mu$ l]
20x pufor	0,45
20 mM ATP (200 $\mu$ M konečná koncentrácia)	0,1
20 mM CTP (200 $\mu$ M konečná koncentrácia)	0,1
20 mM GTP (200 $\mu$ M konečná koncentrácia)	0,1
1 mM UTP (10 $\mu$ M konečná koncentrácia)	0,1
$\alpha^{32}$ P UTP	0,2
plazmid 100 ng/ $\mu$ l	1
iH <sub>2</sub> O	6,55
100xBSA	0,1
KCl (1M zásobný; 30 mM konečná koncentrácia)	0,3
	celkový objem 9 $\mu$ l

Prípravený master mix (pre požadovaný počet reakcií) bol prepipetovaný do čistých mikrocentrifugačných skúmaviek po 9  $\mu$ l v prípade titrácie  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$ . V prípade transkripcií so Spo0A bol master mix rozpipetovaný po 8  $\mu$ l do mikrocentrifugačných skúmaviek, ktoré už obsahovali 1  $\mu$ l Spo0A/dilučného pufru. Riediaci rada Spo0A bola pripravená podľa Tabuľky 18. V oboch prípadoch následne prebiehala inkubácia 5 minút v 37°C. Transkripcia *in vitro* bola iniciovaná 1  $\mu$ l rekonstituovanej RNAP (finálna koncentrácia v transkripcii 30 nM). Samotná transkripcia prebiehala 15 min v 37°C, po 15 minútach bola okamžite zastavená pridaním 10  $\mu$ l STOP pufrom, následným vortexovaním a umiestnením na ľad. Vzorky boli následne nanosené na 7% polyakrylamidový gél, ktorý bol pripravený podľa postupu v kapitole 8.24.1 Vertikálna PAA elektroforéza.

**Tabuľka 18:** Riediaci rada Spo0A.

Riediaci rada Spo0A						
Pomer RNAP:Spo0A	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
Zásobná koncentrácia (nM)	300	600	1200	2400	4800	9600
Finálna koncentrácia v transkripcii (nM)	30	60	120	240	480	960
Spo0A ( $\mu$ l) o koncentrácii 9600 nM	5	5	5	5	5	10
Dilučný pufor ( $\mu$ l)	5	5	5	5	5	0

### 8.25.1 Vertikálna PAA elektroforéza

Zloženie pufra:

Pufor 10 × TBE: 0,9 M Tris–HCl (pH 8,0); 0,02 M EDTA; 0,9 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Postup:

1. Bola zostavená elektroforetická aparátúra (OWL™ P10DS DUAL).
2. Medzi dve sklá aparátúry boli na kraj vložené 1mm hrubé medzerníky (spacers). Takto zložené sklá boli zafixované svorkami.
3. Spodná časť skiel bola dôkladne zalepená elektrikárskou páskou, tak aby bolo vytvorené tesnenie.
4. Medzi takto pripravené sklá bol naliaty PAA gél (30 ml 7% PAA, 300 µl 10% APS, 30 µl TEMED).
5. Medzi sklá do gélu bol vložený hrebeň, ktorým boli po zatuhnutí gélu (približne 2 hodiny) vytvorené jamky pre nanášanie vzoriek.
6. Po zatuhnutí gélu bol zo spodnej časti skiel odstránená istiacia páska a sklá s gélom boli vložené do aparátúry.
7. Do aparátúry bol naliatý 1 x TBE, bol vybratý hrebeň, vzniknuté jamky boli prepláchnuté 1 x TBE pufrom pomocou automatickej pipety.
8. Na gél bolo nanesených 10 µl vzoriek, ktoré boli získané metódou transkripcie *in vitro*.
9. Aparátúra bola pripojená na zdroj napätia, elektroforéza prebiehala pri podmienkach 175V 2 hodiny.
10. Aparátúra bola rozobratá, sklá oddelené od seba, gél bol prenesený na filtračný papier a bol prekrytý fóliou, následne bol vložený na vákuovú sušičku (MIDIDRY D62) na 2 hodiny. Počas prvej hodiny prebiehalo sušenie pri 80°C, v rámci druhej hodiny prebiehalo chladnutie.
11. Gél bol následne vložený do kazety BAS-MS2040, v ktorej bol ponechaný s citlivou doskou počas noci.
12. Citlivá doska bola druhý deň skenovaná na skeneri Amersham™ Typhoon (GE Healthcare).
13. Výsledný sken bol analyzovaný v programe Bio-RAD Quantity One.

### 8.26 Štruktúrovaná iluminačná mikroskopia (SIM)

SIM patrí medzi super-rezolučnú mikroskopiu. Rozlíšenie fotografií získaných touto mikroskopiu je okolo 100 nm. V našom prípade bolo využité GFP značenie cieľového proteínu RefZ. Pre označenie membrán bolo využité červené lipofilné fluorescenčné farbivo Nile Red. Proteíny značené GFP boli vizualizované pri excitečnej vlnovej dĺžke 488 nm, Nile Red pri excitačnej vlnovej dĺžke 568 nm. Vzorky boli pozorované pomocou mikroskopu Delta vision OMX™.

#### 8.26.1 Príprava mikroskopického preparátu

Kultivácia buniek:

1. Bunky *B. subtilis* PY79 (LK2813, LK3503, LK3379, LK3814) z glycerolovej konzervy boli naočkované na nočný rast do LB média, tak ako je popísané v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii.

2. Bunky z nočného rastu boli prenasadené do 10 ml DSM média na  $OD_{600} = 0,1$ . Predtým boli do 10 ml DSM média pridané aditíva podľa postupu uvedenom v kapitole 8.5 Kultivácia baktérií.
3. Od prenasadenia bola kultúra ponechaná na trepačke pri podmienkach 150 RPM, 6 hod, 37°C.
4. Po 6 hodinách kultivácie bolo z kultúry odobratých 995  $\mu$ l do čistej mikroskúmavky. Ku bunkám bol pridaný NileRed o konečnej koncentrácii 5  $\mu$ g/ml.
5. Takto pripravené bunky boli ponechané 7 minút v tme a následne boli centrifugované pri podmienkach 6000xg, 3 min, 24°C.
6. Po centrifugácii bol odpipetovaný supernatant, pelet bol resuspendovaný v 300  $\mu$ l 1xPBS. Takto pripravené bunky boli využité na prípravu mikroskopického preparátu podľa postupu nižšie.

Príprava preparátu:

1. 1,5% agar bol pripravený v 50ml Falconovej skúmavke rozpustením 0,15 g agarózy v 10 ml 1xPBS.
2. Približne 7 ml rozohriateho agaru bolo naliatych do sterilnej Petriho misky.
3. Krúživý pohyb miskou zabezpečil rovnomerné množstvo agaru po celom dne misky. Týmto spôsobom bola docielená približne 1,5mm hrúbka agaru.
4. Úplné zatuhnutie agaru trvalo približne 15 min.
5. Zatumnutý agar bol sterilným skalpelom narezaný na štvorčeky o veľkosti približne 0,8x0,8 mm
6. Na podložné sklíčko o veľkosti 18x18 mm bol nanosený 1  $\mu$ l premytých buniek v 300  $\mu$ l 1xPBS (postup prípravy buniek je popísaný v kapitole Mikroskopia), na ktoré bol následne priložený nazeraný agarózový štvorček.
7. Na takto pripravený preparát bol kvapnutý imerzný olej s indexom lomu 1,516.

## 8.27 TECAN

Týmto prístupom bola meraná súčasne rastová krivka a intenzita fluorescenčného signálu bakteriálnych kultúr v mikrotitračnej doštičke nepretržite podľa požadovanej doby. Vzorky boli merané na Tecan Spark 10M - Multimode Plate Reader.

**Nastavenie:** Teplota: 37°C; Meranie každých 30 minút, orbitálne trepanie(216 rpm).

**Režim:** Absorbancia; Meraná vlnová dĺžka [nm]: 600

**Režim:** Meranie fluorescencie; Excitačná vlnová dĺžka [nm]: 485 ; Emisná vlnová dĺžka [nm]: 535

Postup:

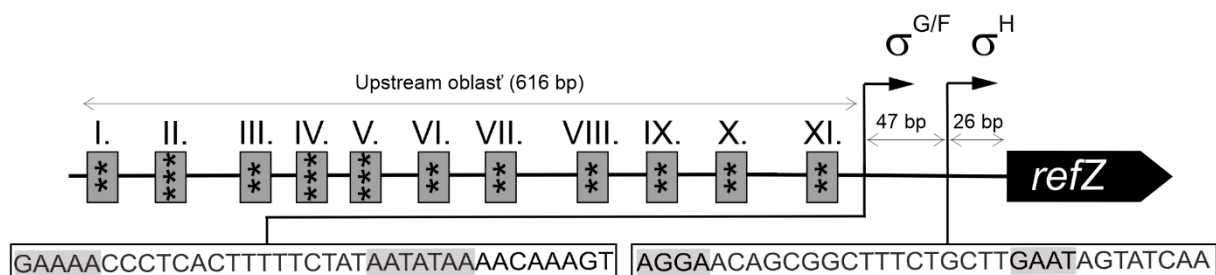
1. Bunky *B. subtilis* PY79 (LK2813, LK3503, LK3379, LK3814) z glycerolovej konzervy boli naočkované na nočný rast do LB média, tak ako je popísané v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii.
2. Bunky z nočného rastu boli prenasadené do mikrotitračnej doštičky do 200  $\mu$ l DSM média na  $OD_{600} = 0,05$ . Predtým boli do DSM média pridané aditíva podľa postupu uvedenom v kapitole 8.5 Kultivácia baktérii.



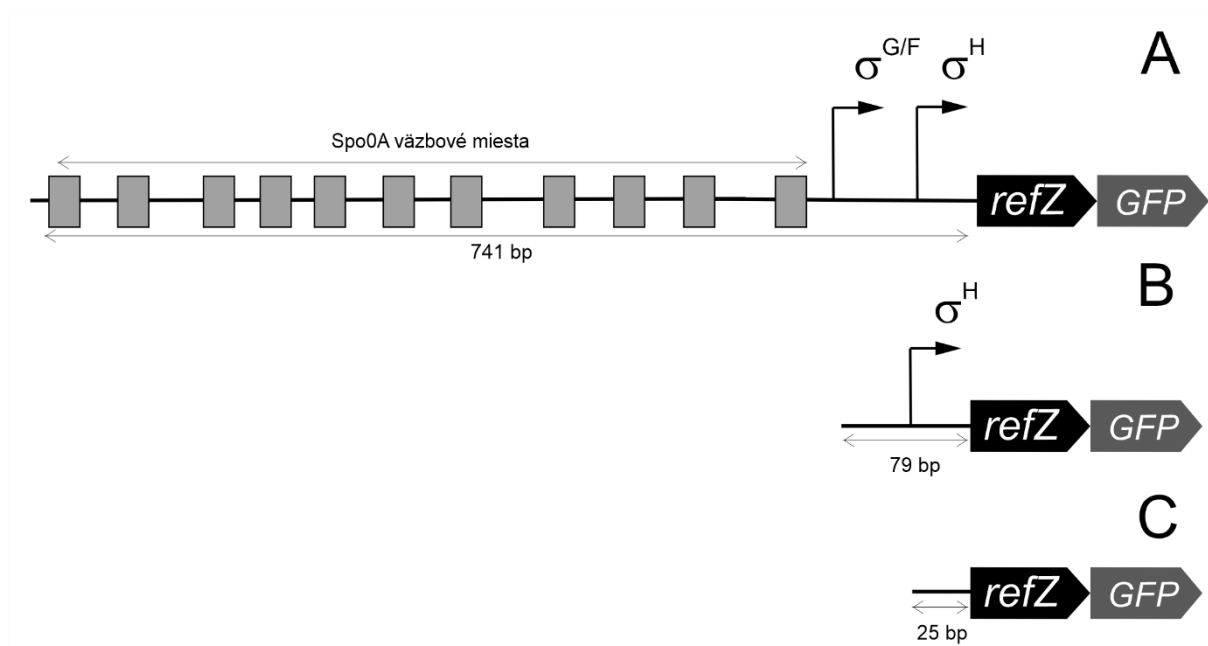
- 
- 
3. Takto pripravený preparát bol vložený do meracieho zariadenia TECAN. Meranie prebiehalo 24 hodín, pri 37°C.

## 9 Výsledky

Tejto práci predchádzala bio-informatická analýza vykonaná Ing. Marekom Schwarzom, PhD z Laboratória bio-informatiky Mikrobiologického ústavu, AV ČR. Touto analýzou boli identifikované dve promótorové oblasti a 12 Spo0A väzbových miest v rámci *upstream* sekvencie o dĺžke 800 bp od génu *refZ*. Sekvencia na ktorej bola vykonaná analýza s identifikovanými promótorovými oblasťami a Spo0A väzbovými miestami je uvedená v kapitole 13 Prílohy (**Obr. S1**). V rámci tejto sekvencie bola identifikovaná promótorová oblasť s konsenzom sekvencie pre faktor  $\sigma^H$ . Tento výsledok je konzistentný s výsledkom od autorov Britton et al. (2002). Vo vzdialenosti 47 bp v proti smere transkripcie od identifikovaného promótoru závislého na  $\sigma^H$  bol identifikovaný nový, doposiaľ neznámy promótor závislý na  $\sigma^{F/G}$ . Za promótorom závislým na  $\sigma^{F/G}$  v protismere transkripcie v 616 bp dlhej sekvencii bolo identifikovaných 12 väzbových miest pre Spo0A. Sekvencie identifikovaných promótorových oblastí a Spo0A väzbových miest sú uvedené v kapitole 13 Prílohy (**Tab.S1-2; Obr. S2**). Schéma celej promótorovej oblasti s identifikovanými promótorami a Spo0A väzbovými miestami bola zostavená na základe výsledkov bio-informatickej analýzy (**Obr. 16**). Informácie získané touto analýzou slúžili na prípravu konštruktov využívaných v experimentálnych systémoch *in vitro* (**Obr. 16**) a *in vivo* (**Obr. 17**). Ich príprava bude popisovaná v kapitole 9.1.1 Príprava templátu pre transkripcie *in vitro*, 9.3.1 Klonovanie kmeňov s GFP značeným génom *refZ*.



**Obrázok 16: Schéma promótorovej oblasti génu *refZ*.** Schematické znázornenie promótorovej oblasti génu *refZ*. Vo vzdialenosti 26 bp v proti smere transkripcie od génu *refZ* (čierna šípka, prvá z pravej strany) sa nachádza promótor závislý na  $\sigma^H$ , bleďo šedou farbou je zvýraznená predpokladaná  $-10$  (GAAT) a  $-35$  (AGGA) konsenzus sekvencia, predpokladaná dĺžka medzerníka je 17 bp. Iniciačný nukleotid +1 nie je identifikovaný. Vo vzdialenosti 47 bp v proti smere transkripcie je umiestnený promótor závislý na  $\sigma^{F/G}$ , bleďo šedou farbou je zvýraznená predpokladaná  $-10$  (AATATAA) a  $-35$  (GAAA) konsenzus sekvencia, predpokladaná dĺžka medzerníka je 16 bp. Iniciačný nukleotid +1 nie je identifikovaný. Šedé obdĺžniky v rámci 616 bp dlhej oblasti znázorňujú väzbové miesta Spo0A, ktoré sú označené rímskymi číslicami. Hviezdičky odpovedajú *p*-hodnote.



**Obrázok 17: Znáozornenie konštruktov klonovaných do plazmidu pDG1664.** Tmavo šedá šípka znázorňuje gén kódujúci GFP, čierna šípka znázorňuje gén kódujúci RefZ.

A) Konštrukt s plno dĺžkovou promótorovou oblasťou obsahujúcou promótorov závislé na faktoroch  $\sigma^H$ ,  $\sigma^{F/G}$  a väzbové miesta Spo0A (šedé obdĺžniky).

B) Konštrukt so  $\sigma^H$  závislým promótorom.

C) Znáozornenie konštrukt bez promótoru, sekvencia obsahuje len oblasť Shine Dalgarno.

## 9.1 Promótorova aktivita *in vitro*

Pre samotné transkripčné experimenty *in vitro* bolo najskôr potrebné pripraviť nevyhnutné nástroje. Ich príprava je popisovaná v nasledujúcich kapitolách: 9.1.1 Príprava templátu pre transkripcie *in vitro*, 9.1.2 Klonovanie a purifikácia faktoru Spo0A, 9.1.3 Purifikácia proteínov ( $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ , RNAP) využívaných v transkripciách *in vitro*. Detailné technické údaje sú uvedené v kapitole 8 Materiály a metódy.

### 9.1.1 Príprava templátu pre transkripcie *in vitro*

Na vytvorenie plno dĺžkovej promótorovej oblasti génu *refZ* boli využité poznatky z bioinformatickej analýzy. Plno dĺžková promótorova oblasť génu *refZ* (Obr. 16) bola klonovaná do plazmidu p770.

Plno dĺžková promótorova oblasť bola amplifikovaná metódou PCR, pri ktorej boli využité primery podľa Tabuľky 19. Veľkosť PCR produktu bola overená na agarózovom géle, z ktorého bol následne izolovaný. Prečistený PCR produkt bol štiepený restriktívnymi endonukleázami *EcoRI*, *HindIII*. Rovnakými endonukleázami bol štiepený plazmid p770, následne defosforylovaný a najskôr ligovaný bez PCR inzertu. Na agarózovom géle sme tak boli schopní selektovať plazmid, ktorý bol nezaligovaný. Takýto plazmid bol izolovaný z gélu a následne bol do neho vložený inzer získaný pomocou PCR. Tento postup bol zvolený kvôli problémom pri ligácii plazmidu a PCR inzertu. Plazmid s inzertom bol

transformovaný do kompetentných buniek *E. coli* DH5 $\alpha$ . Sekvenačnou analýzou bola overená správnosť vloženej sekvencie v plazmide.

**Tabuľka 19:** Zoznam primerov použitých v PCR.

Číslo	Názov	Sekvencia 5' - 3'	RE
LK4090	RefZ_Full_R	GCTTGAATAGTATCAAGAGGAAGGAAAGCTTCCC	<i>HindIII</i>
LK4101	RefZ_Full_F	CCCGAATTCAGCTTGTGCATGAGGCAGATG	<i>EcoRI</i>

### 9.1.2 Klonovanie a purifikácia faktoru Spo0A

Analýza promótorovej oblasti génu *refZ* identifikovala väzbové miesta pre Spo0A a z toho dôvodu ho bolo potrebné pripraviť pre nasledujúce experimenty *in vitro*. Na purifikáciu faktoru Spo0A bol pripravený expresný plazmid pET302, do ktorého bol metódou klonovania pomocou PCR vložený inzert so sekvenciou kódujúcou *Spo0A*, sekvenciou rozpoznávanou TEV proteázou, pred ktorou bola na plazmide sekvencia kódujúca histidínovú kotvu (His-tag). Histidínová kotva slúži na purifikáciu proteínov pomocou metódy afinitnej chromatografie.

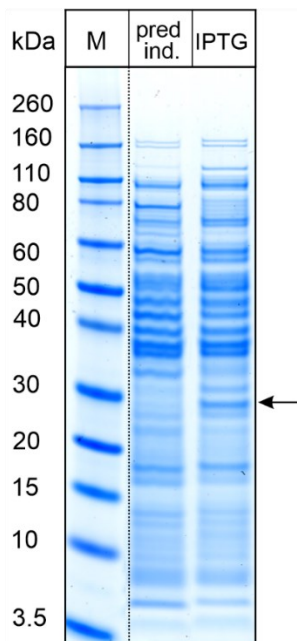
Prvotne boli navrhnuté PCR primery (Tabuľka 20) pre amplifikáciu spomínaného inzertu.

**Tabuľka 20:** Zoznam primerov použitých v PCR.

Číslo	Názov	Sekvencia 5' - 3'	RE
LK4547	BsuSpo0A_p302F	AAACTTTAATTTTCTCCATACCCTGGAAG TACAGGTTTTCTCG	-
LK4548	BsuSpo0A_p302R	GTTAGAGCATAAGGCTTCTTAAGGATCC GGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG	-

Veľkosť PCR produktu bola overená na agarózovom géle, z ktorého bol následne izolovaný. Klonovaním PCR bol inzert vložený do plazmidu pET302, podľa postupu uvedenom v kapitole 8.13 Klonovanie pomocou PCR. Takto pripravený plazmid bol transformovaný do kompetentných buniek *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) a bola vytvorená glycerolová konzerva (LK3604). Sekvenovaním bola overená správnosť vloženého inzertu. Plazmid s inzertom bol transformovaný do expresného kmeňa *E. coli* DE3 (BL21) a bola vytvorená glycerolová konzerva (LK3607).

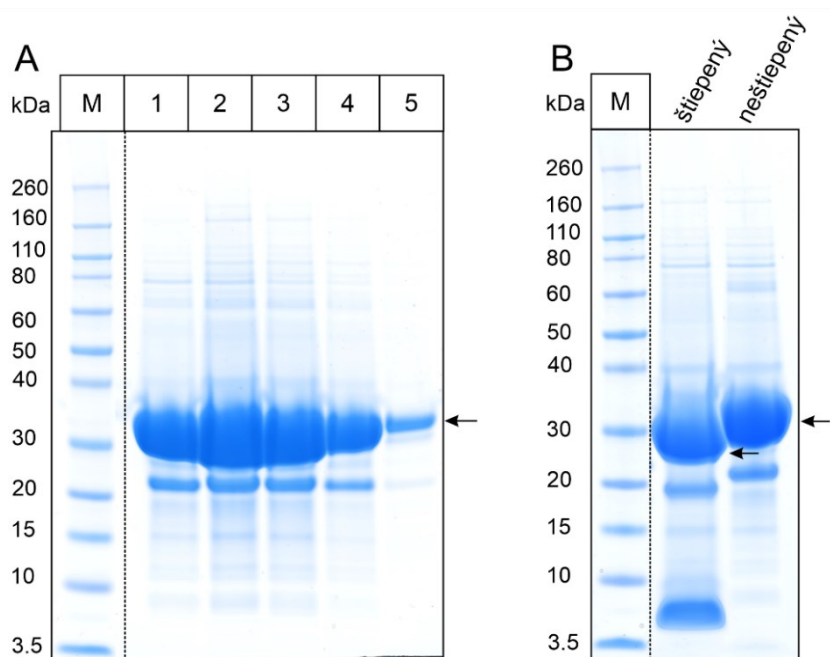
Funkčnosť expresného kmeňa (LK3607) bola overená pilotným experimentom, kedy boli bunky kultivované v 200 ml LB média s ampicilínom do OD<sub>600</sub> 0,8. Po dosiahnutí požadovanej optickej denzity bola indukovaná expresia Spo0A 0,3 mM IPTG. Sonikáciou boli bunky lyzované, lyzát bol centrifugovaný a supernatant odobratý. Množstvo indukovaného proteínu Spo0A zo supernatantu bola overená na géle SDS-PAGE (**Obr. 18**).



**Obrázok 18: Nadprodukcia faktora Spo0A s kotvou His-tag s využitím konštruktu LK3607.** Línia M označuje marker Novex™ Sharp Pre-Stained Protein Standard s naneseným množstvom 5  $\mu$ l. Línia pred ind. označuje vzorku pred indukciou. Línia IPTG označuje vzorku po indukcii s 0,3 mM IPTG. Nanesené množstvo oboch vzoriek je 6  $\mu$ g. Celkový objem nanesených vzoriek je 20  $\mu$ l s 6  $\mu$ l pufru 4xSDS. Šípka označuje nadprodukovaný proteín Spo0A. Prerušovaná čiara indikuje elektronické zostavenie jednotlivých dráh, ktoré pochádzali z rovnakého gélu

Po overení funkčnosti expresného kmeňa, bol kultivovaný v 1L LB média s ampicilínom do  $OD_{600}=0,8$ . Po dosiahnutí požadovaného OD bola expresia proteínu Spo0A indukovaná 0,3 mM IPTG. Sonikáciou boli bunky lyzované, lyzát bol centrifugovaný. Po centrifugácii bol odobratý supernatant, z ktorého bol proteín Spo0A purifikovaný afinitnou chromatografiou cez histidínovú kotvu na Spo0A naviazaním na agarózu Ni-NTA. Z agarózy Ni-NTA bolo eluovaných 5 frakcií po 0,5 ml. Frakcie boli analyzované na géle SDS-PAGE (**Obr. 19**).

Koncentrované frakcie boli dialyzované do pufru vhodného pre štiepenie proteázou TEV. Bradfordovým meraním proteínov bola stanovená koncentrácia, na základe ktorej bola ku proteínu pridaná proteáza TEV v pomere 1:10 (TEV : proteín). Odštiepenie histidínovej kotvy zo Spo0A bolo overené na géle SDS-PAGE (**Obr. 19**).

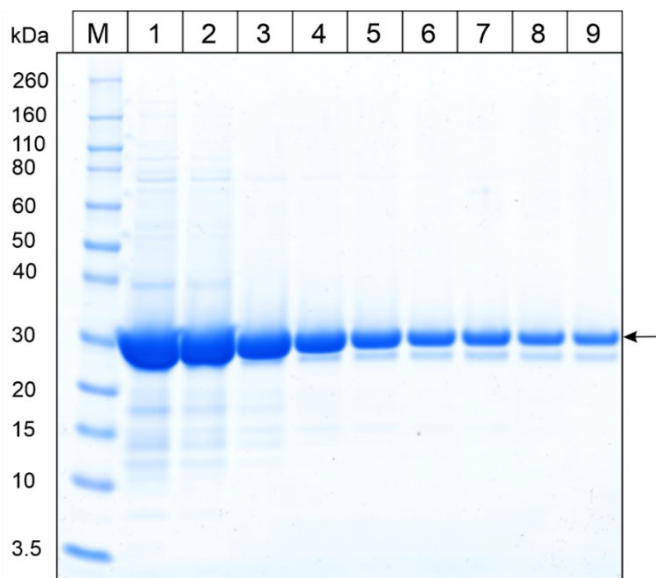


**Obrázok 19: SDS-PAGE analýza purifikovaných frakcií Spo0A, štiepenie Spo0A proteázou TEV.**

**A)** SDS-PAGE piatich eluovaných frakcií Spo0A s kotvou His-tag: Lína M označuje marker Novex<sup>TM</sup> Sharp Pre-Stained Protein Standard s naneseným množstvom 5  $\mu$ l. Lína 1-5 označuje eluované frakcie Spo0A. Celkový objem nanesených frakcií je 12  $\mu$ l s 3  $\mu$ l pufru 4xSDS. Šípka označuje purifikovaný Spo0A. Prerušované čiary indikujú elektronické zostavenie jednotlivých dráh, ktoré pochádzali z rovnakého gélu

**B)** SDS-PAGE štiepeného Spo0A proteázou TEV: Lína M označuje marker Novex<sup>TM</sup> Sharp Pre-Stained Protein Standard s naneseným množstvom 5  $\mu$ l. Lína štiepený označuje Spo0A po odštiepení kotvy His-tag. Lína neštiepený označuje Spo0A s kotvou His-tag. Celkový objem vzoriek je 12  $\mu$ l s 3  $\mu$ l pufru 4xSDS. Šípky označujú úroveň štiepeného a neštiepeného Spo0A.

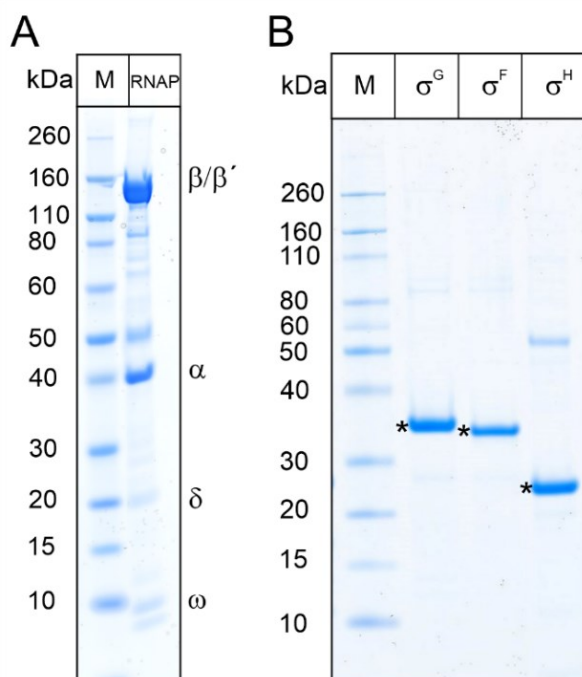
Takto štiepený proteín bol dialyzovaný do pufru vhodného na vymývanie proteínu cez agarózu Ni-NTA. Dialyzovaný proteín bol následne nanesený na agarózu Ni-NTA čo zabezpečilo naviazanie odštiepenej kotvy His-tag na agarózu Ni-NTA a pretečenie proteínu bez histidínovej kotvy. Celkovo bolo získaných 9 frakcií. Frakcie boli analyzované na géle SDS-PAGE (**Obr. 20**). Koncentrované frakcie boli dialyzované do uchovávacieho pufru umožňujúceho skladovanie proteínu v  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Obrázok 20: SDS-PAGE frakcii Spo0A bez kotvy His-tag.** Línia M označuje marker Novex™ Sharp Pre-Stained Protein Standard s naneseným množstvom 5  $\mu$ l. Línie 1-9 označujú frakcie vymytého Spo0A bez kotvy His-tag. Celkový objem nanesených frakcii je 16  $\mu$ l s 4  $\mu$ l pufru 4xSDS. Šípka označuje frakcie Spo0A.

### 9.1.3 Purifikácia proteínov ( $\sigma^H, \sigma^F, \sigma^G$ , RNAP) využívaných v transkripciách *in vitro*

Ďalej bolo potrebné pripraviť faktory  $\sigma$ , ktorých väzbové miesta boli buď skôr identifikované alebo predpovedané našou bio-informatickou analýzou. Rovnako bolo potrebné pripraviť jadro RNAP. Proteíny boli purifikované z kmeňov (LK1723 [jadro RNAP], LK1425 [ $\sigma^F$ ], LK1423 [ $\sigma^G$ ], LK1208 [ $\sigma^H$ ]), ktoré boli už skôr pripravené v laboratóriu. Purifikácia proteínov  $\sigma^F, \sigma^G$ , RNAP bola vykonaná podľa postupu uvedenom v kapitole 8.22 Práca s proteínmi. Purifikácia  $\sigma^H$  po niekoľkých opakovaníach nebola úspešná kvôli vysokej zrážanlivosti proteínu. Z tohto dôvodu bol v transkripčných *in vitro* experimentoch využívaný faktor  $\sigma^H$ , ktorý nebol izolovaný v rámci tejto diplomovej práce. Koncentrácia proteínov bola overená Bradfordovou metódou uvedenou v kapitole 8.22.6.1 Bradfordová metóda a proteínová veľkosť bola overená na géle SDS-PAGE (**Obr. 21**).



**Obrázok 21: SDS-PAGE proteínov RNAP,  $\sigma^G, \sigma^F, \sigma^H$ .**

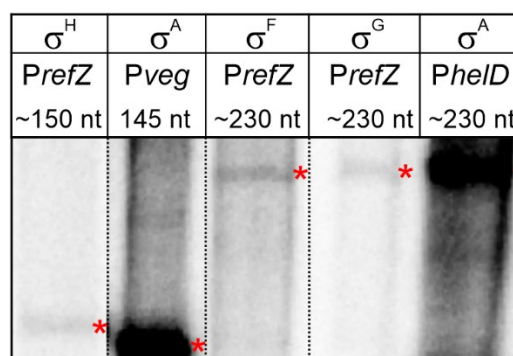
**A)** SDS-PAGE purifikovanej RNAP po dialýze. Línia M označuje marker Novex™ Sharp Pre-Stained Protein Standard s naneseným množstvom 6  $\mu$ l. Celkový objem nanesej vzorky RNAP je 24  $\mu$ l s 6  $\mu$ l pufru 4xSDS.

**B)** SDS-PAGE purifikovaných  $\sigma^G, \sigma^F, \sigma^H$  po dialýze. Línia M označuje marker Novex™ Sharp Pre-Stained Protein Standard s naneseným množstvom 5  $\mu$ l. Nanesené množstvo všetkých vzoriek sú 3  $\mu$ g. Hviezdičky označujú jednotlivé proteíny.

## 9.2 Overenie promótorovej aktivity *refZ* transkripčnými experimentami *in vitro*

Cieľom transkripčných experimentov *in vitro* bolo identifikovať promótor/y génu *refZ* a charakterizovať jeho reguláciu, keďže jeho expresia je v súčasnosti málo charakterizovaná. V literatúre je uvádzané, že prepisovanie *refZ* pravdepodobne prebieha z promótoru závislého na  $\sigma^H$ . Bio-informatickou analýzou bol predikovaný ďalší promótor. Konkrétne promótor závislý na  $\sigma^{F/G}$ . Naším cieľom bolo experimentálne overiť transkripčnú aktivitu týchto promótorov. Pripravený plazmidový konštrukt (LK3228) obsahoval oba predpokladané promótory a zároveň niekoľko väzbových miest pre transkripčný faktor Spo0A. V experimentoch boli využívané zároveň purifikované proteíny  $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ , RNAP a Spo0A. Transkripčné experimenty *in vitro* boli vykonané postupom uvedenom v kapitole Transkripcie *in vitro* a analyzované na polyakrylamidovom géle podľa postupu uvedenom v kapitole 8.24.1 Vertikálna PAA elektroforéza. Program Bio-Rad Quantity One slúžil pre kvantifikáciu zachyteného signálu na citlivej doske. V programe SigmaPlot boli kvantifikované dáta prevedené do grafickej podoby.

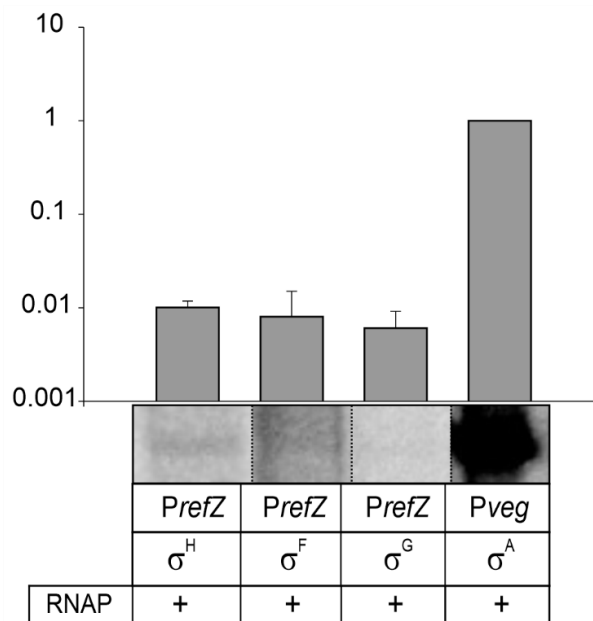
V prvotných experimentoch boli optimalizované transkripčné podmienky, kedy stanovený pomer pre jadro RNAP a jednotlivé faktory  $\sigma$  bol 1:10 (RNAP:  $\sigma$ ). Pri týchto podmienkach bola transkripcia síce detegovaná, avšak bola veľmi slabá. Napriek tomu sme boli schopní potvrdiť transkripčnú aktivitu izolovaných faktorov  $\sigma$  a RNAP na daných promótoroch porovnaním dĺžky transkriptov s markerom veľkostí (*Pveg* = 145 nt, *PhelD* = 230 nt; jedná sa o relevantné dĺžky pre použitý transkripčný vektor, kde boli promótory zaklonované). Predpokladaná veľkosť transkriptu zo  $\sigma^H$  závislého promótoru bol ~150 nt, predpokladaná veľkosť transkriptu zo  $\sigma^{F/G}$  závislého promótoru bola ~230 nt (**Obr. 22**).



**Obrázok 22: Overenie veľkosti transkripčných produktov z *PrefZ* promótorov závislých na  $\sigma^H/\sigma^F/\sigma^G$ .** Porovnanie veľkostí transkriptov z *PrefZ* promótorov (100 ng/ $\mu$ l) závislých na  $\sigma^H/\sigma^F/\sigma^G$  so známym veľkostným markerom (*Pveg/PhelD* = 100 ng/ $\mu$ l). Tabuľka nad primárnymi dátami zhrňuje v jednom stĺpci faktor  $\sigma$ , templát a veľkosť transkripčného produktu. Pomer RNAP: $\sigma$  je 1:10. Prerušované čiary indikujú elektronické zostavenie jednotlivých dráh, ktoré pochádzali z rovnakého gélu. Červené hviezdičky ukazujú konkrétny transkripčný produkt.



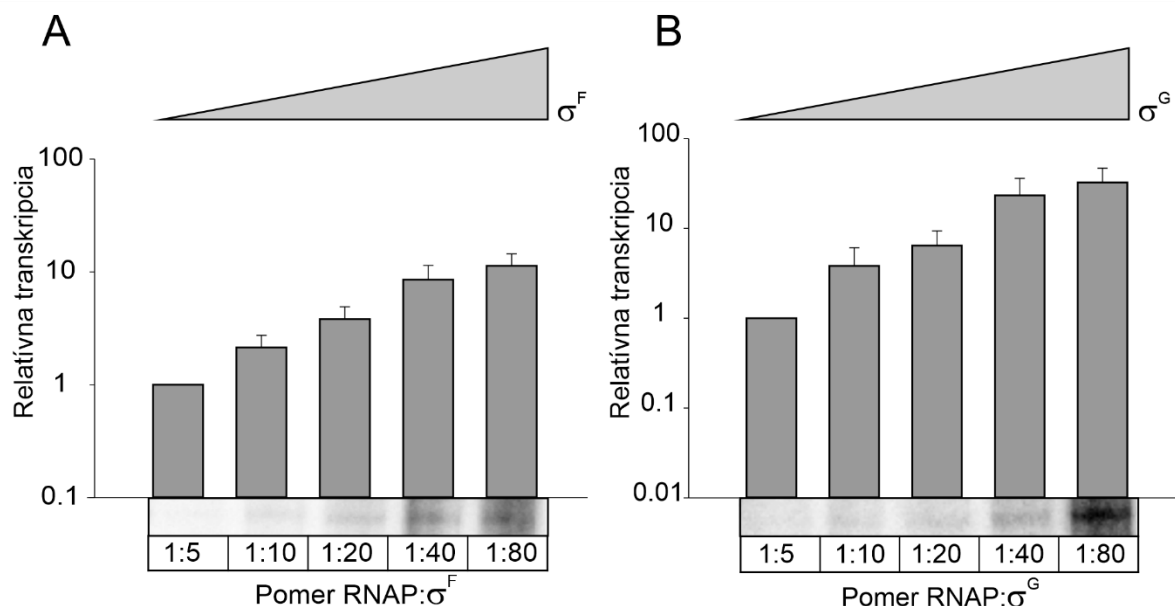
Takto identifikované promótoory súhlasili s promótoormi, ktoré boli predpovedané bio-informaticky. Transkripčná aktivita týchto promótoorov bola zároveň porovnaná s transkripčnou aktivitou vegetatívneho promótoora *Pveg*. Jeho aktivita bola približne 100x vyššia oproti promótoorom *PrefZ* (Obr. 23). Taktiež bolo overené či pozorovaná transkripcia je závislá na danom faktore  $\sigma$  vykonaním transkripcie *in vitro* len s jadrom RNAP bez akéhokoľvek faktoru  $\sigma$ . Keďže aktivita zo  $\sigma^H$  závislého promótoora *PrefZ* bola najvyššia a zároveň  $\sigma^H$  závislý promótoor bol podľa literatúry jediný predpokladaný, pre ďalšie experimenty bol zachovaný pomer RNAP: $\sigma^H$  1:10. Pre  $\sigma^{F/G}$  závislý promótoor sa musel stanoviť optimálny pomer RNAP: $\sigma^F/\sigma^G$  kapitola 9.2.1 Titrácia faktoru  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$ .



**Obrázok 23: Transkripcia *in vitro* z *PrefZ* promótoora závislého na  $\sigma^H/\sigma^F/\sigma^G$  a *Pveg* promótoora závislého na  $\sigma^A$ .** Graf zobrazuje transkripciu *in vitro* z *PrefZ* promótoorov (100 ng/ $\mu$ l) a promótoora *Pveg* (100 ng/ $\mu$ l). Reprezentatívne primárne dáta sú ukázané pod grafom. Transkripčná aktivita *refZ* promótoorov je normalizovaná na hodnotu promótoora *Pveg*. Tabuľka pod primárnymi dátami zhrňuje v jednom stĺpci templát, faktor  $\sigma$  a RNAP pre jednu reakciu. Pomer RNAP: $\sigma$  je 1:10. Prerušované čiary indikujú elektronické zostavenie jednotlivých dráh, ktoré pochádzali z rovnakého gélu. Stĺpce sú priemery z 3 opakovaní (aktivita *Pveg* bola nastavená ako 1), chybové úsečky indikujú smerodajnú odchýlku.

### 9.2.1 Titrácia faktoru $\sigma^F$ a $\sigma^G$

Vzhľadom na nízku transkripčnú aktivitu z promotóra závislého na  $\sigma^{F/G}$  v transkripčných reakciách buď s faktorom  $\sigma^F$  alebo  $\sigma^G$ , bola vykonaná transkripcia s dvojnásobne rastúcou koncentráciou faktorov  $\sigma^F$  alebo  $\sigma^G$  (Obr. 24). Titračná rada bola vykonaná podľa postupu uvedenom v kapitole 8.24 Transkripcia *in vitro*. Na základe výsledkov bol stanovený optimálny pomer RNAP: $\sigma$  pre ďalšie experimenty (1:20).



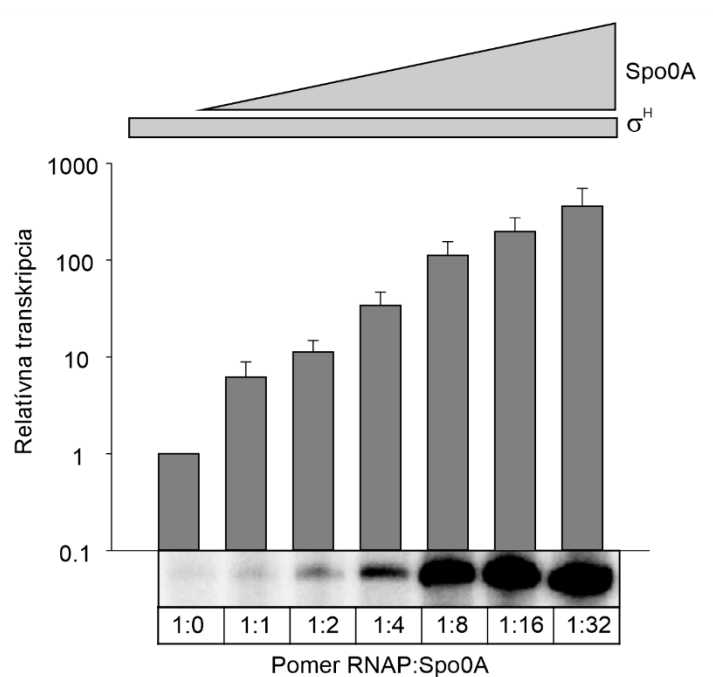
**Obrázok 24: Titrácia faktorov  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  na promotore *refZ*.** Grafy zobrazujú transkripciu *in vitro* z *refZ* promotóra (100 ng/ $\mu$ l). Reprezentatívne primárne dáta sú ukázané pod grafmi. Transkripčná aktivita *refZ* promotóra je normalizovaná na najnižšiu hodnotu. Tabuľka pod primárnymi dátami zhrňuje pomer RNAP: $\sigma$ . Chybové úsečky indikujú smerodajnú odchýlku.

A) Titrácia faktoru  $\sigma^F$ .

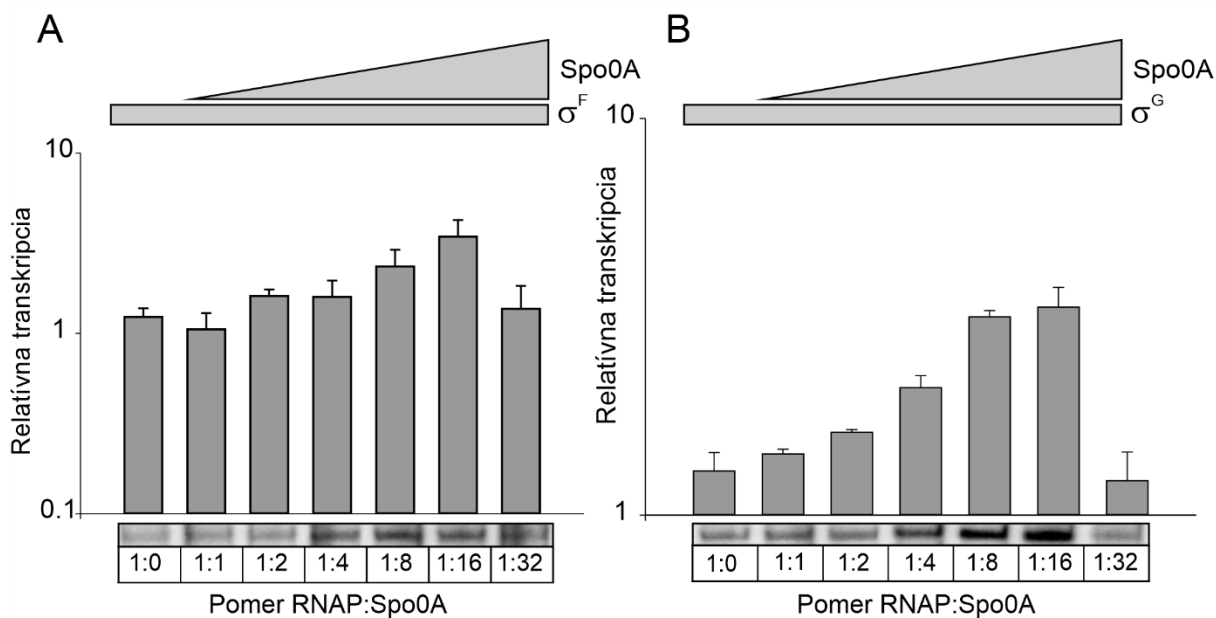
B) Titrácia faktoru  $\sigma^G$ . Stĺpce sú priemery z 3 opakovaní (aktivita *refZ* s pomerom RNAP: $\sigma^F$  = 1:5 bola nastavená ako 1).

### 9.2.2 Transkripcia *in vitro* s faktorom Spo0A

Keďže transkripčná aktivita promotóra závislého na  $\sigma^H$  bola najvyššia a v literatúre je uvádzaný pozitívny efekt transkripčného faktoru Spo0A na expresiu génov z promotórov závislých na  $\sigma^H$ , boli vykonané experimenty so Spo0A. Zároveň bol testovaný efekt na mieru expresie z *PrefZ* promotóra závislého na  $\sigma^{F/G}$ . Experimenty boli vykonané s dvojnásobne rastúcou koncentráciou Spo0A a s nemennou koncentráciou RNAP. Pomer RNAP: $\sigma^H$  bol 1:10, pomer RNAP: $\sigma^F/\sigma^G$  bol 1:20. Experimenty boli prevedené podľa postupu uvedenom v kapitole 8.24 Transkripcia *in vitro*. Týmito experimentami sme potvrdili expresiu génu *refZ* z promotóra závislého na  $\sigma^H$  a zároveň sme potvrdili nárast transkripčnej aktivity so zvyšujúcou sa koncentráciou Spo0A (Obr. 25). V transkripčných reakciách zo  $\sigma^F/\sigma^G$  závislého promotóra *refZ* sme zaznamenali taktiež nárast transkripčnej aktivity, avšak nie tak razantný, ako v prípade promotóra závislého na  $\sigma^H$ . Pri porovnaní efektu Spo0A v reakciách so  $\sigma^G$  alebo  $\sigma^F$  možno povedať, že transkripčná aktivita je výraznejšie ovplyvnená v reakciách so  $\sigma^G$  (Obr. 26B). Efekt Spo0A so  $\sigma^F$  je pozorovaný, avšak minimálny (Obr. 26A).



**Obrázok 25: Titrácia faktoru Spo0A za prítomnosti  $\sigma^H$  na promótori *refZ*.** Titrácia faktoru Spo0A s dvojnásobne rastúcou koncentráciou z pravej strany do ľavej. Pomery RNAP:Spo0A sú zhrnuté v tabuľke pod primárnymi dátami. Reprezentatívne primárne dáta sú ukázané pod grafom. Stĺpce sú priemery z 3 opakovaní, chybové úsečky indikujú smerodatnú odchýlku. Dáta sú normalizované na transkripciu bez Spo0A (nastavené ako 1). Koncentrácia  $\sigma^H$  je konštantná v pomere 1:10 (RNAP: $\sigma^H$ ).



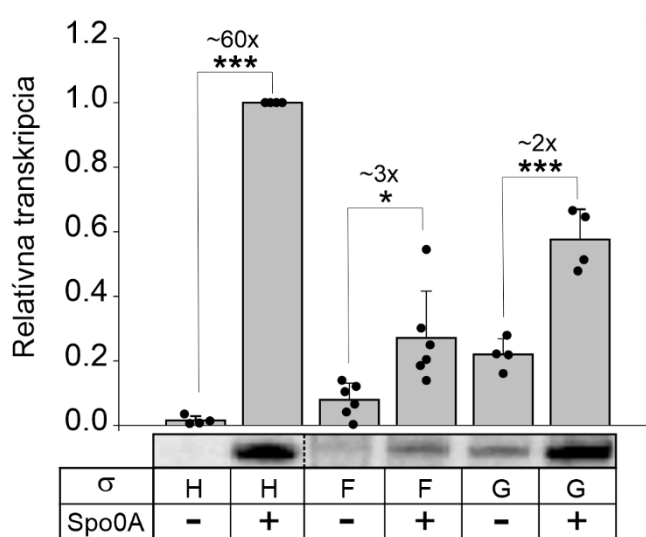
**Obrázok 26: Titrácia faktoru Spo0A za prítomnosti  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  na promóteri *refZ*.** Titrácia faktoru Spo0A s dvojnásobne rastúcou koncentráciou z pravej strany do ľavej. Pomery RNAP:Spo0A sú zhrnuté v tabuľke pod primárnymi dátami. Reprezentatívne primárne dáta sú ukázané pod grafmi. Stĺpce sú priemery z 3 opakovaní, chybové úsečky indikujú smerodatnú odchýlku. Dáta sú normalizované na transkripciu bez Spo0A (nastavené ako 1). Koncentrácia  $\sigma^F/\sigma^G$  je konštantná v pomere 1:20 (RNAP:  $\sigma^F/\sigma^G$ ).

A) Titrácia faktoru Spo0A za prítomnosti  $\sigma^F$ .

B) Titrácia faktoru Spo0A za prítomnosti  $\sigma^G$ .

### 9.2.2.1 Transkripčná aktivita promótorovej oblasti *refZ* *in vitro* – zhrňujúci experiment

Na záver bloku experimentov *in vitro* boli vybrané podmienky, ktoré najlepšie demonštrovali dosiahnuté výsledky, tak aby identita faktorov  $\sigma$ , promótorova aktivita  $\pm$  Spo0A boli zachytené v jednom prehľadom grafe. Na porovnanie miery expresie boli vybrané nasledujúce koncentrácie faktorov  $\sigma$  a RNAP – RNAP: $\sigma^H$  (1:10), RNAP:  $\sigma^F/\sigma^G$  (1:20). Pomer RNAP:Spo0A bol pre všetky reakcie rovnaký a to pomer 1:8. Výsledok značne ukazuje najvyššiu mieru expresie v prípade transkripčnej reakcie so  $\sigma^H$  a Spo0A (**Obr. 27**), pričom miera expresie bez Spo0A je 60x nižšia. Transkripčná aktivita z promótoru  $\sigma^{F/G}$  so  $\sigma^F$  a Spo0A je trojnásobne vyššia než bez Spo0A. V prípade transkripcie  $\sigma^G$  so Spo0A je pozorovaný dvojnásobný nárast aktivity promótoru  $\sigma^{F/G}$  než bez faktoru Spo0A.



**Obrázok 27: Miera expresie promótorov *refZ* za prítomnosti a neprítomnosti Spo0A.**

Prvé dva stĺpce prislúchajú transkripcii zo  $\sigma^H$  závislého promótoru bez Spo0A alebo so Spo0A. Tretí a štvrtý stĺpec prislúcha transkripcii z promótoru závislého na  $\sigma^{F/G}$  s faktorom  $\sigma^F$  bez Spo0A alebo so Spo0A. Posledné dva stĺpce prislúchajú transkripcii z promótoru závislého na  $\sigma^{F/G}$  s faktorom  $\sigma^G$  bez Spo0A alebo so Spo0A. Pomer RNAP: $\sigma^H$  1:10, RNAP:  $\sigma^F/\sigma^G$  1:20. Pomer RNAP:Spo0A 1:8. Reprezentatívne primárne dáta sú ukázané pod grafom. Prerušované čiary indikujú elektronické zostavenie jednotlivých dráh, ktoré pochádzali z rovnakého gélu. Stĺpce sú priemery z 3 a viac opakovaní. Body predstavujú jednotlivé experimenty. Dáta sú normalizované na hodnotu transkripce  $\sigma^H$  so Spo0A (nastavené ako 1), chybové úsečky indikujú smerodajnú odchýlku. Hviezdičky prislúchajú *p*-hodnote.

### 9.3 Lokalizácia expície RefZ *in vivo*

Na výsledky promótorovej aktivity génu *refZ* v transkripčnom systéme *in vitro* sme naviazali experimentami v systéme *in vivo*. Pre samotné experimenty *in vivo* boli pripravené bakteriálne kmene s fluorescenčne značeným proteínom RefZ (RefZ-GFP), ktorý umožnil sledovať expresiu a lokalizáciu RefZ. Príprava je popisovaná v kapitole 9.3.1 Klonovanie kmeňov s GFP značeným génom *refZ*.

#### 9.3.1 Klonovanie kmeňov s GFP značeným génom *refZ*

V kapitole je popisovaná príprava bakteriálnych kmeňov, ktoré sú využívané ďalej využívané v kapitolách 9.4 Tecan – meranie promótorovej aktivity, 9.5 Mikroskopia SIM. Pomocou PCR amplifikačnej metódy boli pripravené 3 konštrukty (**Obr. 17**). Konštrukt jedna (**Obr. 17A**) pozostával z celej promótorovej oblasti (o rovnakom zložení, ako v prípade plno dĺžkového promótoru využívanom v transkripciách *in vitro*), génu *refZ* a sekvencie kódujúcej GFP. Konštrukt dva (**Obr. 17B**) pozostával zo skrátenej promótorovej oblasti len zo  $\sigma^H$  závislým promótorom, génu *refZ* a sekvencie kódujúcej GFP. Tretí konštrukt (**Obr. 17C**) pozostával z oblasti Shine Dalgarno, génu *refZ* a sekvencie kódujúcej GFP (negatívna kontrola určujúca mieru nešpecifickej expície).

Na prípravu týchto konštruktov boli použité primery podľa Tabuľky 21. Veľkosť PCR produktov bola overená na agarózovom géle, z ktorého boli PCR produkty následne izolované. Prečistené PCR produkty boli štiepené restriktónymi endonukleázami *EcoRI*, *BamHI*. Rovnakými endonukleázami bol štiepený plazmid pDG1664. Štiepený plazmid bol následne defosforylovaný a ligovaný bez PCR inzertu. Na agarózovom géle sme tak boli schopní selektovať plazmid, ktorý nebol opäť spojený. Takýto plazmid bol izolovaný z gélu a následne bol do neho vložený PCR inzert. Tento postup bol zvolený kvôli problémom pri ligácii plazmidu a PCR inzertov. Plazmid s inzertom bol transformovaný do kompetentných buniek *E. coli* DH5 $\alpha$ . Sekvenačnou analýzou bola overená správnosť sekvencie vlozenej do plazmidu pDG1664. Následne boli vytvorené glycerolové konzervy: LK3357 (DH5 $\alpha$ , pDG1664 (+) *refZ-gfp*, promótor =  $\sigma^H$  závislý), LK3523 (DH5 $\alpha$ , pDG1664 (+) *refZ-gfp*, promótor =  $\sigma^{GFH}$  závislý), LK3813 (DH5 $\alpha$ , pDG1664 (+) *refZ-gfp*, Shine Dalgarno).

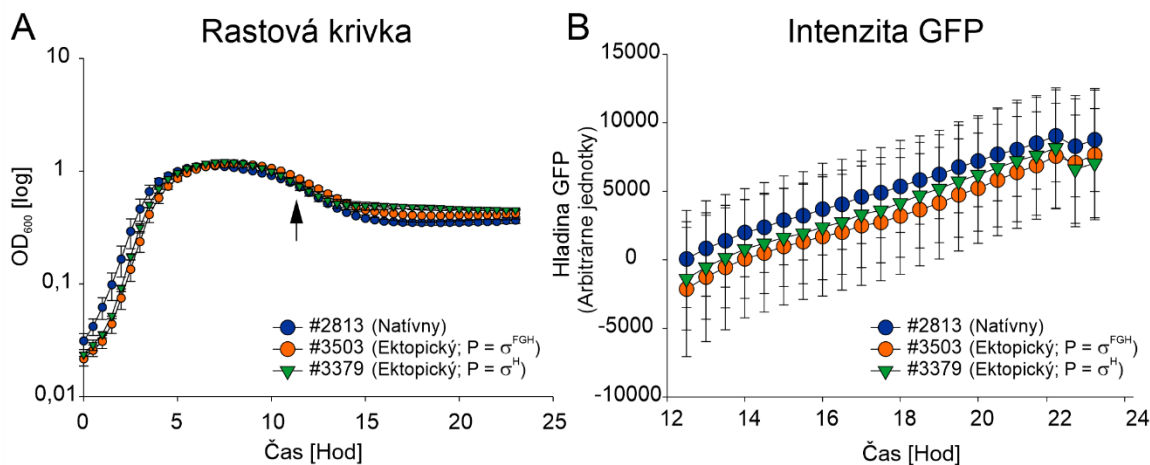
**Tabuľka 21: Zoznam použitých primerov v PCR.**

Číslo	Názov	Sekvencia 5'-3'	RE
LK4103	RefZGFP_R	CACATGGCATGGATGAACTATACAAATA AGGATCCGATGATGAT	<i>BamHI</i>
LK4768	Full_RefZGFP_F	CCCGAATTCATGAAAGTAAGCACCAAAG ACAAAA	<i>EcoRI</i>
LK4778	RefZGFP_SD_F	CCCGAATTCAGAGGAAGGAGTGAGCCGT	<i>EcoRI</i>
LK4089	SigH_RefZ_GFP_F	CCCGAATTCCTGCCGGCATTGTCGATAA GTTCT	<i>EcoRI</i>

Plazmid s inzertom bol transformovaný do kompetentných buniek *B. subtilis*, ktoré majú deletovaný gén *refZ*. Tento bakteriálny kmeň *B. subtilis* naše laboratórium získalo od Dr. Imricha Baráka pod originálnym kódom KM1473 a bol zavedený do našej knižnice bakteriálnych kmeňov, pod číslom LK3129 (pod týmto číslom bude ďalej uvádzaný). Rekombináciou bol inzert na plazmide vložený do *thrC* miesta v rámci genómu kompetentných buniek LK3129. Vloženie do toho miesta bolo overené kombináciou správne zvolených antibiotík a boli vytvorené glycerolové konzervy (LK3379 [*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^H$  závislý], LK3503 [*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^{GFH}$  závislý], LK3814 [*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, Shine Dalgarno]). Tieto kmene boli ďalej využívané na meranie promótorovej aktivity zariadením Tecan a na kvantifikáciu GFP signálu zo SIM mikroskopických fotografií.

#### 9.4 Meranie promótorovej aktivity *in vivo*

Kmene s GFP značením proteínu RefZ (LK3379, LK3503, LK3814) boli využité na meranie promótorovej aktivity na základe detekcie fluorescenčného signálu GFP a meranie rastovej krivky v priebehu 24 hod. Ako pozitívna kontrola bol zvolený bakteriálny kmeň s GFP značeným génom *refZ* v natívnom lokuse *B. subtilis*. Tento kmeň naše laboratórium obdržalo od Dr. Imricha Baráka (SAV, Bratislava) pod originálnym kódom KM1390 a bol zavedený do našej knižnice bakteriálnych kmeňov, pod číslom LK2813 (pod týmto číslom bude ďalej uvádzaný). Kmeň LK3814 slúžil, ako negatívna kontrola na overenie, že nedochádza ku nešpecifickému prepisu génu *refZ-gfp*. Tento kmeň v rámci oblasti proti smeru transkripcie od *refZ* obsahuje len sekvenciu Shine-Dalgarno. Podľa postupu uvedenom v kapitole 8.27 TECAN, bolo vykonané meranie optickej denzity pri vlnovej dĺžke 600 nm a meranie intenzity fluorescenčného signálu GFP. Získané hodnoty prislúchajúce rastovej krivke a intenzite fluorescenčného signálu GFP boli vyhodnotené deskriptívnou štatistickou analýzou. Vyhodnotené dáta boli prevedené do grafickej podoby v programe SigmaPlot (**Obr. 28**). Fluorescenčný GFP signál bol detegovaný až po 12 hodinách od začiatku kultivácie. Hodnoty prislúchajúce kmeňu LK3814 boli odpočítané od nameraných hodnôt, ktoré prislúchali kmeňom LK2813, LK3379, LK3503. Vďaka tomu sme boli schopní odstrániť prípadnú falošnú pozitivitu GFP signálu. Tento typ experimentu slúžil na overenie expresie *refZ-gfp* z pripravených kmeňov. Intenzita fluorescenčného signálu GFP v troch kmeňoch (LK2813, LK3379, LK3503) je približne rovnaká a nedetegovali sme výrazné rozdiely v expresii *refZ-gfp* v závislosti od rozdielneho promótoru. Avšak u kmeňa LK3503 (*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^{GFH}$  závislý) sme detegovali nižšiu intenzitu GFP signálu pri porovnaní s kmeňom LK3379 (*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^H$  závislý), u ktorého by sme čakali nižšiu expresiu *refZ-gfp*. Kmeň LK2813 (*refZ-gfp* v natívnom lokuse, promótor = natívny) vykazuje podľa očakávaní najvyššiu intenzitu GFP. Na základe týchto výsledkov bola vykonaná mikroskopia SIM.



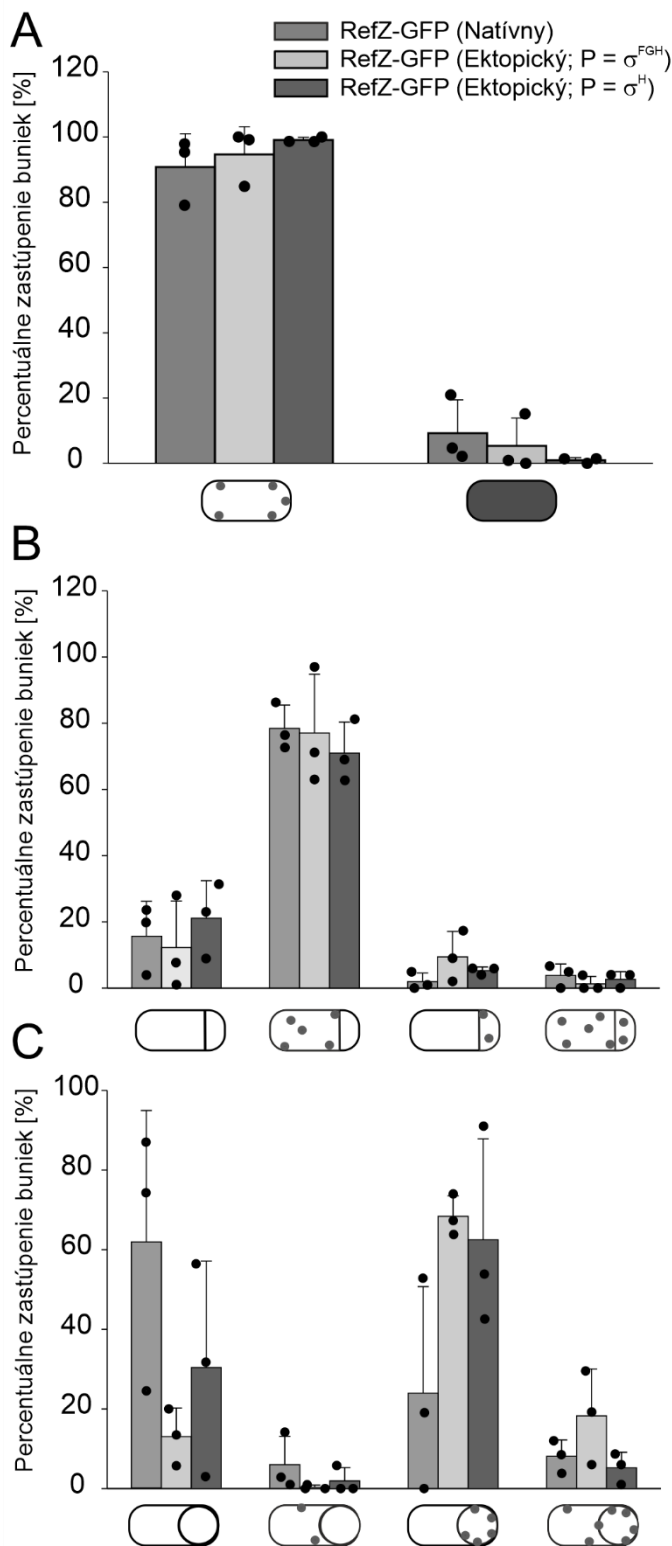
**Obrázok 28: Rastové krivky a intenzity GFP signálu.** Modré body prislúchajú kmeňu 2813 (*refZ-gfp* v natívnom lokuse, promótor = natívny). Oranžové body prislúchajú kmeňu 3503 (*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^{GFH}$  závislý). Zelené trojuholníky prislúchajú kmeňu 3379 (*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^H$  závislý). Dáta sú vynesené ako priemer za 3 replikáty.

**A)** Na ose X sú uvedené hodnoty času v hodinách [hod]. Na ose Y sú uvedené hodnoty  $OD_{600}$ . Šípka značí čas, od ktorého bola intenzita GFP detegovaná.

**B)** Na ose X sú uvedené hodnoty času v hodinách [hod]. Na ose Y sú uvedené hodnoty prislúchajúce intenzite GFP signálu. Chybové úsečky grafov A a B predstavujú hodnotu štandardnej odchýlky (SD).

## 9.5 Lokalizácia RefZ v bunke - Mikroskopia SIM

Výsledky z kapitoly 9.4 Meranie promótorovej aktivity potvrdili funkčnosť kmeňov s GFP značeným proteínom RefZ a tieto kmene (LK2813 [*refZ-gfp* v natívnom lokuse], LK3503 [*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^{GFH}$  závislý], LK3379 [*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^H$  závislý], LK3814 [*refZ-gfp* v ektopickom lokuse, Shine Dalgarno] sme využili v mikroskopickej analýze SIM. Mikroskopia SIM bola vykonaná podľa potupu uvedenom v kapitole 8.26 Mikroskopia SIM. Kmeň LK3814 slúžil na odstránenie prípadnej falošnej pozitivity GFP signálu. Zhotovené mikroskopické fotografie slúžili na kvantifikáciu troch bakteriálnych kmeňov (LK2813, LK3503, LK3379) v troch štádiách. Štádium 0-I = štádium pred vytvorením asymetrického septa (**Obr. 29A**). Bunky v tomto štádiu boli rozdelené do dvoch nasledujúcich tried: RefZ detegované v bodoch/RefZ detegované difúzne. Štádium II = štádium, v ktorom je vytvorené asymetrické septum (**Obr. 29B**). Bunky štádiu II boli rozdelené do nasledujúcich tried: RefZ nedetegované/RefZ detegované v materskej časti bunky/RefZ detegované v budúcej prespóre/RefZ detegované v materskej časti aj v budúcej prespóre. Štádium IV-V = štádium, v ktorom je vytvorený budúca spóra (**Obr. 29C**). Bunky štádiu IV-V boli rozdelené do nasledujúcich tried: RefZ nedetegované/RefZ detegované v materskej časti/RefZ detegované v prespóre/RefZ detegované v materskej časti aj v prespóre. Vo všetkých troch kmeňoch, v štádiu 0-I, boli najviac zastúpené bunky, u ktorých bolo RefZ detegované v bodoch. V štádiu II boli najviac zastúpené bunky, u ktorých bolo RefZ detegované v materskej časti bunky. Toto platilo pre všetky 3 kmene. Bunky kmeňa LK2813 boli najviac zastúpené v štádiu IV-V bez detekcie RefZ. Bunky kmeňov LK3503 a LK3379 boli najviac zastúpené v štádiu IV-V s detekciou RefZ v prespóre.



### Obrázok 29: Triedy buniek z hľadiska lokalizácie RefZ počas sporulácie.

Pod osou X sú znázornené bunky v jednotlivých štádiách. Na ose Y je percentuálne zastúpenie buniek v danom štádiu. RefZ-GFP (Natívny) = kmeň LK2813 s *refZ-gfp* v natívnom lokuse. RefZ-GFP (Ektopický;  $P = \sigma^{GFH}$ ) = kmeň LK3503 s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^{GFH}$  závislý. RefZ-GFP (Ektopický;  $P = \sigma^H$ ) = kmeň LK3379 s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse, promótor =  $\sigma^H$  závislý. Popis je pre každý graf rovnaký. Kvantifikácia bola vykonaná zo 100 buniek, z každého štádia, z 3 opakovaní, z 3 kmeňov LK2813, LK3503, LK3379. Zastúpenie buniek v každom štádiu je vyjadrené v percentách. Body predstavujú jednotlivé experimenty.

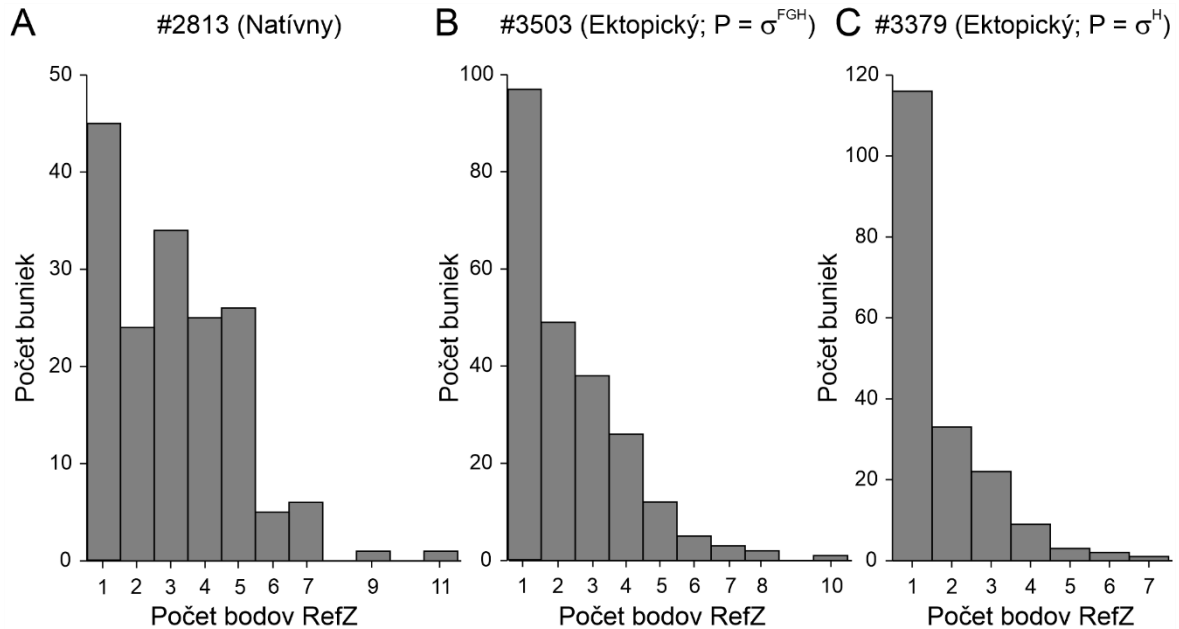
**A)** Bunky v štádiu 0-I pred vytvorením asymetrického septa. Prvé 3 stĺpce vľavo = RefZ detegované v bodoch; 3 stĺpce vpravo = RefZ detegované difúzne.

**B)** Bunky v štádiu II po vytvorení asymetrického septa. Prvé 3 stĺpce vľavo = RefZ nedetegované; 3 stĺpce vedľa = RefZ detegované v materskej časti bunky; predposledné 3 stĺpce = detegované v budúcej prespóre; posledné 3 stĺpce = RefZ detegované v materskej časti aj v budúcej prespóre.

**C)** Bunky v štádiu IV-V s vytvorenou prespórou. Prvé 3 stĺpce vľavo = RefZ nedetegované; 3 stĺpce vedľa = RefZ detegované v materskej časti; predposledné 3 stĺpce = RefZ detegované v prespóre; posledné 3 stĺpce = RefZ detegované v materskej časti aj v prespóre.

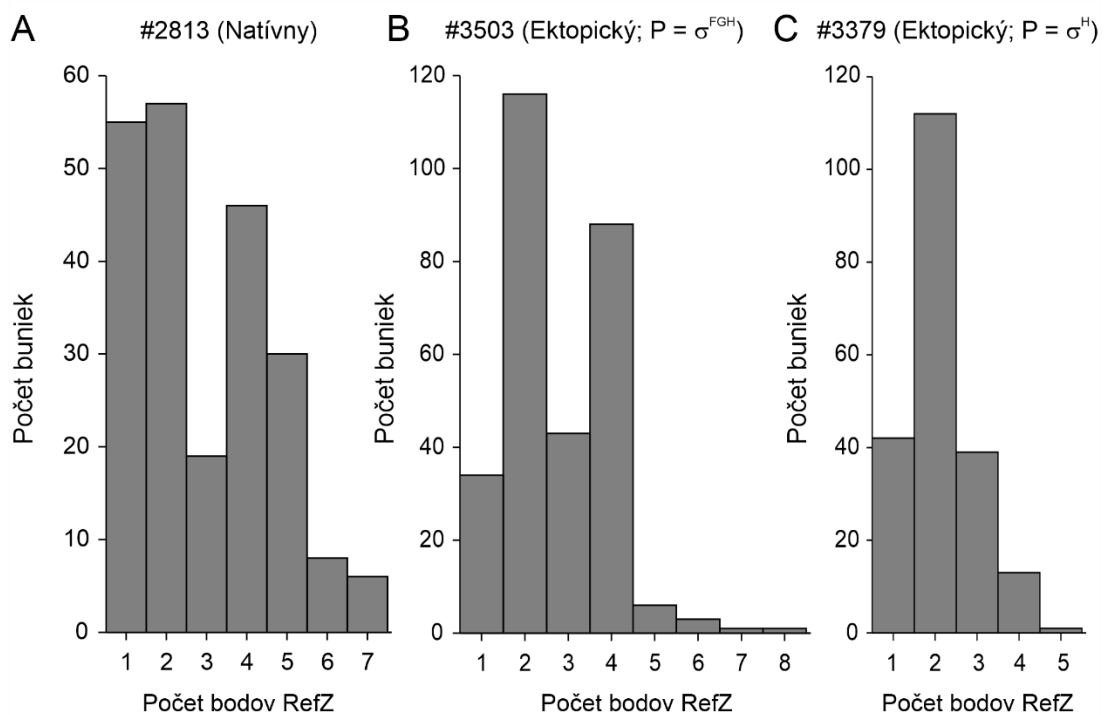


V bunkách v štádiu 0-I s detekciou RefZ v bodoch a vo fáze II s detekciou RefZ v materskej časti bunky bol spočítaný počet bodov RefZ v jednotlivých bunkách. Výsledné hodnoty pre bunky vo fáze 0-I (**Obr. 30**) a pre bunky vo fáze II (**Obr. 31**) boli prevedené do grafickej body. Reprezentatívne primárne mikroskopické fotografie buniek *B. subtilis* ukazujú lokalizáciu RefZ (RefZ-GFP) v divokom kmeni LK2813 v troch sporulačných štádiách (**Obr. 32**).



**Obrázok 30: Počet bodov RefZ v bunkách v štádiu pred vytvorením asymetrického septa.** Na ose X je uvedený počet detegovaných bodov RefZ v bunke v štádiu 0-I pred vytvorením asymetrického septa. Na ose Y je uvedený počet buniek v štádiu 0-I pred vytvorením asymetrického septa.

- A) Počet bodov RefZ v kmeni 2813 s *refZ-gfp* v natívnom lokuse, natívny promótor.  
 B) Počet bodov RefZ v kmeni 3503 s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse,  $\sigma^{FGH}$  závislý promótor.  
 C) Počet bodov RefZ v kmeni 3379 s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse,  $\sigma^H$  závislý promótor.

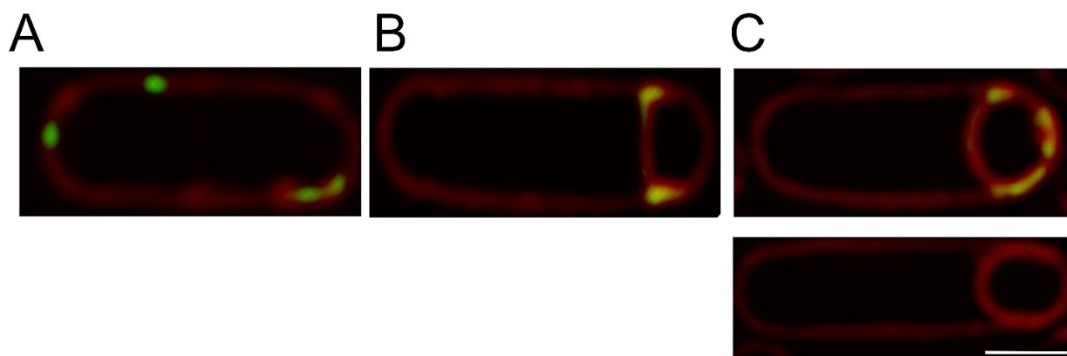


**Obrázok 31: Počet bodov RefZ v bunkách v štádiu po vytvorení asymetrického septa.** Na ose X je uvedený počet detegovaných bodov RefZ v materskej časti bunky v štádiu II po vytvorení asymetrického septa. Na ose Y je uvedený počet buniek v štádiu II.

A) Počet bodov RefZ v kmeni 2813 s *refZ-gfp* v natívnom lokuse, natívny promótor.

B) Počet bodov RefZ v kmeni 3503 s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse,  $\sigma^{FGH}$  závislý promótor.

C) Počet bodov RefZ v kmeni 3379 s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse,  $\sigma^H$  závislý promótor.



**Obrázok 32: Primárne mikroskopické fotografie lokalizácie RefZ v troch sporulačných štádiách.** Fotografie zobrazujú lokalizáciu RefZ (RefZ-GFP) v divokom kmeni LK2813 (*refZ-gfp* v natívnom lokuse). Mierka = 1  $\mu$ m.

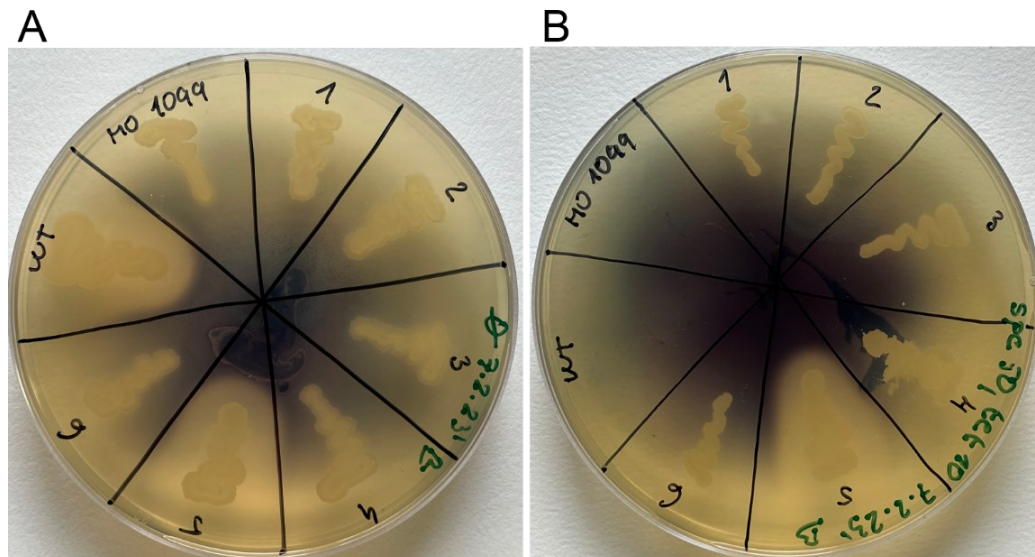
A) Sporulačné štádium 0-I, lokalizácia RefZ (RefZ-GFP) v bodoch na membráne.

B) Sporulačné štádium II, lokalizácia RefZ (RefZ-GFP) v bodoch na okrajoch polárneho septa.

C) Sporulačné štádium IV-V, horný obrázok zobrazuje lokalizáciu RefZ (RefZ-GFP) v prespóre, spodný ukazuje bunku bez detekcie RefZ.

## 9.6 Identifikácia interakčných partnerov RefZ

Na identifikáciu proteínových interakčných partnerov proteínu RefZ bola zvolená imunoprecipitačná metóda s protilátkou anti-FLAG. Na prípravu bakteriálneho kmeňa potrebného na imunoprecipitáciu, bol využitý plazmid pSGrefZFLAG. Tento plazmid naše laboratórium získalo od Dr. Imricha Baráka pod originálnym kódom KM1490 a bol zavedený do našej knižnice bakteriálnych kmeňov, pod číslom LK3764. Tento plazmid bol izolovaný a transformovaný do kompetentných buniek *B. subtilis* s deletovaným génom *refZ* (LK3129). Plazmid bol integrovaný do miesta *amyE*. Amylázovým testom vykonaným podľa postupu v kapitole 8.21 AmyE test, bola overená integrácia do miesta *amyE*, ktorou bunky stratili možnosť štiepiť škrob. Ako negatívna kontrola bol zvolený kmeň, ktorý nemal schopnosť štiepiť škrob LK1741. Ako pozitívna kontrola bol zvolený divoký kmeň *B. subtilis* LK1629, ktorý je schopný prirodzene štiepiť škrob. Test bol vykonaný pre 6 náhodných kolónií, z ktorých bola napokon vybratá kolónia jedna (**Obr. 33**), z ktorej bola urobená glycerolová konzerva LK3783.

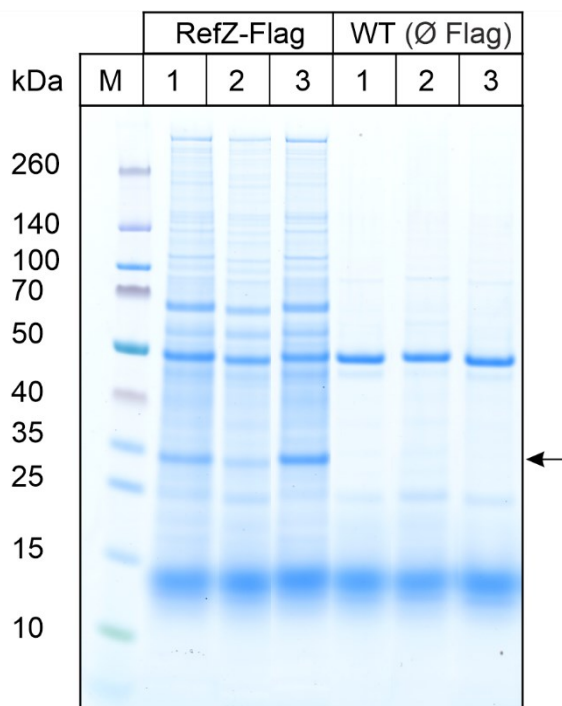


**Obrázok 33: Test integrácie do miesta *amyE*.** Amylázový test na pevnom médiu. WT = LK1629 pozitívna kontrola, MO 1099 = LK1741 negatívna kontrola, testované kolónie 1-6. V prípade kolónie 5 nenastalo vloženie do miesta *amyE*, má neporušený gén *amyE*, je schopná štiepiť škrob. Fialové zafarbenie signalizuje interakciu jódoých pár so škrobom. Baktéria bez porušeného génu *amyE* štiepi škrob vo svojom okolí, vytvára haló bez fialového zafarbenia.

A) Test integrácie do *amyE* bez antibiotík.

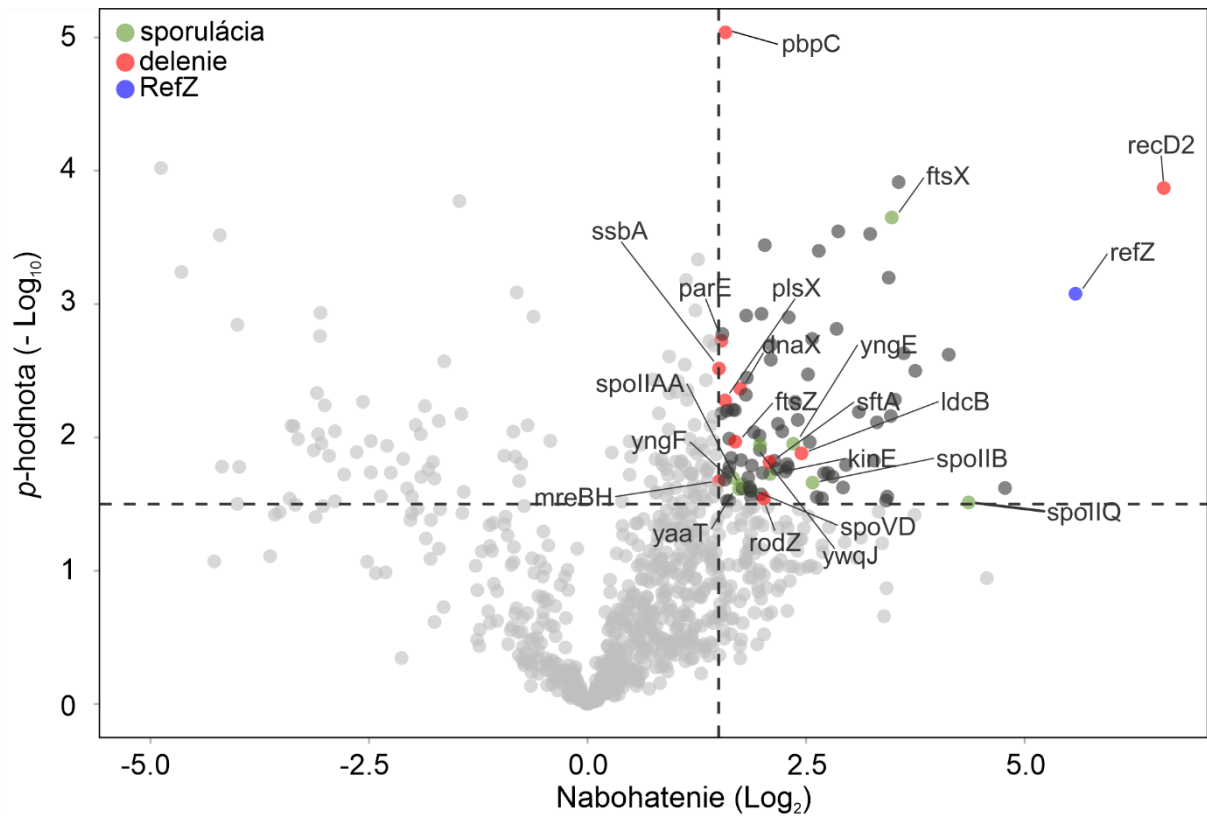
B) Test integrácie do *amyE* s antibiotikami.

Kmeň LK3783 bol následne využívaný v imunoprecipitačnej metóde, ktorá bola vykonaná podľa postupu v kapitole 8.23 Imunoprecipitácia. Ako negatívna kontrola bol využívaný divoký kmeň *B. subtilis* LK1629, ktorý nemá vo svojom genóme za génom *refZ* 3xFlag. U takého kmeňa nie je možné naviazanie protilátky anti-Flag na 3xFlag a teda neumožňuje izolovanie daného proteínu s interakčnými partnermi. Vzorky získané z troch opakovaní boli overené na géle SDS-PAGE (**Obr. 34**).



**Obrázok 34: SDS-PAGE analýza imunoprecipitovaných vzoriek.** Línia M označuje marker Novex™ Sharp Pre-Stained Protein Standard s naneseným množstvom 5  $\mu$ l. Línie s označením 1-3 pod RefZ-Flag prislúchajú trom opakovaniam, kmeň LK3783. Línie s označením 1-3 pod WT prislúchajú trom opakovaniam, kmeň LK1629. Šípka označuje RefZ. Celkový objem nanesených vzoriek je 20  $\mu$ l s 5  $\mu$ l pufru 4xSDS.

Vzorky boli následne analyzované hmotnostnou spektrometriou Dr. Martinom Hubálkom (ÚOCHB, Praha). Získané dáta boli následne prevedené do grafickej podoby, zobrazujúci nabohatenie proteínov zo vzorky RefZ-Flag oproti kontrole. Celkom sme identifikovali 89 významne nabohatených proteínov (**Obr. 35**). Najviac zastúpené skupiny nabohatených proteínov boli proteíny podieľajúce sa na sporulácii a bunkovom delení. Všetky nabohatené proteíny sú zhrnuté v kapitole 13 Prílohy, Tabuľka S4.



**Obrázok 35: Volcano plot dát z hmotnostnej spektrometrie.** Na ose X sú uvedené hodnoty nabohtenia  $\text{Log}_2$ , na ose Y sú uvedené  $p$ -hodnoty ( $-\text{Log}_{10}$ ). Vodorovná prerušovaná čiara ukazuje prahovú hranicu  $p$ -hodnoty 1.5 [ $-\text{Log}_{10}(1.5) = 0,03$ ]. Zvislá prerušovaná čiara ukazuje prahovú hranicu násobnej zmeny (Fold Change) 1.5 [ $\text{Log}_2(1.5) = 0,58$ ]. Bledo šedé body predstavujú proteíny nespĺňajúce podmienky prahových hraníc ( $p$ -hodnoty  $\geq 1,5$ ,  $\text{Log}_2(\text{Fol f Change}) \geq 1,5$ ). Modrý bod = RefZ, červené body = proteíny delenia, zelený body = proteíny sporulácie, tmavo šedé body = proteíny iných kategórii.

## 10 Diskusia

V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na proteín RefZ, zúčastňujúceho sa procesu sporulácie. Konkrétne, identifikovali sme a experimentálne overili transkripčnými prístupmi *in vitro* aktivitu promótorov génu *refZ*. Ich aktivitu sme rovnako čiastočne charakterizovali prístupmi *in vivo*. Ďalej sme určili lokalizáciu RefZ v bunke v troch sporulačných štádiách. Nakoniec sme identifikovali interakčných partnerov proteínu RefZ.

### 10.1 Promótorová aktivita úseku predchádzajúceho gén *refZ* *in vitro*

Naším prvým cieľom bolo charakterizovať promótory a expresiu génu *refZ*. Doteraz uvádzané údaje v literatúre boli len dedukované a doposiaľ neboli experimentálne overené. Jediným predpokladaným promótorom podľa Britton *et al.* (2002) bol promótor závislý na  $\sigma^H$ . Bio-informatickou analýzou bol identifikovaný ďalší promótor, ktorý má konsenzus sekvencie pre faktory  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  rovnaký. Z tohto dôvodu je uvádzaný ako promótor závislý na  $\sigma^{F/G}$ . Predpokladaný promótor závislý na  $\sigma^{F/G}$  sa nachádza 47 bp v proti smere transkripcie od predpokladaného  $\sigma^H$ -závislého promótoru. Na základe týchto informácií bola vytvorená plno dĺžková promótorová oblasť (**Obr. 16**). V rámci celej promótorovej oblasti boli identifikované aj väzbové miesta pre transkripčný faktor Spo0A (Stephenson a Hoch 2002).

Transkripčnými experimentami *in vitro* sme zaznamenali veľmi slabú transkripčnú aktivitu promótorov *refZ* v prítomnosti každého z faktorov  $\sigma$  ( $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$ ). Transkripčná aktivita promótorov *refZ* v porovnaní s vegetatívnym silným promótorom *Pveg* (Fukushima *et al.* 2003) je 100 násobne nižšia. Na základe toho môžeme povedať, že transkripčná aktivita promótorov *refZ* bez akýchkoľvek aditívnych transkripčných faktorov je veľmi slabá. Zároveň v úvodnom experimente promótor  $\sigma^{F/G}$  (**Obr. 25**) vykazoval nižšiu aktivitu ako promótor závislý na  $\sigma^H$ . Na základe toho bola stanovená optimálna koncentrácia RNAP :  $\sigma$  (RNAP :  $\sigma^F/\sigma^G$ ) titračnou radou. Transkripčná aktivita promótoru  $\sigma^{F/G}$  bola vyššia pri zvyšujúcich sa koncentráciách oboch faktorov  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$ . Pozorované zvýšenie transkripčnej aktivity je vyššie v prítomnosti faktora  $\sigma^G$ . Tieto výsledky naznačujú, že nami predpokladaný promótor  $\sigma^{F/G}$  svojím konsenzom sekvencie vyhovuje pravdepodobne viac faktoru  $\sigma^G$ . Overenie tohto pozorovania môže byť predmetom ďalšieho skúmania.

Keďže transkripčná aktivita promótorov *refZ* s uvádzanými faktormi  $\sigma$  nebola dostatočne silná, bolo otázkou, čo ich aktivitu zvyšuje. Autori Fujita *et al.* (2005) uvádzajú transkripčný faktor Spo0A ako pozitívny regulátor expresie génov so  $\sigma^H$  závislým promótorom. Zároveň gén *refZ* zaradili do skupiny génov s promótorom závislým na  $\sigma^H$ , ktorých expresia je aktivovaná vysokou prahovou hladinou Spo0A. Výsledok nízkej transkripčnej aktivity z promótoru závislého na  $\sigma^H$  pri absencii ďalších faktorov teda nebol prekvapivý. Možná stimulácia promótoru závislého na  $\sigma^H$  potom bola predpovedaná na základe našej bio-informatickej analýzy. Na overenie efektu Spo0A v transkripčných reakciách *in vitro* bol gén Spo0A klonovaný a následne izolovaný cez histidínovú kotvu pomocou

afinitnej chromatografie. Izolovaný transkripčný faktor Spo0A bol následne využitý v titračnej rade v transkripčných reakciách *in vitro*. Vykonané transkripčné experimenty *in vitro* potvrdili predpokladaný pozitívny vplyv Spo0A na expresiu *refZ* s promótorom závislým na  $\sigma^H$  tak, ako uvádzajú autori Fujita *et al.* (2005). Dokonca možno povedať, že aktivita promótoru závislého na  $\sigma^H$  *refZ* je závislá na vysokej hladine Spo0A (**Obr. 25**).

Efekt Spo0A na  $\sigma^{F/G}$ -závislý promótor *refZ* bol rovnako testovaný v titračnej rade transkripčných reakcií *in vitro*. Na základe výsledkov môžeme povedať, že Spo0A má výraznejšie vplyv na  $\sigma^G$  závislú transkripciu než na  $\sigma^F$  závislú transkripciu. Pozitívny efekt Spo0A je zaujímavý, pretože  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  patria do skupiny  $\sigma$  faktorov prespóry a transkripčný faktor Spo0A sa v tomto kompartmente prirodzene nevyskytuje. Dokonca štúdia Fujita a Losick (2003) ukázala, že aktivovaná forma Spo0A v budúcej prespóre negatívne narúša sporuláciu. Naše výsledky ukazujú, že Spo0A síce zvyšuje aktivitu promótoru závislého na  $\sigma^G$  a  $\sigma^F$ , avšak nie tak výrazne, ako z promótoru závislého na  $\sigma^H$ . Transkripčná aktivita zo  $\sigma^{F/G}$  závislého promótoru pri najvyššej koncentrácii Spo0A klesla. Dokonca zo  $\sigma^G$  závislého promótoru transkripčná aktivita klesla pod úroveň transkripcie bez Spo0A (**Obr. 26B**). Výsledky naznačujú, že promótor závislý na  $\sigma^G$  potrebuje pre zvýšenie transkripčnej aktivity omnoho nižšiu koncentráciu Spo0A, než promótor závislý na  $\sigma^H$ . Zároveň môžeme povedať, že gén *refZ* sa pravdepodobne môže v prespóre transkribovať, dokonca zvyškové Spo0A v prespóre môže mať potenciál zvyšovať úroveň transkripcie v prespóre. Vplyv Spo0A na  $\sigma^F$  závislú transkripciu z promótoru *PrefZ* je pozorovaný, avšak nie je tak evidentný, než z promótoru závislého  $\sigma^H$  a  $\sigma^G$ .

Na základe predchádzajúcich optimalizačných experimentov sme navrhli a vykonali súhrnný experiment, zachytávajúci promótorovu aktivitu oblasti pred génom *refZ*. Na porovnanie vplyvu Spo0A na transkripčnú aktivitu zo  $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  závislých promótorov bola zvolená jednotná koncentrácia Spo0A. Zároveň bola vykonaná transkripcia bez Spo0A. Z výsledkov vyplýva, že najvyšší pozitívny efekt na zvýšenie aktivity promótorov má Spo0A na  $\sigma^H$  závislý promótor, pozorovali sme až 60 násobné zvýšenie aktivity. U promótoru závislého na  $\sigma^G$  sme pozorovali trojnásobné zvýšenie aktivity v prítomnosti Spo0A. Vplyv Spo0A na promótor závislý na  $\sigma^F$  bol najnižší, pozorovali sme len dvojnásobné zvýšenie promótorovej aktivity. Na záver môžeme povedať, že transkripcia *refZ* môže prebiehať z promótorov závislých na  $\sigma^H$  a  $\sigma^{F/G}$ . Promótor  $\sigma^H$  sa javí ako hlavný a jeho aktivita je silno stimulovaná Spo0A. Transkripcia zo  $\sigma^{F/G}$  závislého promótoru je slabšia, jej stimulácia faktorom Spo0A nie je zrejmá (**Obr. 27**). Jednako aj táto relatívne nízka expresia môže byť dôležitá v prespóre napr. pri usporiadaní DNA v jej priestore prostredníctvom *RefZ* a jeho väzbových miest na DNA a interakcii s membránou.

## 10.2 Promótorová aktivita génu *refZ* *in vivo*

Promótorova aktivita *refZ* v transkripčnom systéme *in vitro* bola overená prístupmi *in vivo*. Pre overenie vplyvu Spo0A na promótor závislý na  $\sigma^H$  bol vytvorený kmeň so skrátenou promótorovou oblasťou. Promótorova oblasť obsahovala len promótor závislý na  $\sigma^H$  bez Spo0A väzbových miest.

Predpokladali sme, že v takomto kmeni by mala byť výrazne nižšia expresia *refZ* v systéme *in vivo*. Vychádzali sme z predchádzajúcich výsledkov transkripcie *in vitro* a práce Fujita *et al.* (2005), ktorí uvádzajú faktor Spo0A ako pozitívny regulátor expresie génov so  $\sigma^H$  závislým promótorom. Ďalším predpokladom bolo, že expresia *refZ* s promótorom závislým na  $\sigma^H$  by mala byť detegovaná v skorom štádiu sporulácie. V pokročilom sporulačnom štádiu IV-V by expresia *refZ* z promótoru závislého na  $\sigma^H$  nemala byť pozorovaná, keďže faktor  $\sigma^H$  v tomto štádiu už nie je aktívny. Aktivita faktoru  $\sigma^H$  je uvádzaná v skorom štádiu, kedy riadi expresiu génov, ktoré riadia prechod do sporulačného štádia (Grossman 1995). Na overenie tejto hypotézy bol vytvorený kmeň s plno dĺžkovým promótorom, ktorý obsahoval všetky predpokladané promótory ( $\sigma^H$  závislý promótor;  $\sigma^{F/G}$  závislý promótor) a väzbové miesta pre Spo0A. Keďže v transkripčných reakciách bola pozorovaná promótorova aktivita *refZ* z promótoru závislého na  $\sigma^{F/G}$ , očakávali sme expresiu *refZ* v neskorších štádiách sporulácie, kedy sú faktory  $\sigma^F$  a  $\sigma^G$  aktívne v prespóre (de Hoon *et al.* 2010). Zároveň by mal mať tento kmeň fenotyp podobný divokému typu. Ako pozitívnu kontrolu, divoký typ, sme zvolili bakteriálny kmeň s *refZ-gfp* v natívnom lokuse *B. subtilis*.

Promótorova aktivita *refZ* vo všetkých troch uvedených kmeňoch bola meraná prístrojom TECAN. Výsledky prekvapivo ukazujú, že i kmeň so skráteným  $\sigma^H$  závislým promótorom vykazuje podobnú aktivitu ako kmeň s plno dĺžkovým promótorom alebo kmeň s *refZ-gfp* v natívnom lokuse. Z tohto dôvodu sme požiadali kolegu Ing. Mareka Schwarza, PhD o bio-informatickú analýzu. V rámci nej bola skúmaná prítomnosť Spo0A väzbových miest aj na samotnom plazmide pDG1664 využitého na prípravu konštruktov pre účely experimentov *in vivo*. Analýza potvrdila prítomnosť Spo0A väzbových miest v oblasti *upstream* od klonovacieho miesta *EcoRI* (Prílohy, **Obr. S3**), čo pravdepodobne spôsobuje pozorovanie fenotypu podobného divému kmeňu aj u kmeňa so skráteným  $\sigma^H$  závislým promótorom. Pravdepodobne teda nastala nechcená stimulácia transkripcie.

Výsledky z meraní TECAN sme overili mikroskopickou analýzou SIM s rovnakou hypotézou. Expresia *refZ* v sporulačnom štádiu 0-I bola vo všetkých pozorovaných kmeňoch je približne rovnaká (**Obr. 29A**). V tomto štádiu by expresia génov mala prebiehať z promótoru závislého na  $\sigma^H$ . V prípade kmeňa so skráteným  $\sigma^H$  závislým promótorom (bez Spo0A väzbových miest) však opäť nebolo v bunke detegované nižšie zastúpenie proteínu RefZ (RefZ-GFP). Výsledky u tohto kmeňa teda nemožno použiť na overenie pôvodnej hypotézy. V budúcnosti bude potrebné zvoliť iný vektor a prvotne u neho vykonať dôslednú analýzu prítomnosti Spo0A väzbových miest.

V sporulačnom štádiu II, po vytvorení asymetrického septa, bola úroveň detegovaného RefZ v materskej bunke približne rovnaká u všetkých troch kmeňov (**Obr. 29B**). V prespóre sme celkovo detegovali výrazne nižšie množstvo RefZ ako v materskej bunke (**Obr. 29B**). V tomto štádiu je v prespóre už aktivovaný faktor  $\sigma^F$ , ktorý riadi expresiu génov so  $\sigma^F$  závislým promótorom (Wang *et al.* 2006). V kmeňoch s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse je RefZ (RefZ-GFP) detegované v prespóre vo vyššej



miere, než u divokého kmeňa. Tento efekt je pravdepodobne spôsobený lokalizáciou *refZ-gfp* v genóme, keďže ektopický *thrC* lokus sa v rámci genómu nachádza bližšie ku *oriC* než *refZ*. Z tohto dôvodu konštrukty s *refZ-gfp* v ektopickom (*thrC*) lokuse majú pravdepodobne vyššiu šancu exprimovať skôr z promotóra závislého na  $\sigma^F$  v prespóre a zvyšovať efekt oproti divokému typu. Nadprodukcia RefZ (RefZ-GFP) v prespóre v divokom kmeni pravdepodobne prirodzene nastáva neskôr. Taktiež je otázna prítomnosť a vplyv faktoru Spo0A v tomto štádiu a to ako veľmi prispieva ku zvýšeniu aktivity promotóra, keďže autori Fujita a Losick (2003) uvádzajú, že aktivovaná forma Spo0A v budúcej prespóre negatívne narúša sporuláciu. Ak by sme predpokladali, že expresia *refZ* v prespóre prebieha a detegovaný RefZ (RefZ-GFP) nie je proteín vytvorený z predchádzajúceho štádia, tak možno povedať, že expresia z promotóra závislého na  $\sigma^F$  v prespóre je veľmi nízka, tak ako to bolo v prípade transkripčných experimentov *in vitro*.

Fenotyp v sporulačnom štádiu IV-V sa medzi divokým typom a kmeňmi s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse (plno dĺžkový promotór/skrátený  $\sigma^H$  závislý promotór) výrazne líšil (**Obr. 29C**). V divokom kmeni bunky vykazovali prevažne fenotyp bez detekcie RefZ (RefZ-GFP). Kmeň s plno dĺžkovým promotórom vykazoval fenotyp, v ktorom bolo RefZ (RefZ-GFP) najviac detegované v prespóre, konkrétne v bodoch okolo celej vytvorenej prespóry. V tomto štádiu sporulácie prebieha expresia génov so  $\sigma^G$  závislým promotórom (Doan et al. 2009). Je evidentné, že v kmeni s *refZ-gfp* v ektopickom lokuse je zvýšená jeho expresia a teda aj detekcia RefZ oproti kmeňu s *refZ-gfp* v natívnom lokuse. Rozdielnosť medzi kmeňmi s veľkou pravdepodobnosťou spôsobuje už spomínaná lokalizácia *refZ-gfp* v rámci genómu v nami vytvorených kmeňoch. V divokom kmeni expresia *refZ* z promotóra závislého na  $\sigma^G$  nastáva pravdepodobne neskôr a pre toto overenie bude potrebné vykonať ďalšie experimenty.

Súhrnne výsledky ukazujú, že expresia *refZ* prebieha prednostne z promotóra závislého na  $\sigma^H$  aj keď sa nepodarilo potvrdiť hypotézu nízkej transkripčnej aktivity zo skráteneho  $\sigma^H$  závislého promotóra bez Spo0A väzbových miest. Prístupmi *in vivo* sa nám však nepodarilo potvrdiť ani vyvrátiť expresiu z promotóra závislého na  $\sigma^{F/G}$  kvôli nevhodne zvolenému klonovaciemu vektoru. To spôsobilo, že ani jeden z ektopických konštruktov nemimikuje biologickú realitu natívneho konštruktu, pričom je dôležité poznamenať, že umiestnenie *refZ-gfp* v *thrC* lokuse pravdepodobne spôsobuje skoršiu expresiu *refZ-gfp* než natívny lokus *refZ*. Do budúca dôležitou všeobecnou informáciou je teda aj poznatok, že pri tvorbe ektopických integrácií je nutná obozretnosť ohľadom použitého vektora aj miesta integrácie.

### 10.2.1 Lokalizácia RefZ v sporulácii

Ďalším cieľom v rámci tejto diplomovej práce bolo identifikovať lokalizáciu RefZ v bunke počas sporulácie v rovnakých troch vývojových štádiách, ktoré boli uvedené vyššie.

V sporulačnom štádiu 0-I pred vytvorením asymetrického septa sme detegovali lokalizáciu RefZ (RefZ-GFP) najčastejšie v bodoch, ktoré boli lokalizované z vnútornej časti membrány bunky. To sme zaznamenali vo všetkých troch pozorovaných kmeňoch. Difúzne lokalizované RefZ (RefZ-GFP) bolo

zastúpené minimálne s najčastejším zastúpením v kmeni s *refZ-gfp* v natívnom lokuse. Keďže RefZ (RefZ-GFP) najčastejšie lokalizovalo v bodoch z vnútornej strany membrány bol pre každú bunku zaznamenaný počet bodov. Čo sa týka zastúpenia počtu bodov v bunke môžeme povedať, že z tohto hľadiska kmene s umiestnením *refZ-gfp* v ektopickom lokuse pod rozdielnym promótorom (skrátene  $\sigma^H$  závislý/plno dĺžkový) nemimikujú divoký typ. U buniek s *ref-gfp* v natívnom lokuse dominuje jeden bod RefZ (RefZ-GFP). Taktiež majú významné zastúpenie bunky s 3 bodmi RefZ (RefZ-GFP). U kmeňa s plno dĺžkovým promótorom *refZ* a so skrátene  $\sigma^H$  závislým promótorom dominoval taktiež jeden bod, avšak početnosť ďalších bodov sa v porovnaní s divokým typom líšil. V štúdiu od autorov Wagner-Herman *et al.* (2012) v čase pred vytvorením asymetrického septa v 60 minúte od iniciácie sporulácie detegovali RefZ difúzne alebo v podobe jedného slabého bodu na oboch póloch bunky. Fenotyp difúzneho RefZ v našom prípade vykazoval v malej miere kmeň s *refZ-gfp* v natívnom lokuse. Tento rozdiel môže byť spôsobený zaznamenaním buniek v inom časovom bode, ako v štúdiu od autorov Wagner-Herman *et al.* (2012) a taktiež využitím iného typu mikroskopie.

V sporulačnom štádiu II po vytvorení asymetrického septa na póle bunky, bola lokalizácia RefZ (RefZ-GFP) najviac pozorovaná v materskej časti bunky v bodoch z vnútornej časti membrány bunky. Najčastejšie sa jednalo o zastúpenie 2 bodov RefZ (RefZ-GFP) vo všetkých troch kmeňoch. Lokalizácia týchto bodov bola často pozorovaná na krajoch polárneho septa z materskej časti bunky. Barák a Muchová (2018) uvádzajú, že Min systém pravdepodobne blokuje tvorbu sporulačného septa v blízkosti pólov zatiaľ čo RefZ by mal zabráňovať vo vytvorení asymetrického septa ďalej než v 1/6 od najbližšieho póla. Naše pozorovanie lokalizácie RefZ by mohlo podporovať myšlienku blokácie vytvorenia asymetrického septa za strany materskej bunky.

Lokalizácia RefZ (RefZ-GFP) v sporulačnom štádiu IV-V je popisovaná vyššie v rámci diskusie.

### 10.3 Interakčiom proteínu RefZ

O interakčných partneroch RefZ nie je veľmi známe. Mikroskopickou analýzou SIM bola detegovaná lokalizácia RefZ (RefZ-GFP) v rámci bunky počas sporulácie. Cieľom bolo rozšíriť znalosti o komplexoch, v ktorých sa RefZ môže nachádzať. Určili sme interakčných partnerov proteínu RefZ po 6 hodinách od prenasadenia kultúry do sporulačného média. Rovnaké časové podmienky boli dodržané aj v mikroskopii SIM, keby boli pozorované bunky v 3 štádiách (v kultúre bola ich zmes). Bunky sa vyskytovali v sporulačnom štádiu 0-I pred vytvorením asymetrického septa, II po vytvorení asymetrického septa a v štádiu IV-V s vytvorenou prespórou. Z tohto dôvodu nemožno presne určiť, v ktorom štádiu detegované proteíny interagujú s RefZ. V dôsledku toho bude nižšie uvedený zoznam interakčných partnerov, ktorých funkcia bude diskutovaná. Zároveň z výsledkov tohto experimentu nemožno potvrdiť ani vyvrátiť priamu väzbu medzi proteínmi. Overenie priamej interakcie proteínov môže byť predmetom ďalšieho skúmania.

Imunoprecipitačnou metódou bol izolovaný proteín RefZ s interakčnými partnermi prostredníctvom interakcie protilátky anti-flag s 3xFLAG proteínom na C-konci proteínu RefZ. Hmotnostná spektrometria vykonaná Dr. Martinom Hubálkom (UOCHB, Praha) nám poskytla dáta so zoznamom proteínov interaktomu RefZ. Identifikované proteíny boli rozdelené do troch hlavných kategórii. Do prvej kategórie boli zaradené proteíny s funkciou v sporulácii, do druhej kategórie boli zaradené proteíny zapojené do delenia buniek. Do tretej kategórie patrili všetky ostatné proteíny, ktoré nespádali do kategórie sporulačných proteínov alebo proteínov delenia. Konkrétne do tretej kategórie spadalo 68 proteínov a ich funkcia nebude diskutovaná.

Do prvej kategórie sporulačných proteínov, ktoré boli identifikované ako interakčný partneri RefZ bolo zaradených 9 proteínov (YaaT, SpoIIQ, SpoIIB, SpoVD, KinE, FtsX, SpoIIAA, YngE, YngF, YwqJ).

Interakčný partner YaaT je proteín, ktorý zohráva úlohu v sporulačnom štádiu 0 zúčastňujúci sa fosforylačnej dráhy vedúcej ku aktivácii Spo0A (Hosoya *et al.* 2002). Zároveň Hosoya *et al.* (2002) pozorovali lokalizáciu YaaT počas sporulácie na okraji asymetrického septa v podobe dvoch bodov. V nami vykonanej mikroskopickej analýze sme pozorovali lokalizáciu RefZ taktiež na okrajoch asymetrického septa v podobe dvoch bodov. Na základe pravdepodobne veľmi podobnej lokalizácie možno povedať, že RefZ spolu s YaaT vytvárajú s ďalšími proteínmi komplex, ktorý usmerňuje lokalizáciu asymetrického septa na póle bunky.

SpoIIQ je súčasťou trans-membránového spojovacieho kanála medzi materskou bunkou a prespórou. Zároveň SpoIIQ je potrebný pre správne umiestnenie a stabilizáciu fosfatázy SpoIIE (Flanagan *et al.* 2016). Proteín SpoIIE priamo interaguje cez doménu II s proteínom FtsZ (Lucet *et al.* 2000). Podľa Barák a Muchová (2018) SpoIIE má významnú úlohu v umiestnení asymetrického septa na póle sporulujúcej bunky pretože jeho delícia spôsobuje posun asymetrického septa z 1/6 bunky na 1/4 bunky. Interakciu RefZ so SpoIIE sme nezaznamenali avšak môžeme predpokladať, že SpoIIE môže vytvárať proteínový komplex s RefZ interakciou cez FtsZ a SpoIIQ prípadne YaaT. Na overenie tohto predpokladu bude potrebné vykonať ďalšie experimenty.

Identifikovaný proteín SpoIIB zabezpečuje správne umiestnenie komplexu SpoIID-SpoIIM-SpoIIP (DMP komplex) v blízkosti asymetrického septa počas sporulácie. Neprítomnosť proteínu SpoIIB vedie ku nesprávnej lokalizácii komplexu DMP, neefektívnej hydrolýze peptidoglykánu a narušenému *engulfmentu* (Chan *et al.* 2022). Interakcia SpoIIB s RefZ môže napomáhať správnej lokalizácii komplexu DMP. Taktiež je možné, že SpoIIB je súčasťou proteínového komplexu, ktorý určuje lokalizáciu asymetrického septa na póle bunky.

Ďalšími identifikovanými sporulačným interakčným partnerom je proteín SpoVD, ktorý lokalizuje na povrchu spóry prostredníctvom interakcie so SpoVM (Krajčíková *et al.* 2021). SpoVM potom rozpoznáva povrch spóry prostredníctvom jeho konvexného tvaru (Ramamurthi *et al.* 2009). Interakcia

SpoVD s RefZ by mohla vysvetľovať pozorovanie z mikroskopie SIM vykonanej v tejto práci, kedy bolo RefZ (RefZ-GFP) lokalizované v prespóre z vnútornej strany membrány. V prespóre sa nachádza tiež proteín SpoIIAA, anti-anti  $\sigma$  faktor regulujúci aktivitu faktoru  $\sigma^F$  (Igoshin *et al.* 2006).

Kináza KinE fosforyluje Spo0F v rámci iniciácie sporulácie (Jiang *et al.* 2000). FtsX je membránový proteín, podieľa sa na správnej aktivácii Spo0A v skorom štádiu sporulácie. Proteíny YngE a YngF sú proteíny metabolizmu materskej bunky. Funkcia YwqJ nie je doposiaľ identifikovaná.

Do druhej kategórie proteínov delenia bolo zaradených 12 proteínov (FtsZ, RecD2, DnaX, SsbA, ParE, SftA, PlsX, LdcB, MreBH, RodZ, PbpC).

V literárnych zdrojoch je doposiaľ FtsZ proteín uvádzaný ako jediný interakčný partner RefZ. Proteín FtsZ vytvára Z-kruh počas vegetatívneho delenia bunky v jej strede alebo na póloch bunky v skorom štádiu sporulácie (de Boer *et al.* 1992; Ben-Yehuda a Losick 2002). Jednou z funkcií RefZ je regulácia FtsZ proteínu, konkrétne uľahčuje jeho prechod zo stredu bunky smerom ku pólom v rannom štádiu sporulácie (Wagner-Herman *et al.* 2012). Autori Wagner-Herman *et al.* (2012) sa pokúšali overiť priamu väzbu RefZ na FtsZ proteín prostredníctvom bakteriálneho a kvasinkového dvojhybridného systému a biochemickými prístupmi *in vitro*. Na základe ich výsledkov nemožno potvrdiť ani vylúčiť priamu väzbu RefZ na FtsZ. Naše výsledky potvrdzujú ciele RefZ na FtsZ, avšak ani z našich výsledkov nie je možné potvrdiť priamu väzbu RefZ na FtsZ.

Proteín RecD2 bol zaradený do skupiny proteínov zúčastňujúcich sa replikácie v rámci bunkového delenia. RecD2 sa zúčastňuje replikácie pričom napomáha prekonať replikačný stres odstraňovaním jeho interakčného partnera RecA z jednovláknovej DNA. RecD2 slúži, ako negatívny regulátor vlákna RecA na jednovláknovej DNA (Ramos *et al.* 2022). Ďalšími identifikovanými proteínmi, ktoré interagujú s RefZ a DNA boli DnaX (DNA polymeráza III), SsbA (proteín viažuci sa na ssDNA), ParE (podjednotka DNA topoizomerázy IV), SftA (DNA translokáza). Interakcia RefZ s proteínmi interagujúcimi s DNA nie je prekvapivá, pretože samotný RefZ je klasifikovaný ako DNA väzbový proteín viažuci sa na RBMs väzbové domény na DNA (Wagner-Herman *et al.* 2012). Prítomnosť ďalších DNA väzbových proteínov môže byť v tomto prípade spôsobená artificieľne, cez DNA viazanú na RefZ.

Proteín PlsX je fosfátová acetyl-transferáza, ktorá u *B. subtilis* lokalizuje do regiónov so zvýšenou fluiditou membrány (RIFs) (Müller *et al.* 2016). V štúdiu od autorov Müller *et al.* (2016) bol PlsX zaznamenaný v bodových ohniskách vo fáze Log (rýchla fáza rastu). Predpokladá sa, že práve mikrodomény s nižšou fluiditou membrány môžu slúžiť ako platforma na organizáciu proteínov pre fyziologicky dôležité procesy bunky (Jiang *et al.* 2019). V ďalšom skúmaní by bolo zaujímavé pozorovať lokalizáciu PlsX v rannom štádiu sporulácie. Interakcia RefZ s PlsX naznačuje, že PlsX spolu s RefZ lokalizuje práve v RIFs. Mikrodomény RIFs by mohla slúžiť ako „značka“ spolu s PlsX pre väzbu RefZ a ostatných interakčných partnerov v špecifickom mieste bunky, ktoré by determinovalo

umiestnenie a lokalizáciu asymetrického septa v skorom sporulačnom štádiu. Pre ich overenie budú potrebné ďalšie experimenty.

Proteín LdcB je LD-karboxypeptidáza, uvoľňuje D-alanín a podieľa sa na syntéze bunkovej steny. Ďalšími identifikovanými proteínmi interagujúcimi s RefZ boli MreBH a RodZ. Proteín RodZ priamo interaguje s proteínmi MreB, MreBI, MreBH, MreD a spolu sa podieľajú na determinácii a udržovaní správneho tvaru bunky *B. subtilis* (Carballido-López *et al.* 2006; Muchová *et al.* 2013). V rámci tejto diplomovej práce bola pozorovaná SIM mikroskopiou lokalizácia RefZ v štádiu 0-I v niekoľkých bodových ohniskách z vnútornej strany membrány bunky. Interakcia s proteínmi MreBH a RodZ, ktoré lokalizujú z vnútornej strany membrány bunky nie je prekvapivá. Funkcia proteínu PbpC nie je známa.

Na záver možno povedať, že niektorí identifikovaní interakční partneri RefZ sa pravdepodobne podieľajú na tvorbe proteínového komplexu, ktorý determinuje fyziologické umiestnenie asymetrického septa v 1/6 bunky. Na potvrdenie tejto hypotézy je však potrebné vykonať ďalšie experimenty so zameraním na recipročné overenie jednotlivých interakcií *in vivo/in vitro*.

## 11 Záver

Táto práca priniesla nové poznatky o sporulácii u *B. subtilis* a úlohe proteínu RefZ v tomto procese.

Bio-informatickou analýzou boli v rámci sekvencie predchádzajúcej gén *refZ* identifikované promótorov závislé na  $\sigma^H$  a  $\sigma^{FG}$  spolu s väzbovými miestami pre transkripčný faktor Spo0A. Podľa tejto analýzy bol pripravený plno dĺžkový promótorový konštrukt a faktor Spo0A. Aktivita plno dĺžkového promótoru bola overená transkripčnými experimentami *in vitro*. Potvrdili sme aktivitu všetkých promótorov a závislosť ich aktivity na faktore Spo0A. Dominantným promótorom bol  $\sigma^H$  závislý promótor aktívny v skorých fázach sporulácie. Jeho aktivita bola rádovo stimulovaná faktorom Spo0A. Promótor závislý na  $\sigma^{FG}$  vykazoval slabšiu aktivitu. Špekulujeme, že táto aktivita promótoru sa môže podieľať na expresii RefZ v prespóre.

Aktivita promótorov bola ďalej overená prístupmi *in vivo* na konštrukte *refZ-gfp* s plno dĺžkovým promótorom, skráteným promótorom závislým na  $\sigma^H$  a natívnym promótorom. Zároveň bola určená lokalizácia RefZ (RefZ-GFP) v troch sporulačných štádiách *B. subtilis* – od difúzneho rozptylu (fáza 0-I) až po bodovú lokalizáciu na asymetrickom septe, a to zo strany materskej bunky (fáza II).

Ďalej boli identifikovaní interakční partneri RefZ počas sporulácie u *B. subtilis*.

Tieto výsledky prispeli ku charakterizácii expresie génu *refZ*, identifikácii promótorov génu *refZ* a definovaniu lokalizácie RefZ (RefZ-GFP) v bunke počas sporulácie u *B. subtilis*. Identifikovanie interakčných partnerov proteínu RefZ prispelo ku vytvoreniu obrazu interakcie RefZ v priebehu sporulácie a ku smerovaniu budúcich experimentov.

Výsledky tejto práce sú súčasťou pripravovaného rukopisu o proteíne RefZ a jeho úlohe počas sporulácie u *B. subtilis*.

## 12 Použitá literatura

- ALPER, Scott, Leonard DUNCAN a Richard LOSICK, 1994. An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* [online]. **77**(2), 195–205.
- BAGYAN, Irina, Jan HOBOT a Simon CUTTING, 1996. A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* [online]. **178**(15), 4500–7.
- BARÁK Imrich a Katarína MUCHOVÁ, 2018. The positioning of the asymmetric septum during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PloS one* [online]. **13**(8), e0201979.
- BARÁK Imrich, Katarína MUCHOVÁ a Nad'a LABAJOVÁ, 2019. Asymmetric cell division during *Bacillus subtilis* sporulation. *Future Microbiology* [online]. **14**(4), 353–363.
- BARÁK, Imrich a Philip YOUNGMAN, 1996. SpoIIE mutants of *Bacillus subtilis* comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for the SpoIIE protein. *Journal of bacteriology* [online]. **178**(16), 4984–9.
- BEN-YEHUDA, Sigal a Richard LOSICK, 2002. Asymmetric Cell Division in *B. subtilis* Involves a Spiral-like Intermediate of the Cytokinetic Protein FtsZ. *Cell* [online]. **109**(2), 257–266.
- BLENCKE, Hans-Matti, Georg HOMUTH, Holger LUDWIG, Ulrike MÄDER, Michael HECKER a Jörg STÜLKE, 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic engineering* [online]. **5**(2), 133–49.
- BRADFORD, M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* [online]. **72**(5), 248–54.
- BRITTON, Robert A., Patrick EICHENBERGER, Jose Eduardo GONZALEZ-PASTOR, Paul FAWCETT, Rita MONSON, Richard LOSICK a Alan D. GROSSMAN, 2002. Genome-Wide Analysis of the Stationary-Phase Sigma Factor (Sigma-H) Regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* [online]. **184**(17), 4881–4890.
- BRON, Sierd, Rob MEIMA, Jan Maarten VAN DIJL, Anil WIPAT a Colin R HARWOOD, 1999. Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* species. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. 4–49.
- BROWN, Emily E, Allyssa K MILLER, Inna V KRIEGER, Ryan M OTTO, James C SACCHETTINI a Jennifer K HERMAN, 2019. A DNA-Binding Protein Tunes Septum Placement during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Journal of Bacteriology* [online]. **201**(16), 1–22.
- BYLUND, J. E., M. A. HAINES, P. J. PIGGOT a M. L. HIGGINS, 1993. Axial filament formation in *Bacillus subtilis*: induction of nucleoids of increasing length after addition of chloramphenicol to exponential-phase cultures approaching stationary phase. *Journal of bacteriology* [online]. **175**(7), 1886–90.
- CAMP, Amy H. a Richard LOSICK, 2009. A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* [online]. **23**(8), 1014–1024.
- CAMP, Amy H., Anna F. WANG a Richard LOSICK, 2011. A small protein required for the switch from {sigma}F to {sigma}G during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* [online]. **193**(1), 116–24.
- CARBALLIDO-LÓPEZ, Rut, Alex FORMSTONE, Ying LI, S. Dusko EHRlich, Philippe NOIROT a Jeff ERRINGTON, 2006. Actin Homolog MreBH Governs Cell Morphogenesis by Localization of the Cell Wall Hydrolase LytE. *Developmental Cell* [online]. **11**(3), 399–409.
- CHAN, Helena, Najwa TAIB, Michael C. GILMORE, Ahmed M.T. MOHAMED, Kieran HANNA, Johana LUHUR, Hieu NGUYEN, Elham HAFIZ, Felipe CAVA, Simonetta GRIBALDO, David

- RUDNER a Christopher D.A. RODRIGUES, 2022. Genetic Screens Identify Additional Genes Implicated in Envelope Remodeling during the Engulfment Stage of *Bacillus subtilis* Sporulation. *mBio* [online]. **13**(5).
- CHEN, Jie, Seth A. DARST a D. THIRUMALAI, 2010. Promoter melting triggered by bacterial RNA polymerase occurs in three steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **107**(28), 12523–8.
- DE BOER, Piet, Robin CROSSLEY a Lawrence ROTHFIELD, 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* [online]. **359**(6392), 254–256.
- DE HOON, Michiel J.L., Patrick EICHENBERGER a Dennis VITKUP, 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Current Biology* [online]. **20**(17), R735–R745.
- DE HOON, Michiel J L, Patrick EICHENBERGER a Dennis VITKUP, 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Current biology : CB* [online]. **20**(17), R735-45.
- DECATUR, A a R LOSICK, 1996. Identification of additional genes under the control of the transcription factor sigma F of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* [online]. **178**(16), 5039–41.
- DOAN, Thierry, Cecile MORLOT, Jeffrey MEISNER, Monica SERRANO, Adriano O. HENRIQUES, Charles P. MORAN a David Z. RUDNER, 2009. Novel secretion apparatus maintains spore integrity and developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS genetics* [online]. **5**(7),
- DUBNAU, D. a R DAVIDOFF-ABELSON, 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *Journal of molecular biology* [online]. **56**(2), 209–21.
- DUBNAU, E., J. WEIR, G. NAIR, L. CARTER, C. MORAN a I. SMITH, 1988. *Bacillus* sporulation gene spo0H codes for sigma 30 (sigma H). *Journal of bacteriology* [online]. **170**(3), 1054–62.
- DUNCAN, L. a R. LOSICK, 1993. SpoIIAB is an anti-sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein sigma F from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **90**(6), 2325–9.
- DUNCAN, Leonard, Scott ALPER, Fabrizio ARIGONI, Richard LOSICK a Patrick STRAGIER, 1995. Activation of Cell-Specific Transcription by a Serine Phosphatase at the Site of Asymmetric Division. *Science*[online]. **270**(5236), 641–644.
- ERRINGTON, Jeffery, 1996. Determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Trends in Genetics* [online]. **12**(1), 31–34.
- FEUCHT, Andrea, Thierry MAGNIN, Michael D. YUDKIN a Jeffery ERRINGTON, 1996. Bifunctional protein required for asymmetric cell division and cell-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Genes & development* [online]. **10**(7), 794–803.
- FLANAGAN, Kelly A., Joseph D. COMBER, Elizabeth MEARLS, Colleen FENTON, Anna F. WANG ERICKSON a Amy H. CAMP, 2016. A Membrane-embedded amino acid couples the SpoIIQ channel protein to anti-sigma factor transcriptional repression during *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of Bacteriology* [online]. **198**(9), 1451–1463.
- FUJITA, Masaya, José Eduardo GONZÁLEZ-PASTOR a Richard LOSICK, 2005. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* [online]. **187**(4), 1357–68.
- FUJITA, Masaya a Richard LOSICK, 2003. The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes & Development* [online]. **17**(9), 1166–1174.
- FUKUSHIMA, Tatsuya, Shu ISHIKAWA, Hiroki YAMAMOTO, Naotake OGASAWARA a Junichi SEKIGUCHI, 2003. Transcriptional, functional and cytochemical analyses of the veg gene in *Bacillus*



subtilis. *Journal of biochemistry* [online]. **133**(4), 475–83.

GROSSMAN, Alan D., 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics* [online]. **29**(1), 477–508.

GUÉROUT-FLEURY, A M, Niels FRANDBSEN a Patrick STRAGIER, 1996. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* [online]. **180**(1–2), 57–61.

HALDENWANG, William G., 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological reviews* [online]. **59**(1), 1–30.

HANAHAN, Douglas, 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* [online]. **166**(4), 557–580.

HAUGEN, Shanil P., Wilma ROSS a Richard L. GOURSE, 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature reviews. Microbiology* [online]. **6**(7), 507–19.

HAYWARD, Richard S., Kazuhiko IGARASHI a Akira ISHIHAMA, 1991. Functional specialization within the  $\alpha$ -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* [online]. **221**(1), 23–29.

HELMANN, John D, 1995. Compilation and analysis of *Bacillus Subtilis*  $\sigma$ A-dependent promoter sequences: Evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. **23**(13), 2351–2360.

HINTON, D.M., 2016. Prokaryotic Transcription. In: *Encyclopedia of Cell Biology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 468–480.

HOSOYA, Shigeo, Kei ASAI, Naotake OGASAWARA, Michio TAKEUCHI a Tsutomu SATO, 2002. Mutation in *yaaT* leads to significant inhibition of phosphorelay during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* [online]. **184**(20), 5545–53.

HOSOYA, Shigeo, Zuolei LU, Yousuke OZAKI, Michio TAKEUCHI a Tsutomu SATO, 2007. Cytological Analysis of the Mother Cell Death Process during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* [online]. **189**(6), 2561–2565.

HU, Yangbo a Bin LIU, 2022. Roles of zinc-binding domain of bacterial RNA polymerase in transcription. *Trends in biochemical sciences* [online]. **47**(8), 710–724.

IGOSHIN, Oleg A., Chester W. PRICE a Michael A. SAVAGEAU, 2006. Signalling network with a bistable hysteretic switch controls developmental activation of the  $\sigma$ F transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* [online]. **61**(1), 165–184.

ILLING, N. a J. ERRINGTON, 1991. Genetic regulation of morphogenesis in *Bacillus subtilis*: roles of sigma E and sigma F in prespore engulfment. *Journal of bacteriology* [online]. **173**(10), 3159–69.

JIANG, Min, Weilan SHAO, Marta PEREGO a James A. HOCH, 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* [online]. **38**(3), 535–42.

JIANG, Yiping, Xin DAI, Mingming QIN a Zhihong GUO, 2019. Identification of an amphipathic peptide sensor of the *Bacillus subtilis* fluid membrane microdomains. *Communications Biology* [online]. **2**(1), 316.

KARMAZYN-CAMPELLI, Céline, Lamy RHAYAT, Rut CARBALLIDO-LÓPEZ, Sandra DUPERRIER, Niels FRANDBSEN a Patrick STRAGIER, 2008. How the early sporulation sigma factor sigmaF delays the switch to late development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* [online]. **67**(5), 1169–80.

- KAROW, Margaret L, P GLASER a Patrick J PIGGOT, 1995. Identification of a gene, spoIIR, that links the activation of sigma E to the transcriptional activity of sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **92**(6), 2012–2016.
- KELLER, Andrew N, Xiao YANG, J. WIEDERMANNNOVA, O. DELUMEAU, L. KRASNY a Peter J LEWIS, 2014. , a New Subunit of RNA Polymerase Found in Gram-Positive Bacteria. *Journal of Bacteriology* [online]. **196**(20), 3622–3632.
- KRAJČÍKOVÁ, Daniela, Veronika BUGÁROVÁ a Imrich BARÁK, 2021. Interactions of *Bacillus subtilis* basement spore coat layer proteins. *Microorganisms* [online]. **9**(2), 1–15.
- KRÁSNÝ, Libor a Richard L. GOURSE, 2004. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *The EMBO journal* [online]. **23**(22), 4473–83.
- LARSON, Matthew H., William J. GREENLEAF, Robert LANDICK a Steven M. BLOCK, 2008. Applied force reveals mechanistic and energetic details of transcription termination. *Cell* [online]. **132**(6), 971–82.
- LEE, Jookyung a Sergei BORUKHOV, 2016. Bacterial RNA Polymerase-DNA Interaction—The Driving Force of Gene Expression and the Target for Drug Action. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. **3**(November).
- LEVIN, P A, Richard LOSICK, Patrick STRAGIER a Fabrizio ARIGONI, 1997. Localization of the sporulation protein SpoIIE in *Bacillus subtilis* is dependent upon the cell division protein FtsZ. *Molecular microbiology* [online]. **25**(5),
- LEVIN, Petra Anne a Richard LOSICK, 1996. Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes & development* [online]. **10**(4), 478–88.
- LÓPEZ DE SARO, F J, Noriko YOSHIKAWA a John D. HELMANN, 1999. Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* [online]. **274**(22), 15953–8.
- LOSICK, Richard a Patrick STRAGIER, 1992. Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* [online]. **355**(6361), 601–604.
- LUCET, Isabelle, A FEUCHT, M D YUDKIN a J ERRINGTON, 2000. Direct interaction between the cell division protein FtsZ and the cell differentiation protein SpoIIE. *The EMBO journal* [online]. **19**(7), 1467–75.
- MCKENNEY, Peter T., Adam DRIKS a Patrick EICHENBERGER, 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **11**(1), 33–44.
- MCKENNEY, Peter T. a Patrick EICHENBERGER, 2012. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* [online]. **83**(2), 245–260.
- MILLER, Allyssa K., Emily E. BROWN, Benjamin T. MERCADO a Jennifer K. HERMAN, 2016. A DNA-binding protein defines the precise region of chromosome capture during *Bacillus subtilis* sporulation. *Molecular Microbiology* [online]. **99**(1), 111–122.
- MILLER, Allyssa K. a Jennifer K. HERMAN, 2022. RefZ and Noc Act Synthetically to Prevent Aberrant Divisions during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Journal of bacteriology* [online]. **204**(6)
- MOLLE, Virginie, Masaya FUJITA, Shane T. JENSEN, Patrick EICHENBERGER, José E. GONZÁLEZ-PASTOR, Jun S. LIU a Richard LOSICK, 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* [online]. **50**(5), 1683–701
- MOLODTSOV, Vadim, Chengyuan WANG, Emre FIRLAR, Jason T. KAELBER a Richard H. EBRIGHT, 2023. Structural basis of Rho-dependent transcription termination. *Nature* [online].

614(7947), 367–374.

MORAN, Charles P., Naomi LANG, S F LEGRICE, Gloria LEE, Michael STEPHENS, A. L. SONENSHEIN, Janice PERO a Richard LOSICK, 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Molecular & general genetics : MGG* [online]. **186**(3), 339–46.

MUCHOVÁ, Katarína, Zuzana CHROMIKOVÁ a Imrich BARÁK, 2013. Control of *Bacillus subtilis* cell shape by RodZ. *Environmental Microbiology* [online]. **15**(12), 3259–3271.

MÜLLER, Anna, Michaela WENZEL, Henrik STRAHL, Fabian GREIN, Terrens N. V. SAAKI, Bastian KOHL, Tjalling SIERSMA, Julia E. BANDOW, Hans-Georg SAHL, Tanja SCHNEIDER a Leendert W. HAMOEN, 2016. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **113**(45).

MURAKAMI, Katsuhiko S. a Seth A. DARST, 2003. Bacterial RNA polymerases: The whole story. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. **13**(1), 31–39.

NEWING, Timothy P., Aaron J. OAKLEY, Michael MILLER, Catherine J. DAWSON, Simon H. J. BROWN, James C. BOUWER, Gökhan TOLUN a Peter J. LEWIS, 2020. Molecular basis for RNA polymerase-dependent transcription complex recycling by the helicase-like motor protein Held. *Nature communications* [online]. **11**(1).

PEREDES-SABJA, Daniel, Peter SETLOW a Mahfuzur R. SARKER, 2011. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends in microbiology* [online]. **19**(2), 85–94.

PARTRIDGE, S. R., D. FOULGER a J. ERRINGTON, 1991. The role of sigma F in prespore-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* [online]. **5**(3), 757–67.

PEI, Hao-Hong, Tarek HILAL, Zhuo A. CHEN, Yong-Heng HUANG, Yuan GAO, Nelly SAID, Bernhard LOLL, Juri RAPPILBER, Georgiy A. BELOGUROV, Irina ARTSIMOVITCH a Markus C. WAHL, 2020. The  $\delta$  subunit and NTPase Held institute a two-pronged mechanism for RNA polymerase recycling. *Nature communications* [online]. **11**(1), 6418.

PEREGO, M., G. B. SPIEGELMAN a J. A. HOCH, 1988. Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* [online]. **2**(6), 689–99.

PÉREZ-RUEDA, Ernesto a Julio COLLADO-VIDES, 2000. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* [online]. **28**(8), 1838–1847.

PIGGOT, Patrick J. a David W. HILBERT, 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology* [online]. **7**(6), 579–86.

POPHAM, D. L., 2002. Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* [online]. **59**(3), 426–433.

PRÁGAI, Zoltán, Nicholas E. E. ALLENBY, Nicola O'CONNOR, Sarah DUBRAC, Georges RAPOPORT, Tarek MSADEK a Colin R. HARWOOD, 2004. Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* [online]. **186**(4), 1182–90.

QI, Ying a F. Marion HULETT, 1998. PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *Molecular microbiology* [online]. **28**(6), 1187–97.

RAMAMURTHI, Kumaran S., Sigolene LECUYER, Howard A. STONE a Richard LOSICK, 2009. Geometric cue for protein localization in a bacterium. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **323**(5919), 1354–7.

RAMOS, Cristina, Rogelio HERNÁNDEZ-TAMAYO, María LÓPEZ-SANZ, Begoña CARRASCO,

- Ester SERRANO, Juan C ALONSO, Peter L GRAUMANN a Silvia AYORA, 2022. The RecD2 helicase balances RecA activities. *Nucleic acids research* [online]. **50**(6), 3432–3444.
- RODRIGUEZ AYALA, Facundo, Marco BARTOLINI a Roberto GRAU, 2020. The Stress-Responsive Alternative Sigma Factor SigB of *Bacillus subtilis* and Its Relatives: An Old Friend With New Functions. *Frontiers in Microbiology* [online]. **11**(September), 1–20.
- ROSS, W., J. F. THOMPSON, J. T. NEULANDS a R. L. GOURSE, 1990. E.coli Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *The EMBO journal* [online]. **9**(11), 3733–42.
- ROSS, Wilma, Khoosheh K. GOSINK, Julia SALOMON, Kazuhiko IGARASHI, Chao ZOU, Akira ISHIHAMA, Konstantin SEVERINOV a Richard L. GOURSE, 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase. *Science* [online]. **262**(5138), 1407–1413.
- RUFF, Emily F, M Thomas RECORD a Irina ARTSIMOVITCH, 2015. Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules* [online]. **5**(2), 1035–62.
- SALAHSHOURIFAR, I., A. S. HALIM, W. A.W. SULAIMAN a B. A. ZILFALIL, 2002. Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains, Seventh Edition Volume 4: Integration Vectors for Gram-Positive Organisms. *The bacillus genetic stock center* [online]. **90**(3), 387–391.
- SCHMIDT, R., P. MARGOLIS, L. DUNCAN, R. COPPOLECCHIA, C. P. MORAN a R. LOSICK, 1990. Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **87**(23), 9221–5.
- SERRANO, Mónica, Jin Xin GAO, João BOTA, Ashley R. BATE, Jeffrey MEISNER, Patrick EICHENBERGER, Charles P. MORAN a Adriano O. HENRIQUES, 2015. Dual-Specificity Anti-sigma Factor Reinforces Control of Cell-Type Specific Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genetics* [online]. **11**(3), 1–28.
- SERRANO, Mónica, Alexandre NEVES, Cláudio M. SOARES, Charles P. MORAN a Adriano O. HENRIQUES, 2004. Role of the anti-sigma factor SpoIIAB in regulation of sigmaG during *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of bacteriology* [online]. **186**(12), 4000–13.
- SHARP, Marc D. a Kit POGLIANO, 1999. An in vivo membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **96**(25), 14553–8.
- SOSUNOV, Vasily, 2005. The involvement of the aspartate triad of the active center in all catalytic activities of multisubunit RNA polymerase. *Nucleic Acids Research* [online]. **33**(13), 4202–4211.
- STEPHENSON, Keith a James A. HOCH, 2002. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Molecular Microbiology* [online]. **46**(2), 297–304.
- STRAGIER, Patrick a Richard LOSICK, 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics* [online]. **30**(1), 297–41.
- STRAUCH, M. A., 1995. Delineation of AbrB-binding sites on the *Bacillus subtilis* spo0H, kinB, ftsAZ, and pbpE promoters and use of a derived homology to identify a previously unsuspected binding site in the bsuB1 methylase promote. *Journal of bacteriology* [online]. **177**(23), 6999–7002.
- SUDZINOVÁ, Petra, Milada KAMBOVÁ, Olga RAMANIUK, Martin BENDA, Hana ŠANDEROVÁ a Libor KRÁSNÝ, 2021. Effects of DNA Topology on Transcription from rRNA Promoters in *Bacillus subtilis*. *Microorganisms* [online]. **9**(1), 87.
- SUN, D X, R. M. CABRERA-MARTINEZ a P. SETLOW, 1991. Control of transcription of the *Bacillus subtilis* spoIIIG gene, which codes for the forespore-specific transcription factor sigma G. *Journal of*

*bacteriology* [online]. **173**(9), 2977–84.

SUN, D X, Patrick STRAGIER a Peter SETLOW, 1989. Identification of a new sigma-factor involved in compartmentalized gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* [online]. **3**(2), 141–149.

UNGER, Tamar, Yossi JACOBOVITCH, Ada DANTES, Reut BERNHEIM a Yoav PELEG, 2010. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of structural biology* [online]. **172**(1), 34–44.

VAN BAARLE, S., I. N. CELIK, K. G. KAVAL, Marc BRAMKAMP, Leendert W HAMOEN a S. HALBEDEL, 2013. Protein-Protein Interaction Domains of *Bacillus subtilis* DivIVA. *Journal of Bacteriology* [online]. **195**(5), 1012–1021.

WAGNER-HERMAN, Jennifer K., Remi BERNARD, Roisin DUNNE, Alexandre W. BISSON-FILHO, Krithika KUMAR, Trang NGUYEN, Lawrence MULCAHY, John KOULLIAS, Frederico J. GUEIROS-FILHO a D. Z. RUDNER, 2012. RefZ Facilitates the Switch from Medial to Polar Division during Spore Formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* [online]. **194**(17), 4608–4618.

WANG, Stephanie T., Barbara SETLOW, Erin M. CONLON, Jessica L. LYON, Daisuke IMAMURA, Tsutomu SATO, Peter SETLOW, Richard LOSICK a Patrick EICHENBERGER, 2006. The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of molecular biology* [online]. **358**(1), 16–37.

WEIR, J., M. PREDICH, E. DUBNAU, G. NAIR a I. SMITH, 1991. Regulation of spo0H, a gene coding for the *Bacillus subtilis* sigma H factor. *Journal of bacteriology* [online]. **173**(2), 521–9.

WINKELMAN, Jared T, Irina O VVEDENSKAYA, Yuanchao ZHANG, Yu ZHANG, Jeremy G. BIRD, Deanne M TAYLOR, Richard L GOURSE, Richard H EBRIGHT a Bryce E. NICKELS, 2016. Multiplexed protein-DNA cross-linking: Scrunching in transcription start site selection. *Science* [online]. **351**(6277), 1090–1093.

WU, Ling Juan a Jeffery ERRINGTON, 1994. *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **264**(5158), 572–5.

YOUNGMAN, Philip, John B. PERKINS a Richard LOSICK, 1984. Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression of the transposon-borne erm gene. *Plasmid* [online]. **12**(1), 1–9.

ZHANG, Gongyi a Seth A. DARST, 1998. Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit amino-terminal domain. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **281**(5374), 262–6.

### 13 Prílohy

5'GGTAACCATTTCTGCGGTATCTCCTGCTGGACGACAGAAACAAAAAGTCGCTGAAA  
 GAGCTTGTGCATGAGGCAGATGAAGCGCTCTACAGCGCGAAACGGAGCGGGAAAAACCG  
 CTTGATGATTCATGACTCAATAAAAATAAAAAAAGCCCCAAAACGATATCAGTTTTGGGCTT  
 TTATATTACTGCGCTAACGCTTTTTCTAGCGTTTCGGCAAATTGAGTTAAGTATTTTTTCATC  
 AATTCGTCGAAACGGTTTTTCACTGGGCTGTCGATGTCCAAGACGCCGACAATTTTTCCG  
 TCTACACGAATCGGAAGCACAATTTCTGATTGAGACGCTGCATCGCAGGCGATATGTCCC  
 GGAAACGCGTTTACATCCTCAATACGTTCCACTTTTTCCGTTTGCCTACGCTGTGCCGCAA  
 CCCCTCTGCCGAAAGGAATCCGAACACATGCCGGCAGGCCTTGGAACGGACCTAACACA  
 AGCTGTCCATCCTCTTCTTTGGCAAATAGAAACCCGCCAGTTGACTTCAGGCAGCGAA  
 TGATACAGCAGTGCTGAGGCATTTGCATAGTTAGCTATTTGGTCTGTTTCGTCTTCGGTCA  
 TGGCTTCGAGCTGTTTTAGCAGAAGCTGATAGTCTTTTTCTTTATCTCCAGATTGTTTTTCG  
 ACATGGAACATGGAAAACCCTCACTTTTTCTATAATATAAAACAAAGTTCCGGCTTTTTCTG  
 CCGGCATTTGTCGATAAGTTCTTACAGGAACAGCGGCTTTCTGCTTGAATAGTATCAAGA  
 GGAAGGAGTGAGCCGT3'

**Obrázok S1: Bio-informaticky analyzovaný úsek sekvencie predchádzajúcej gén *refZ* o dĺžke 800 bp.**

**Tabuľka S1: Bio-informatickou analýzou identifikované promótorové motívy.**

Motív	<i>p</i> -hodnota	Sekvencia v smere 5'→3'
$\sigma^H$	$5,49 \times 10^{-6}$	ACAGGAACAGCGGCTTTCTGCTTGAATAGTATCAAGAG
$\sigma^{F/G}$	$6,49 \times 10^{-5}$	AACATGGAAAACCCTCACTTTTTCTATAATATA

**Tabuľka S2: Bio-informatickou analýzou identifikované väzbové miesta Spo0A.**

Číslovanie od I.-XI. je v smere 5'→3' v rámci sekvencie.

Číslo	<i>p</i> -hodnota	Sekvencia
I.	0.00373	TTCGGCA
II.	0.000971	CGTCGAA
III.	0.00453	TGTCCAA
IV.	0.000205	TGCCGCA
V.	0.000167	TGCCGAA
VI.	0.00533	ATCCGAA
VII.	0.00882	CTTGGAA
VIII.	0.00273	TTTGGCA
IX.	0.00233	TGAGGCA
X.	0.00486	TTTAGCA
XI.	0.00864	TTCGACA

5'GGTAACCATTTCTGCGGTATCTCCTGCTGGACGACAGAAACAAAAAGTCGCTGAAA  
 GAGCTTGTGCATGAGGCAGATGAAGCGCTCTACAGCGCGAAACGGAGCGGGAAAAACCG  
 CTTGATGATTCATGACTCAATAAAAATAAAAAAAGCCCCAAAACGATATCAGTTTTGGGCTT  
 TTATATTACTGCGCTAACGCTTTTTCTAGCGTTTCGGCAAATTGAGTTAAGTATTTTTTCATC  
 AATTCGTCGAAACGGTTTTTCACTGGGCTGTCGATGTCCTAACGCGGCAATTTTCATC  
 AATTCGTCGAAACGGTTTTTCACTGGGCTGTCGATGTCCTAACGCGGCAATTTTCATC  
 AATTCGTCGAAACGGTTTTTCACTGGGCTGTCGATGTCCTAACGCGGCAATTTTCATC

TCTACACGAATCGGAAGCACAATTTCTGATTGAGACGCTGCATCGCAGGCGATATGTCCC  
GGAAACGCGTTTACATCCTCAATACGTTCCACTTTTCCGTTTGCCTACGCTG**TGCCGCA**AA  
CCCCTC**TGCCGAA**AGGA**ATCCGAA**CACATGCCGGCAGGC**CTTGGA**CGGACCTAACACA  
AGCTGTCCATCCTCTTC**TTTGGCA**AAATAGAAACCCGCCAGTTGACTTCAGGCAGCGAA  
TGATACAGCAGTGC**TGAGGCA**TTTGCATAGTTAGCTATTTGGTCTGTTTCGTCTTCGGTCA  
TGGCTTCGAGCTGT**TTTAGCA**GAAAGCTGATAGTCTTTTTCTTTATCTCCAGATTGTTT**TTCG**  
**ACA**TGG**AACATGGAAAACCCCTCACTTTTCTATAATATA**AAACAAAGTTCGGCTTTTCTG  
CCGGCATTGTGCGATAAGTTCTT**ACAGGAACAGCGGCTTTCTGCTTGAATAGTATCAAGA**  
**G**GAAGGAGTGAGCCGT3'

**Obrázok S2: Lokalizácia identifikovaných promótorov a Spo0A väzbových miest v rámci analyzovanej sekvencie.** Červená znázorňuje lokalizáciu predpovedaného  $\sigma^H$  závislého promótoru. Zelená znázorňuje lokalizáciu predpovedaného  $\sigma^{F/G}$  závislého promótoru. Žltá znázorňuje lokalizáciu predpovedaných Spo0A väzbových miest.

**Tabuľka S3: Identifikované Spo0A väzbové miesta v rámci plazmidu pDG1664 vo vzdialenosti 1000 bp upstream od klonovacieho miesta *EcoRI*.**

Motív	Vlákno	Štart	Koniec	p-hodnota	Sekvencia
Spo0A	+	893	899	0.00851	TTCTTAA
Spo0A	+	922	928	0.00218	TTTGGAA
Spo0A	+	957	963	0.00626	TTTCAAA
Spo0A	+	981	987	0.00121	TGCGTAA
Spo0A	+	1054	1060	0.00328	TTTGTAA
Spo0A	+	1137	1143	0.00921	TTTGAGA
Spo0A	+	1214	1220	0.00115	TTCGTAA
Spo0A	+	1246	1252	0.00228	TTCGTCTG
Spo0A	+	1428	1434	0.00921	TGCTTAA
Spo0A	+	1458	1464	0.00626	TTTCAAA
Spo0A	+	1493	1499	0.00413	TTCTTCA
Spo0A	+	1567	1573	0.00706	TGCTGAA
Spo0A	+	1589	1595	0.00808	TTCCGCT
Spo0A	+	1696	1702	0.00152	TTTGAAA
Spo0A	+	1766	1772	0.00418	TTTGGCG

3'AATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT  
AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAT  
TTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAA  
ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTT  
ATCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGT  
AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACA  
GCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA  
AAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTC  
GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC  
TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA  
CTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC  
ACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC

ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA  
ACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGA  
GGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT  
GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT  
GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA  
CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAC  
CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCT  
AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA  
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC  
GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGAT  
CAAGAGCTATCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAT  
ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA  
CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT  
TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGG  
GGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTA  
CAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC  
GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC  
TGGTATCTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT  
GCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCCGACCTCGAGCT  
GGATACTTCCCGTCCGCCAGGGGGACATGCCGGCGATGCTGAAGGTCGCGCGCATTCCCG  
ATGAAGAGGCCGGTTACCGCTGTTTGAGGATATAGTAATCTTTCTAAATAGCTTTGGATT  
GGAGGAGTATGGCCACTAATACTAAGTTCAGCTAATAAAAAAATTTGCTAAAGAACTCCA  
GAAAAGTAAGCACCTGTTATTGCAATAAAATTAGCCTAATTGAGAGAAAGTTTCTATAGAA  
TTTTTCATATACTTAACGAGTGCTTTCACCTTTGAATATAGTCCTTCCCACTTATCATCACA  
CTCTCCCCGATAGCCTTTTTCTAGCTATATCCAGTAAAGTTACATGCTCTTTAGGTAAGA  
GGTATAGCCATTCTGCAGCGACATCTTTCGAGGTAATTTACCAGTAGTCACTGTTTGCC  
ACATTCGAGCTAGGGTTAAAATTACATTACGCTCATCACCTTTTATCCCCTCAATTAGTTC  
TGGCAAAGAATCCTTAATTGCTCTTCGAATATCTGTCAAAGGTACGGAGACAAGTATACT  
TGAAGAATCAGGACCAAATAGAGAAATACTATTCTTTCTTGCTTGCTAAAACAATAGC  
CAAATCAGGATCATAGCTTGGTTCCTGAATTTGTCCATTCTCAAATTCACCCCTGAGCCAC  
TCACCGTATATAAATTCTCTTTTTGGAGGATATTGCCAAGGGACAACCTCACTCCTATTTA  
TAACCGTAACTTCAAGTGGTCTAACAGAATCCGTATTTCCAATCTTTCCTGATATAGTCAT  
TAGTCTTTCTGTTAGTTTTTTTTCGAGTTAATTGAGGTAACTATGATTCACGACGACTAGA  
ACATCTACATCGCTGTTAATGCGTAAACCACCACTTACTGCTGAACCAAATAGATATACT  
CCAATAATTGAACTTCCAAATAAATCTTTTACGATTTTTAATGTTTGAATCGCTTGATTTG  
GTATTTTTCCGTTAATCAAATTGCTCATGATTTACCTCGTTGATTATGTTTCATATAAAGTT  
TATATTGATACTCAATTTACTTACCCTAGATTGGACATATACTTAAATTACTGTTCAATAA  
AGCTGACCGTTAGCGTTTAAAGTACATCCTTTCACAATTTGTCTACAGATTAATAATTATTC  
TTTATTATACAGATCGATCCTCTAGACCTAGGCCTTAAGATCTGATCATATGCATCCGCGG  
GCCCCGGTTAACGCGTAATCCATGGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATT  
GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGAAAGAGCTG  
GTAGTTGGCGCACTGTTTCGAAGAACTGCCGATGTCCAGTAAGATTCTTACTATGCTGGTT  
GAACCGGATGCTGGTAAAGCTACTTGGGTTGCTGCTTCTACTTATGGTACCGATACAACCT  
ACTGGTGAGGAAGTTAAAGGAGCTCGAATTAATTCCGGCGACTGTTTCTGTTTCAGCCTC  
AAAAGACCATTTGTCGCTTTCAAAGACGGTCAGCTTCAAATATCTGCTGAGCGCCATTCC  
GACTGAATCAAAGCCGGGGCCTAGGTTAGCTGTGCTTCCGGGAACAGTGACAGAGAACA  
GCATGTCGGCTTCGTTTCATACACGGGCCGCTCCTTTTACATATTCAAGGATGCTGTCTTCA  
TCAGTCGGCAATGTGACAGGCTTGATTTCTGAAATGTCGACCGCTGTGTTCCGGATCTTTCA



GTCCGTTTCCTGTAAACACAGCTACGACCTTGCTGCCTTTCGGAATTTCTCCGGATTTAC  
 CTGTTTCAGCACTCCTGCGATAGACGCGCAAGAACCTGGTTCTGCAAACACGCCTTCTAC  
 ACGGGCGATCAGCTGATATGCGTGAAGGATTTATCATCAGTGACTTCGTCAATTTTCCC  
 ATTGGATTCCCTCGGCTGCCTTTACAGCTTTGTCCCAGCTTGCCGGGTTTCCGATACGAATG  
 GCTGTCGCTATTGTTTCCGGATTTTCAATCACTTCATTGCGCACGATTGCCGCCGCACCCT  
 CAGCTTCAAAGCCGCGCATTTCGGAAGGCCTGTGCCGTTTTTCTCATGATATTCCTTGAA  
 GCCCTTCCAGTACGCAGTGATGTTTCCAGCATTTCGACCGGGATCGCTAAAACATCAGG  
 CGCTTCCCCCAGCTGTTTCGCACACTTCGATACAAATTCCCCGTAGGCGCTAGGGACCTCTT  
 TAGCTCCTTGGAAGCTGTCAGTAGTATACCTAATAATTTATCTACATTCCCTTTAGTAACG  
 TGTAACCTTCCAAATTTACAAAAGCGACTCATAGAATTATTTCTCCCGTTAAATAATAGA  
 TAACTATTAATAATAGACAATACTTGCTCATAAGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC**TTTGG**  
**CG**TGTTTCATTGCTTGATGAAACTGATTTTTAGTAAACAGTTGACGATATTCTCGATTGAC  
 CCAT**TTTGAAA**CAAAGTACGTATATAGCTTCCAATATTTATCTGGAACATCTGTGGTATGG  
 CGGGTAAGTTTTATTAAGACACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCA**TTCCGCT**GGCA  
 GC**TTAAGCA**AT**TGCTGAA**TCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAA  
 TATCCAAGGTACGCTTGTAGAATCC**TTCTTCA**ACAATCAGATAGATGTCAGACGCATGGC  
 TTTCAAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATTCCCAACAAT  
 TTTATACCTCTGTTTGTAGGGAATTGAAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACA  
 CGAATGTTCAAGTTTTAATTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAG  
 ACGTTACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGT**TTTCGTCG**TAAATGCCCTTACCTGTTCCAAT**T**  
**TCGTAA**ACGGTATCGGTTTCTTTAAATTCAATTGTTTTATTATTGGTTGAGTACTTTTTTC  
 ATTCGTTAAAAAGT**TTTGAGA**ATATTTTATATTTTGTTCATGTAATCACTCCTGAAGTGA  
 TACATCTATAAATAAATACAGAAGTTAAACGATTTG**TTTGTA**ATTTAGTTATCTGTTTAA  
 AAAGTCATAAGATTAGTCACTGGTAGGAATTAATCTAACGTATTTATC**TGCGTAA**TCACT  
 GTTTTTAGTCTG**TTTCAA**ACAGTAGATGTTTTATCTACATTACGCA**TTTGGA**TACCAAC  
 ATGACGAATCCCTCC**TTCTTAA**TTACAAATTTTAGCATCTAATTTAACTTCAATTCCTATT  
 ATACAAAATTTAAGATAATGCACTATCAACACACTCTTAAGTTTGCTTCTAAGTCTTATT  
 TCCATAACTTTAGGGTTATC**GAATTC**GATAAGCTTCTAGGATCCGAAGGCAGCAGTTTTTT  
 GGCCTTCAATGCGGTAAGGGTTGACTGAGTTGACAAGGGCAATCGGTGATTTCTCACAGA  
 TGGAACGGACAATTTAAGCGCATCGTCAAAGTTTCCGTCAATTGCGATAATCTCGGCTC  
 CGTACATGACAGCTTGAGCGAGTTTTCCAAATGCAATTTTTCCGTTCCGGGATGATGACAA  
 TGCATTTTCATGTTAGCACGGGCTGCATATGCTGCCGCAGCAGCGGAAGTGTACCTGTTG  
 ACGCGCACATAATCGTGTCATTGCCTTCTTTTGCCTTTGCCACAGCCATAACCATCC  
 GCGATCTTTAAATGATCCCGTAGGATTGACGCCTTCCGTTTTGACATGAAGCTCAATTCCG  
 AGCTGCTCAGACAGCTTCCGGCAGGTGAATAAGAGGTGTGTTTCTTCATGTAAAGTTAGC  
 GCCGGTGTGATCTGTTACAGGTAATAATTCTTTATATTGATGGATAAGTCTTTCCACA  
 TTAGCTCCAACCGTTCCCTTCTACACGATATGTGCTTTGACTTCTTGAACGACTTCCAAA  
 TCATTTAGTTTTGCAGGATATCACTGAAATCAGCTTCTGATGTATGATGTGTGACAATTA  
 CGATTTCACTAACTCATCATGGCCTTTAATTGGCAGCTGAAGGATTTTTTCAAACGTCAC  
 GCCCCGCTCTGAGAACACAGATGTAATTTTCGAGAATGAACCAACCTCATCTTTTACATG  
 AATT5'

**Obrázok S3: Sekvencia plazmidu pDG1664 s identifikovanými Spo0A väzbovými miestami vo vzdialenosti 1000 bp *upstream* od klonovacieho miesta *EcoRI*. Zelená označuje klonovacie miesto *EcoRI*, šedá znázorňuje klonovacie miesto *BamHI*, žltá označuje Spo0A väzbové miesta v rámci plazmidu pDG1664 vo vzdialenosti 1000 bp *upstream* od klonovacieho miesta *EcoRI*.**

**Tabuľka S4: Identifikovaní interakční partneri RefZ.**

Proteín	<i>p</i> -hodnota (-Log <sub>10</sub> )	Nabohatenie (Log <sub>2</sub> )
<b>Sporulačné proteíny</b>		
YwqJ	1,945608536	1,973924319
YaaT	1,613081934	1,734054565
SpoIIAA	1,648672906	1,768267314
SpoIIQ	1,512054943	4,36001269
KinE	1,726417772	2,088194529
YngE	1,952479163	2,352497737
YngF	1,696805533	1,662032445
RefZ	3,077827852	5,582488378
SpoIIB	1,661440307	2,574265162
SpoVD	1,602567892	1,875427246
FtsX	3,649578274	3,480942408
<b>Proteíny delenia bunky</b>		
PbpC	5,038506748	1,576911926
DnaX	2,36658907	1,746816635
SsbA	2,516360067	1,504251798
MreBH	1,671330944	1,503787359
PlsX	2,277592107	1,573063533
IdcB	1,880362123	2,447872798
FtsZ	1,967780268	1,690290451
ParE	2,725295286	1,530884425
RecD2	3,870458234	6,59274133
SftA	1,815304273	2,081905365
RodZ	1,542626381	2,016452154
<b>Ostatné</b>		
YxBB	2,160551519	3,469198863
YgaC	1,79389436	2,956931432
YcsA	1,706252216	2,804034551
YjhA	1,966192547	2,54137516
YojO	2,472587272	2,522212346
YqaP	1,907056583	1,972800573
CinA	2,039796784	1,902838707
YfjR	2,913944782	1,81533432
YlbA	1,616365071	1,773347219
YlcD	2,776131815	1,542904536
YkaA	2,179672668	1,531305949
YhgD	1,800408681	2,281965892
YtoI	1,69885932	1,839091619
YkoM	2,206830188	1,659910838
RsbV	2,583214744	2,096862793
CheV	1,744686731	2,26219209
SigA	2,739187937	2,569355011
YtxH	3,198256824	3,445108414
SwrC	3,526290095	3,233291626

YtpB	1,740167607	1,608100255
McpA	1,789899028	1,879700343
YknX	1,734304013	2,002134323
SweD	2,814306698	2,849193255
LepA	1,599321725	1,866912842
AtpE	1,620778226	4,776761691
AtpH	2,901387031	2,301212947
AroA	1,734294459	2,751125654
DhbF	1,625950029	1,85432752
PapB	1,624722237	2,923126539
FadF	1,526615114	3,416084607
CheA	1,548251039	1,871162415
RqcU	2,102066355	2,178863525
PdhB	1,779003717	1,624186198
HepT	2,131464329	2,405576706
MtnU	1,824698523	2,137799263
Ffh	2,447897663	1,822397868
clpX	2,200502983	1,593395233
GroEL	3,914969634	3,5588576
YrbF	3,44228594	2,027873357
PurM	1,52515433	1,596975962
Pdp	2,631478935	3,617809931
CysL	2,926958061	1,990732193
YcbG	1,990849487	1,622110685
GmuR	1,523849195	1,623360952
GlpP	3,399578124	2,645687421
PurR	1,830035524	1,755737305
CymR	2,013126469	1,967816989
QoxA	2,621168311	4,132514318
QcrA	1,556323245	3,428596497
CtaE	1,826108874	3,275451342
RbsK	1,775396106	2,293658892
Era	1,683187955	1,569259644
RpsL	2,191407658	3,103469531
YpfD	1,84623328	1,643274943
YfiY	2,694762435	2,10007604
Pgk	2,204740791	1,684878031
PtsG	2,045729686	2,228039424
GltT	2,499723637	3,749705315
FecC	1,552907964	2,622346878
MetQ	2,319540189	1,81116422
BmrA	2,283845306	3,516537348
YknZ	1,572543984	1,98393631
RbsB	1,763855001	2,161996841
FhuD	2,113920483	3,311605771
SufC	1,543527333	2,681549072

NupN	1,731462785	2,706336975
MeIE	2,266201588	2,374683062
AppC	3,545477249	2,867902438