

22
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra biochemie



Vliv DNA elementů na aktivitu a regulaci rRNA promotorů u *Bacillus subtilis*

Bc. Tomáš Kouba

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2008

Za odborné vedení děkuji svému školiteli Mgr. Liboru Krásnému, Ph.D. Dále děkuji Mgr. Haně Šanderové za uvedení do metodiky a cenné rady a Mgr. Lud'ku Sojkovi za spolupráci na projektu. Velké díky patří všem spolupracovníkům za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině za veškerou podporu v průběhu studia.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Mgr. Libora Krásného, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Praha, 24. 4. 2008

Bc. Tomáš Kouba

OBSAH

ÚVOD	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
LITERÁRNÍ ÚVOD.....	8
1. Potřeba regulace počtu ribosomů v buňce	8
2. Geny pro rRNA	10
2.1. rRNA operony	10
2.2. Organizace rRNA operonů u <i>B. subtilis</i>	10
3. RNA polymeráza	11
3.1. Bakteriální RNA polymeráza	11
3.1.1. podjednotka α	13
3.1.2. podjednotky β a β'	13
3.1.3. podjednotka ω	14
3.1.4. podjednotka σ	14
3.2. RNAP z <i>Bacillus subtilis</i>	15
4. Obecné uspořádání promotoru	16
5. Mechanismus iniciace transkripce.....	17
6. Reakce polymerace nukleosidů	20
8. Faktory ovlivňující regulaci rRNA promotorů u <i>E. coli</i>	22
8.1. Afinita RNAP k rRNA promotoru	23
8.1.1. UP element	23
8.1.2. Fis faktor	24
8.1.3. Bílkovina H-NS.....	24
8.2. Stabilita otevřeného komplexu RP_O a její role v regulaci rRNA promotorů	25
8.3. Faktory podmiňující regulaci pomocí malých efektorových molekul.....	27
8.3.1. Bílkovinné faktory	27
8.3.2. DNA sekvence promotoru.....	28
8.4. Řízení transkripce pomocí malých efektorových molekul <i>in vivo</i>	28
9. rRNA promotory u <i>B. subtilis</i>	32
10. Regulace rRNA promotorů u <i>B. subtilis</i>	33
MATERIÁL A METODY	35
11. Přístroje.....	35
12. Používané chemikálie, enzymy a další preparáty	36
13. Práce s DNA - příprava plazmidů s promotorovými konstrukty.....	36
13.1. Izolace plazmidové DNA z <i>Escherichia coli</i> DH5 α	37
13.1.1. Minipreparace	37
13.1.2. Midipreparace	38
13.1.3. Purifikace plazmidové DNA fenolem, chloroformem	40
13.1.4. Precipitace plazmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného	40
13.1.5. Analýza plazmidové DNA restrikčním štěpením	41
13.1.6. Elektroforetická analýza DNA	41
13.1.6. Izolace DNA z gelu	42
13.2. Klonování DNA	43

13.2.1. Příprava DNA inzertů.....	43
13.2.2. Příprava plazmidu a ligace DNA inzertu.....	44
13.2.3. Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> DH5a.....	44
13.2.4. Sekvenační reakce.....	45
14. Metody práce s proteiny.....	46
14.1. Expres a izolace podjednotky σ^A RNAP z <i>B. subtilis</i>	46
14.2. Měření koncentrace bílkovin – metoda podle Bradfordové.....	47
14.3. Polyakrylamidová elektroforéza proteinů.....	48
14.4. Rekonstituce jádra RNAP a podjednotky σ^A z <i>B. subtilis</i>	49
15. Transkripční experimenty.....	50
15.1. Určování K_{GTP} u jednotlivých promotorových konstruktů.....	50
15.2. Určování poločasu rozpadu $t_{1/2}$ otevřeného komplexu jednotlivých promotorových konstruktů a RNAP pomocí heparinu.....	52
15.3. Určování poločasu rozpadu $t_{1/2}$ komplexů jednotlivých promotorových konstruktů a RNAP pomocí dsDNA.....	56
CÍL PRÁCE.....	57
VÝSLEDKY.....	58
16. Experimentální strategie.....	58
17. Příprava plazmidů pro experimenty <i>in vitro</i>.....	59
18. Expres a izolace podjednotky σ^A RNAP z <i>B. subtilis</i>.....	61
19. Testované promotory I.....	63
19.1. K_{GTP} promotorů Pveg a BP1 s RNAP z <i>B. Subtilis</i> a <i>E. Coli</i>	64
19.2. K_{GTP} testovaných promotorů I.....	65
20. Testované promotory II.....	67
20.1. K_{GTP} testovaných promotorů II.....	68
21. $t_{1/2}$ komplexů promotorů I a II a RNAP.....	70
21.1. $t_{1/2}$ RP_O promotorů BP1 a Pveg s RNAP z <i>B. Subtilis</i> a <i>E. Coli</i>	71
21.2. $t_{1/2}$ RP_O promotorů I a II a RNAP z <i>B. Subtilis</i>	73
21.3. Rozpad komplexů promotorů a RNAP z <i>B. subtilis</i> za přítomnosti dsDNA.....	75
DISKUZE.....	77
22. Porovnání transkripce s RNAP z <i>B. subtilis</i> a <i>E. coli</i> <i>in vitro</i>.....	77
23. DNA elementy ovlivňující K_{GTP} u <i>B. subtilis</i> <i>in vitro</i>.....	77
24. Porovnání $t_{1/2}$ RP_O promotorů s RNAP z <i>B. subtilis</i> a <i>E. coli</i>.....	78
24. Mechanismus senzitivity promotorů k [iNTP] u <i>B. subtilis</i>.....	78
25. Srovnání chování promotorů <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>.....	80
ZÁVĚR.....	82
SEZNAM LITERATURY.....	83

Úvod

Tato diplomová práce je součástí grantového projektu „Interakce ribosomálních RNA promotorů s RNA polymerázou u *Bacillus subtilis*: definování elementů důležitých pro regulaci“ (GAČR, reg. č.: 204/05/P510), který řeší můj externí školitel Mgr. Libor Krásný, Ph.D. Tento projekt studuje transkripci rRNA u gram pozitivní bakterie *Bacillus subtilis*. Tento klíčový buněčný proces je u této bakterie a pravděpodobně i dalších gram pozitivních bakterií zásadně odlišný od analogického procesu u *Escherichia coli*, současného hlavního modelového organismu pro studium transkripce rRNA. Definování DNA elementů rRNA promotorů zodpovědných za regulaci exprese rRNA u *B. subtilis* významně přispěje k pochopení molekulárního mechanismu tohoto procesu.

Tato diplomová práce se skládá ze dvou částí. První část je věnovaná teoretickému úvodu. Vysvětluje biologické a biochemické pozadí studovaných molekulárních dějů a stručně popisuje současný stav jejich poznání. Druhá experimentální část popisuje provedené experimenty na modelovém organismu *B. subtilis in vitro*.

Seznam použitých zkratek

AA	akrylamid
AMK	aminokyselina
AP	ampicilin
APS	amoniumpersulfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	počet párů bází
BSA	hovězí sérum albumin
DNA	kyselina deoxyribonukleová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HtH	helix-otáčka-helix
NTP	nukleosid trifosfát
I	intermediáty
iNTP	iniciační nukleosid trifosfát
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
P	promotor
ppGpp	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
RNA	kyselina ribonukleová
RNAP	RNA polymeráza
RP _C	uzavřený komplex
RP _{NTP}	RNAP s navázaným iNTP
RP _O	otevřený komplex
r-proteiny	ribosomální proteiny
rRNA	ribosomální RNA
SDS	dodecyl sulfát sodný
TAE	trisacetátový pufr pro elektroforézu DNA
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethyldiamine
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
[iNTP]	koncentrace iNTP

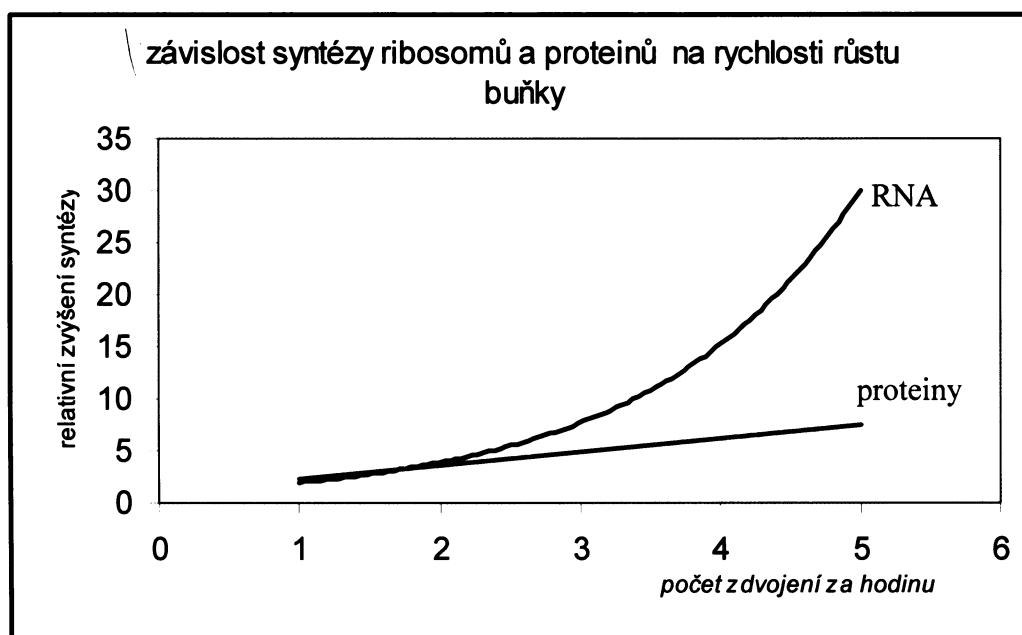
Literární úvod

1. Potřeba regulace počtu ribosomů v buňce

Ribosom, ústrojí které v buňce zajišťuje syntézu proteinů, je složen ze tří ribosomálních RNA (rRNA) a ~52 ribosomálních proteinů (r-proteinů). Na ribosomech dochází k překlada mRNA na proteiny.

Ribosomy v bakteriální buňce představují až 40 % veškeré suché hmoty. V bakterii, která se rozdělí 4x za hodinu, se syntetizuje zhruba 70 000 ribosomů a většina z nich se aktivně podílí na produkci proteinů. Tuto velkou energetickou investici do ribosomů je nutné přesně regulovat, aby buňka zbytečně neplývala energií a živinami a přitom byla schopna efektivně pokrývat své potřeby produkce nových proteinů.

Množství proteinu na buňku se dramaticky nemění se změnou bohatosti živin v prostředí (obr. 1). Rovněž rychlost překlada mRNA na ribosomu je konstantní bez ohledu na množství živin v prostředí. Co se mění, je generační doba a rychlost vzniku nových buněk. Obrazně řečeno, pokud by buňka byla továrnou a ribosom strojem, pak by zrychlení produkce a vznik dceřinného podniku byly možné jen zvýšením počtu strojů a nikoli změnou produktivity jednotlivých strojů. Buňka nemění množství syntetizovaných proteinů na buňku, ale dobu, za kterou jsou proteiny syntetizované. Buňka mění množství svých ribosomů, které jsou pro proces syntézy proteinů potřeba (obr. 1) [1, 2].



obr. 1: Graf znázorňuje, že při vzrůstající rychlosti růstu obsah proteinů v buňce narůstá jen mírně (červená křivka), naopak počet ribosomů v buňce vzrůstá exponenciálně (černá křivka).

WAZEV 000

Pokud se rychle rostoucí bakterie dostane do prostředí chudého na živiny, musí snížit množství ribosomů a tedy snížit rychlost výroby nových ribosomů, aby zbytečně neinvestovala do „strojů“, které nepotřebuje. V opačném případě, pokud se bakterie z prostředí chudého na živiny dostane do prostředí s dostatkem živin, musí zvýšit počet ribosomů, aby pokryla zvýšenou potřebu nových proteinů.

Buňka musí řešit dva problémy související s výrobou nových ribosomů. Prvním je koordinace syntézy rRNA s ekvimolárním množstvím r-proteinů. Druhým je regulace syntézy takového množství ribosomů, které odpovídá momentálním potřebám buňky na syntézu proteinů. První problém je vyřešen tak, že produkce r-proteinů je závislá na množství rRNA a je regulována mechanismy jako např. atenuace [3]. Pro řešení druhého problému jsou rozhodující mechanismy regulace syntézy rRNA.

Proces syntézy RNA podle záznamu v DNA se souhrnně nazývá transkripce. Transkripce se skládá ze tří kroků: iniciace, elongace a terminace. V prvním kroku, iniciaci, nasedá na DNA templát enzym RNA polymeráza (RNAP). RNAP nasedá na DNA templát v regulační oblasti zvané promotor. V druhém kroku, elongaci, RNAP přepisuje (transkribuje) komplementární vlákno RNA podle DNA. Ve třetím kroku, terminaci, RNAP ukončuje transkripci DNA templátu v regulační oblasti zvané terminátor.

Buňka dosahuje regulace syntézy rRNA pomocí regulace iniciace transkripce rRNA, jakožto rychlost limitujícího kroku při syntéze ribosomů. Tato regulace je zajišťována pomocí různých efektorů ať už proteinovými faktory nebo malými nebílkovinnými molekulami. Regulaci lze rozdělit na dva případy: (i) Dlouhodobou regulaci, tedy odpověď na dlouhodobější stav prostředí, ve kterém se buňka nachází a pravidelně se v něm dělí, označovanou jako „regulaci rRNA závislou na rychlosti růstu“. (ii) Na okamžitou regulaci, kdy buňka musí být schopna reagovat na rychlou změnu dostupnosti živin, ať už pozitivní nebo negativní. Příkladem tohoto typu regulace je strogá odpověď (z angl. „stringent response“) [4]. To je situace, kdy buňka reaguje na dostupnost nabitých transferových RNA (tRNA) nutných pro syntézu proteinů.

Je tedy patrné, že v buňce musí fungovat síť signálů zajišťujících přesnou regulaci syntézy ribosomů jakožto limitujícího faktoru pro syntézu bílkovin a růst buňky.

2. Geny pro rRNA

2.1. rRNA operony

Geny pro rRNA jsou organizovány do rRNA operonů. Většina mikroorganismů má v jednom operonu kódované všechny tři rRNA tedy 16S, 23S, 5S, a to v tomto pořadí (obr. 2). Existují však i výjimky, kdy organismy mají oddělené operony pro 16S a 23S + 5S rRNA (např. u *Thermus thermophilus*), nebo mají pro každou rRNA samostatný operon (*Leptospira interrogans*). Tyto samostatné operony nemusí být vzájemně ve stejném početním zastoupení (*Borrelia burgdorferi*) [2,5-7]. V rRNA operonech mohou být obsaženy i geny pro tRNA.

V operonech, kde jsou najednou obsaženy všechny tři geny pro rRNA, jsou jednotlivé geny v operonu odděleny dlouhými mezerami s komplementárními repeticemi, které tvoří dvouvlákna rozpoznávaná endonukleasami (RNasa III u *E. coli*) [8]. Tyto mezerníky musí být po primární transkripci vyštěpeny za vzniku funkčních rRNA. Přítomnost všech tří genů pro rRNA v jednom operonu za sebou zajišťuje jejich ekvimolární zastoupení.

Počet operonů pro rRNA v chromozomu závisí na druhu organismu. V pomalu rostoucích organismech, které mají generační čas (čas, za který se bakterie zdvojí) dlouhý, je počet rRNA operonů nízký, naopak v organismech, které se velice rychle množí, je počet rRNA operonů vysoký. Například *Mycoplasma* má pouze jeden operon, *Escherichia coli* s generačním časem 20 minut má operonů sedm, *Bacillus subtilis* se shodnou generační dobou má operonů deset, *Vibrio natriegens* s generační dobou kratší než 10 minut má operonů nejméně 13 [2,5-7].

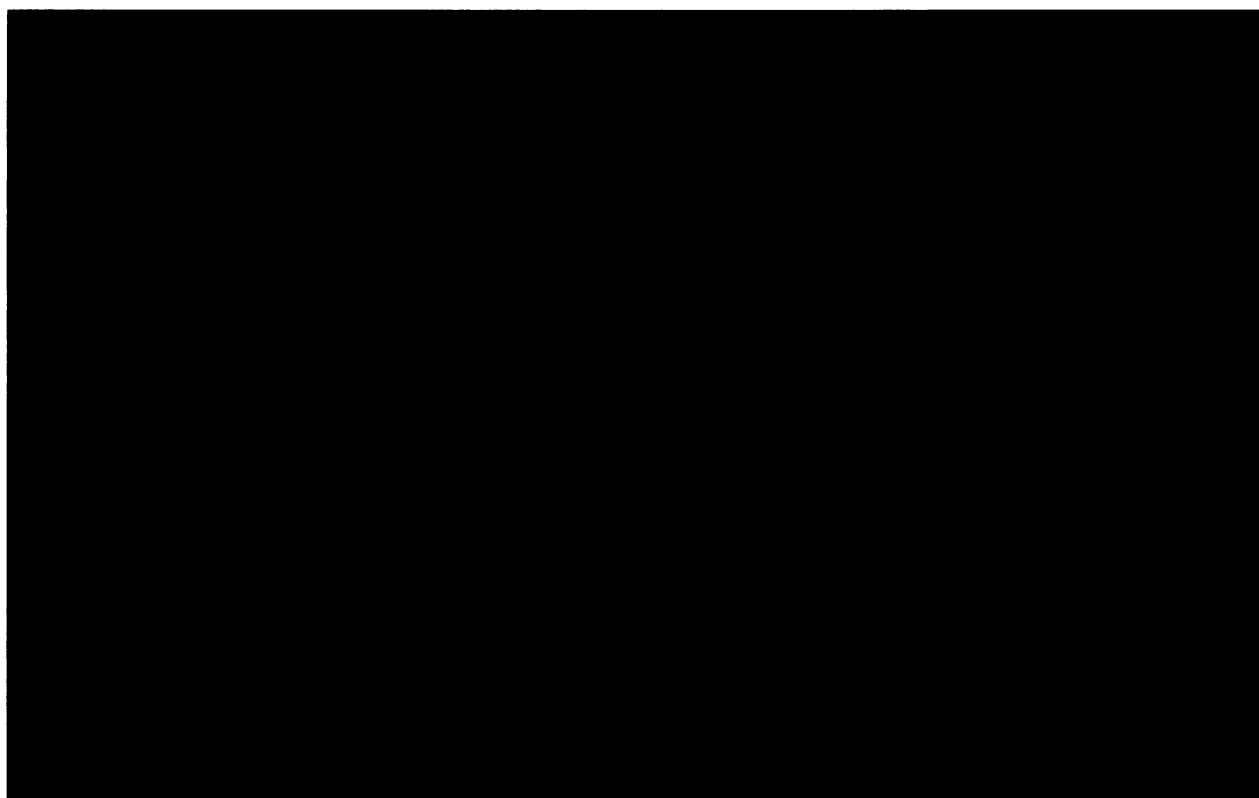


obr. 2: Ribosomální operon *rrnE* u *B. subtilis*.

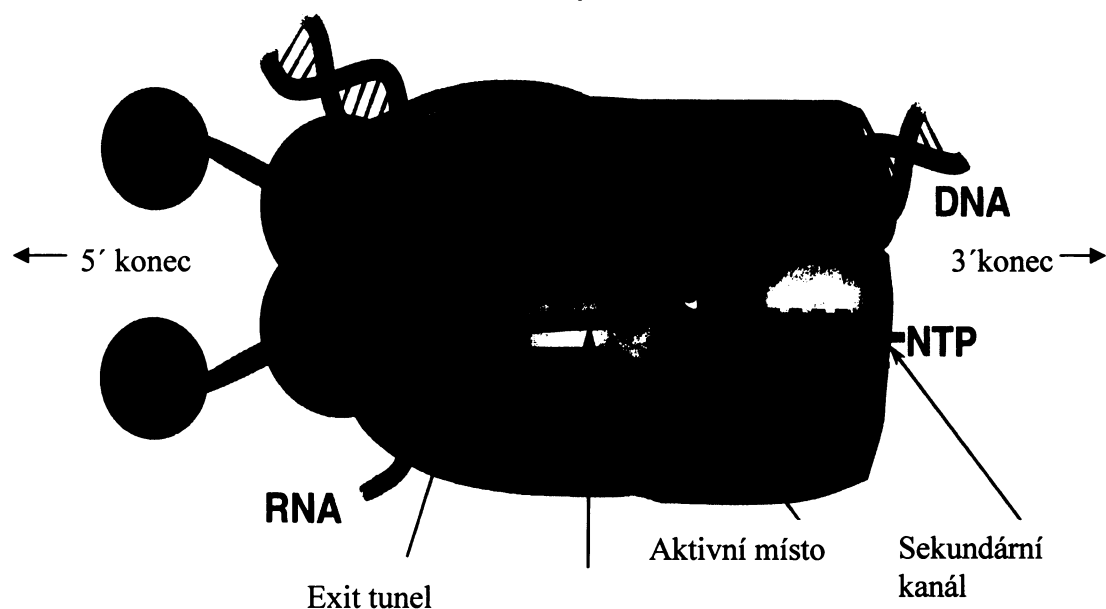
2.2. Organizace rRNA operonů u *B. subtilis*

rRNA operony jsou u *B. subtilis* označovány *rrn* [9-11]. Každý operon obsahuje geny 16S, 23S a 5S rRNA (obr. 2) [12,13]. Většina rRNA operonů je lokalizována těsně za začátkem replikace, aby interval mezi replikací a transkripcí při dělení buňky byl co nejkratší (obr. 3, str. 11). Pokud jsou přítomny geny pro tRNA, jsou lokalizovány mezi geny pro 16S a 23S nebo až za genem pro 5S (obr. 2). Šest rRNA operonů obsahuje tandem promotorů P1 a P2 (počátky transkripce), jeden má jen P1 a tři mají jen P2. Označení promotorů (P1 a P2)

z RNAP vychází vytvářené RNA vlákno (obr. 5, str. 12). Přesná struktura a přesné interakce jednotlivých podjednotek jsou velmi složité a ještě nebyly zcela rozřešeny [15,16].



obr. 4: Model RNA polymerázy z *T. thermophilus* vytvořený podle krystalové struktury: modře podjednotky α , zeleně β , hnědě β' a fialově σ . Převzato z [16].



obr. 5: Komplex RNA polymerázy s DNA a RNA.

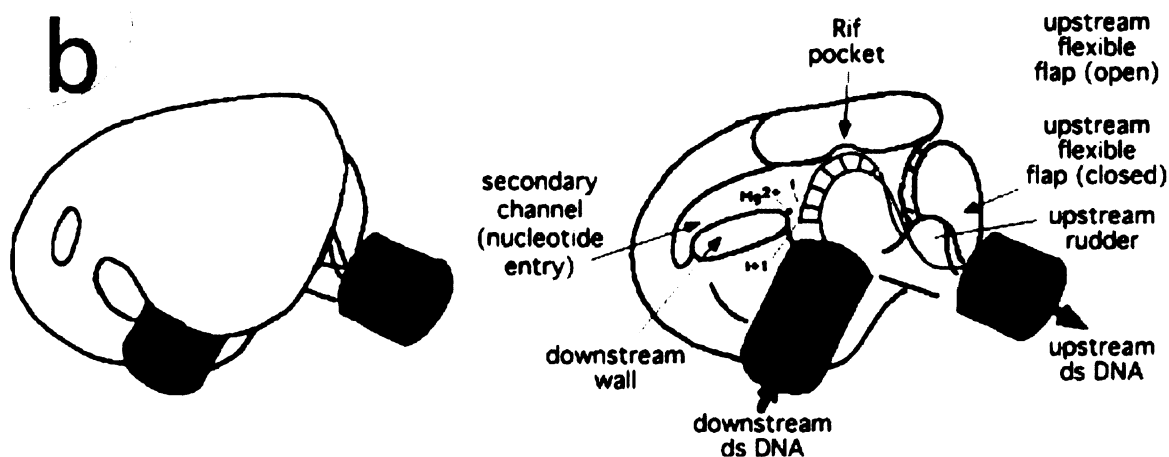
3.1.1. podjednotka α

Podjednotka α je tvořena zhruba 320 AMK a je složena ze dvou nezávisle sbalených domén. N-terminální doména (α NTD) a C-terminální doména (α CTD) jsou spojeny flexibilním můstkem. α NTD interaguje s podjednotkou β RNAP [17], α CTD interaguje s DNA.

3.1.2. podjednotky β a β'

Podjednotka β je složena ze zhruba 1340 AMK a podjednotka β' ze zhruba 1400 AMK. Dohromady tyto podjednotky tvoří takzvaná klepeta RNAP, přičemž každá z nich tvoří jedno rameno pomyslného klepeta. Obě podjednotky se spolu pevně váží na dně „kanálu“ tvořeného oběma rameny, tedy v místech, kde tvoří aktivní centrum. Obě podjednotky mají kruhový tvar, kdy N a C konce jsou v těsné blízkosti.

Podjednotka β obsahuje flexibilní boční část, která nejspíše uzavírá a chrání tvořenou RNA při jejím výstupu z RNAP. Ze strukturních analýz vyplývá, že β' tvoří v kanálu jeho rozdělení (kormidlo) tam, kde DNA vystupuje z RNAP, tím separuje vlákna dsDNA (obr. 6). Podjednotka β' ve své struktuře obsahuje sekundární kanál, který je asi 10-12 Å široký, což je nedostatečné pro jakékoliv vlákno DNA nebo RNA. Předpokládá se, že jím prochází NTP a váží se zde další proteiny ovlivňující funkci RNAP (obr. 6) [15,16].



obr. 6: Schéma RNA polymerázy. Modré válce - dsDNA. Modrá linka - templátové vlákno DNA, světle modrá - netemplátové vlákno, červená - vznikající RNA. Ve schématu je vidět i kormidlo v kanálu (rudder) rozdělující vlákna DNA vycházejícího z RNAP (upstream dsDNA) a boční strukturu držící RNA (flexible flap). Převzato z [15].

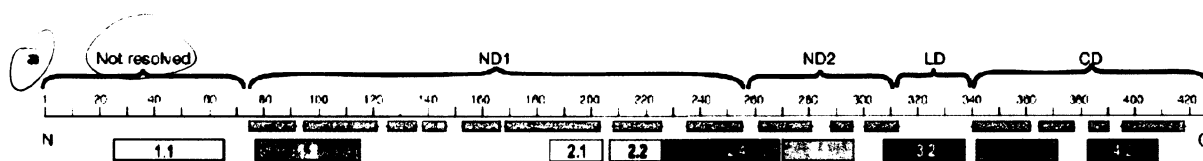
3.1.3. podjednotka ω

Podjednotka ω je složená ze zhruba 90 AMK. Její funkce není příliš definovaná a z experimentů vyplývá, že jejím vyřazením se zpomaluje růst. Její funkce je nahrazována proteinem GroEL. Současným vyřazením obou proteinů je způsobena úplná ztráta funkčnosti RNAP. Ze strukturálních experimentů vyplývá, že se podjednotka ω váže najednou na C a N konec podjednotky β' . V pokusech *in vitro* se ω účastní kroku sbalení β' s $\alpha_2\beta$ v procesu skládání RNAP ($\alpha + \alpha \rightarrow \alpha_2 + \beta \rightarrow \alpha_2\beta + \beta' \rightarrow \alpha_2\beta\beta'$). Ve sbalování *in vivo* však tato účast není prokázána. V pokusech *in vitro* bylo prokázáno, že ω zabraňuje agregaci β' podjednotek a tím udržuje jejich rozpustnost [18]. Podjednotka ω má vliv i na regulaci iniciace transkripce [19].

3.1.4. podjednotka σ

Podjednotek σ je více typů, nejpoužívanější je rodina vegetativních podjednotek σ účastníci se transkripce provozních (z angl. „housekeeping“) genů, kam patří i podjednotka σ^{70} z *E. coli*.

Podjednotky σ z této rodiny se skládají ze zhruba 610 AMK a jsou rozděleny na několik částí: N-terminální domény 1 a 2 (ND1, ND2), můstek (LD), a C-terminální doménu (CD). Tyto části jsou pak děleny na další menší úseky označovanými čísly 1-4 (obr. 7). Motiv tvaru písmena U tvořený úseky 1.2, 2.1, 2.2 a 2.4 se váže s jádrem podjednotky β' (s α -helixem coiled-coil motivu podjednotky β'). Tato interakce je nejsilnější z dalších slabších interakcí podjednotek σ a β' . Častý motiv objevující se ve struktuře podjednotky σ je helix-otáčka-helix (HtH), který je strukturně funkční (obr. 8, str. 15) [15,16].



Obr. 7: Rozdělení podjednotky σ z RNAP na domény. Převzato z [16].



obr. 8: Podjednotka σ z RNAP. Barvy odpovídají jednotlivým doménám (obr. 7, str. 14). HtH označují jednotlivé helixy-otáčky-helixy. Převzato z [16].

3.2. RNAP z *Bacillus subtilis*

Jádro RNAP u *Bacillus subtilis* je stejně jako u *E. coli* složeno z dimeru podjednotek α , z jedné podjednotky β a jedné podjednotky β' . Na rozdíl od *E. coli* obsahuje RNAP jádro *B. subtilis* dvě podjednotky ω , které jsou velmi kyselé a mají nespíše také funkci chaperonů při skládání RNAP. Navíc ještě RNAP obsahuje kyselou podjednotku δ (zhruba 170 AMK). Podjednotka δ zvyšuje selektivitu RNAP k promotorům, zamezuje nasedání na nepromotorových místech a urychluje odtržení výsledné RNA od RNAP po transkripci. Tím umožňuje RNAP opětovné nasednutí na promotor [20].

Dále RNAP obsahuje také podjednotku σ rozpoznávající DNA promotor. U *B. subtilis* se vyskytuje celkem 17 druhů podjednotek σ . Základní podjednotka σ^A je ze stejné rodiny jako σ^{70} z *E. coli*. Vazbu RNAP na promotor zajišťují i jiné podjednotky σ , podle toho v jakém stadiu vývoje se buňka nachází. σ^B je podobná stresové σ^S u *E. coli*, další řídí transkripci např. při sporulaci (σ^H) nebo tvorbě bičíku (σ^D). Obecně *B. subtilis* více než *E. coli* používá různých podjednotek σ k expresi a regulaci souborů genů účastnících se nějakého stadia vývoje. Podjednotek σ je u *E. coli* celkem 7 typů. U jiných organismů může být tento počet odlišný (*Streptomyces* jich mají více než 60).

Podjednotky RNAP z *B. subtilis* mají oproti podjednotkám *E. coli* nižší molekulovou hmotnost (Tabulka 1). Geny pro některé podjednotky RNAP jsou u *B. subtilis* jinak uspořádány než u *E. coli*, z toho vyplývají i odlišnosti při regulaci jejich syntézy [5,20].

V současné době je u *B. subtilis* vytvořen homologní model jádra RNAP spolu s podjednotkou σ^A , určující některé jejich vzájemné interakce [21].

Tabulka 1: Srovnání molekulových hmotností a počet AMK jednotlivých podjednotek RNAP z *E. coli* a *B. subtilis*.

Organismus	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
Podjednotka	kDa	počet AMK	gen	kDa	počet AMK
podjednotka α	36,5	329	<i>rpoA</i>	34,8	314
podjednotka β	150,7	1342	<i>rpoB</i>	133,6	1193
podjednotka β'	155,2	1407	<i>rpoC</i>	134,2	1199
podjednotka ω_1	10,2	91	<i>yloH</i>	7,8	67
podjednotka ω_2	X	X	<i>ykzG</i>	8,1	69
podjednotka δ	X	X	<i>rpoE</i>	20,4	173
podjednotka σ (σ^{70} a σ^A)	70,3	613	<i>sigA</i>	42,8	371
celkem	422,9	3782		381,7	3386

ne přehlédnu

4. Obecné uspořádání promotoru

Sekvence DNA v místě promotoru je velmi důležitá pro rozpoznání startu transkripce. DNA sekvence se zapisuje jako sekvence od 5' k 3' konci netemplátového vlákna DNA a to tak, že iniciační nukleotid má číslo +1 a sekvence za iniciačním nukleotidem má kladné znaménko a sekvence před ním záporné, přičemž nukleotid 0 neexistuje (obr. 9).



obr. 9: Schéma promotorového jádra u promotoru *rrnB* z *E. coli*.

U promotorů rozpoznáváme takzvané promotorové jádro v úseku od -40 do +1, které obsahuje čtyři definované úseky (obr. 9). (i) Diskriminátor je různě dlouhá oblast mezi iniciačním nukleotidem (+1) a -10 hexamerem. (ii) -10 hexamer - konsenzus sekvence

5'-TATAAT-3', (iii) mezerník je různě dlouhá oblast (obvykle 15 – 19 bází) mezi -10 a -35 hexamerem, (iv) -35 hexamer - konsenzus sekvence 5'-TTGACA-3'.

Rozpoznání promotoru, respektive -10 a -35 hexameru, zajišťuje podjednotka σ RNAP. Různé podjednotky σ rozpoznávají různé promotory. Podjednotka σ^{70} z *E. coli* rozpoznává promotory s hexamery s konsenzus sekvencí a délkou mezerníku 17 bp. Stresová podjednotka σ^S je funkční s nekonvenčními hexamery a je flexibilní k různým délkám mezerníků. Geny potřebné při stresu mají právě nekonvenční hexametry a mezerníky [16,22]. Tohoto mechanismu je v buňce využíváno při transkripci různých genů podle situace, ve které se buňka nachází.

5. Mechanismus iniciace transkripce

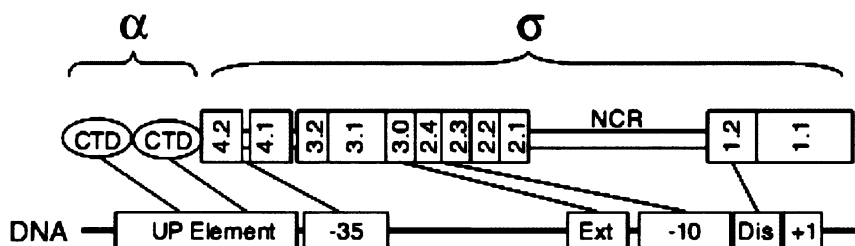
Zahájení iniciace transkripce se účastní promotor a RNA polymeráza. U *E. coli* se iniciace transkripce mohou účastnit ještě další proteiny interagující jak s DNA templátem tak s RNAP, které se obecně označují jako transkripční faktory. Dále se iniciace účastní iniciační nukleosid trifosfát (iNTP), tedy ten nukleotid, kterým začíná řetězec syntetizovaného RNA vlákna. Iniciace se mohou účastnit další malé nebílkovinné molekuly, které různými mechanismy iniciaci transkripce ovlivňují.

Celkový průběh iniciace transkripce vyjadřuje schéma:

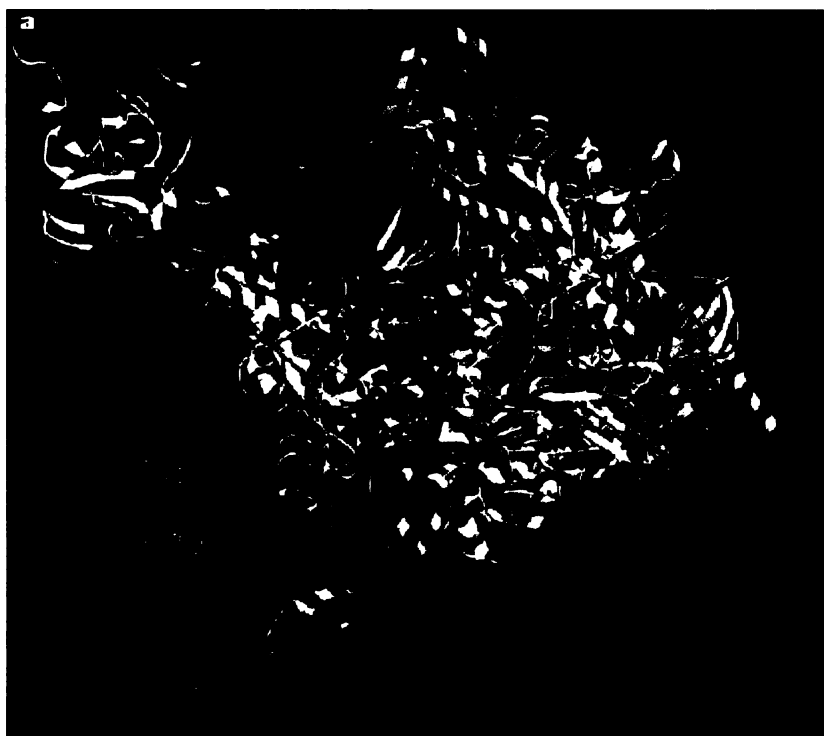


(R = RNAP, P = promotor, RP_C = uzavřený komplex, I = kinetické intermediáty, RP_O = otevřený komplex, RP_{NTP} = RNAP s navázaným iNTP, RP_E = elongační komplex)

Iniciace transkripce je vícekrokový proces [23], kdy v prvním kroku musí RNAP nasednout na DNA templát v místě promotoru za vzniku takzvaného uzavřeného komplexu (RP_C) (obr. 10, 11 str. 17). DNA je v tomto komplexu ohnutá, protože 16 nebo 17 párový mezerník je moc dlouhý na to, aby zde dsDNA mohla být v natažené pozici.



obr. 10: Schéma interakcí RNAP a promotoru. Čáry naznačují interakce mezi podjednotkou α a σ RNAP a různými úseky DNA promotoru. CTD - C-terminální doména podjednotky α , čísla - jednotlivé části podjednotky σ , NCR - můstek podjednotky σ , +1 - traskripční start, Dis - diskriminátor, -10 hexamer, Ext - část mezerníku, -35 hexamer, UP Element - rozšířená část promotoru. Převzato z [24].

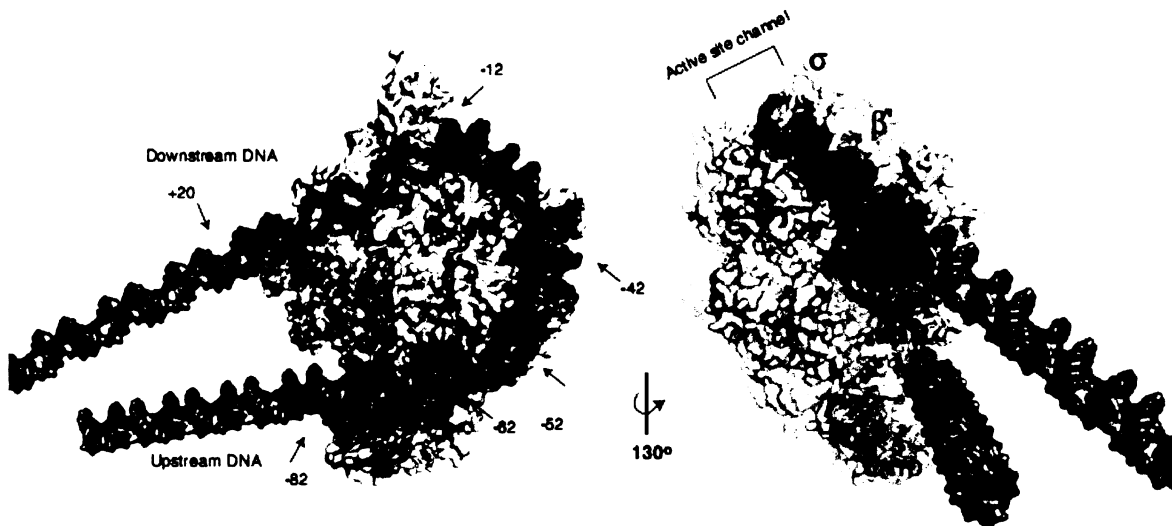


obr. 11: Model navázání dsDNA na RNAP (RP_C), zeleně dsDNA: modře -35 oblast, oranžově pokračující -10 oblast, červeně -10 oblast, fialově podjednotka σ . Převzato z [16].

Uzavřený komplex může poté přes řadu kinetických meziproductů (I) přejít do takzvaného otevřeného komplexu (RP_O), neboli také komplexu rezistentnímu ke kompetitoru. DNA templát je v této situaci už rozpleten a je utvořena transkripční bublina (od -12 do +2 nukleotidu). RNAP je v této chvíli chráněná proti navázání jiných molekul například heparinu, který ireverzibilně váže volnou RNAP.

V současné době je dokázán intermediát RNAP *E. coli* a promotoru, kde je dsDNA vnořena do kanálu aktivního místa, ale ještě není rozpletena (obr. 12, str. 19). Což je v rozporu s původní teorií, že kanál je příliš úzký na to, aby mohl pojmout příliš objemné vlákno dsDNA, a naznačuje to nutnost flexibility molekuly RNAP [25]. U RNAP z *B. subtilis*

byl nalezen intermediát, kde jsou navázaná vlákna DNA parciálně separovaná v oblasti pozice -4 [20].

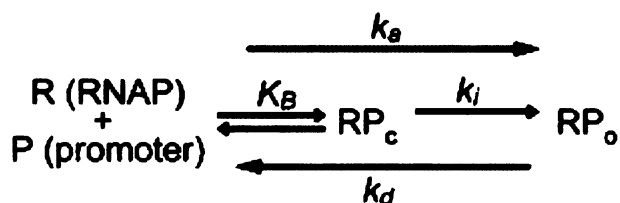


obr. 12: Model intermediátu RNAP a promotoru. Červeně místa chráněná proti štěpení OH radikály, fialově místa částečně chráněná, šedivě místa nechráněná. Čísla určují pozice na DNA. Převzato z [25].

Jakmile RNAP přejde do RP_O , je připravena začít transkripci RNA prvním NTP. Poté, co RNAP přeruší kontakt s promotorem, přechází do elongační fáze transkripce (RP_E).

Může se však stát, že se polymerace po spojení několika NTP zastaví za vzniku takzvaných abortivních produktů. V této situaci RNAP sklouzne zpět do počáteční pozice v RP_O za vzniku krátkých několika nukleotidových transkriptů.

Proces tvoření otevřeného komplexu je popsán následujícím schématem (obr. 13),



obr. 13: Proces tvoření RP_O Převzato z [26].

kde k_a je rychlostní konstanta asociace RNAP s promotorem: $RNAP + promotor \rightarrow RP_O$.

Tento děj se dělí na tvorbu uzavřeného komplexu: $RNAP + promotor \rightarrow RP_C$, který je

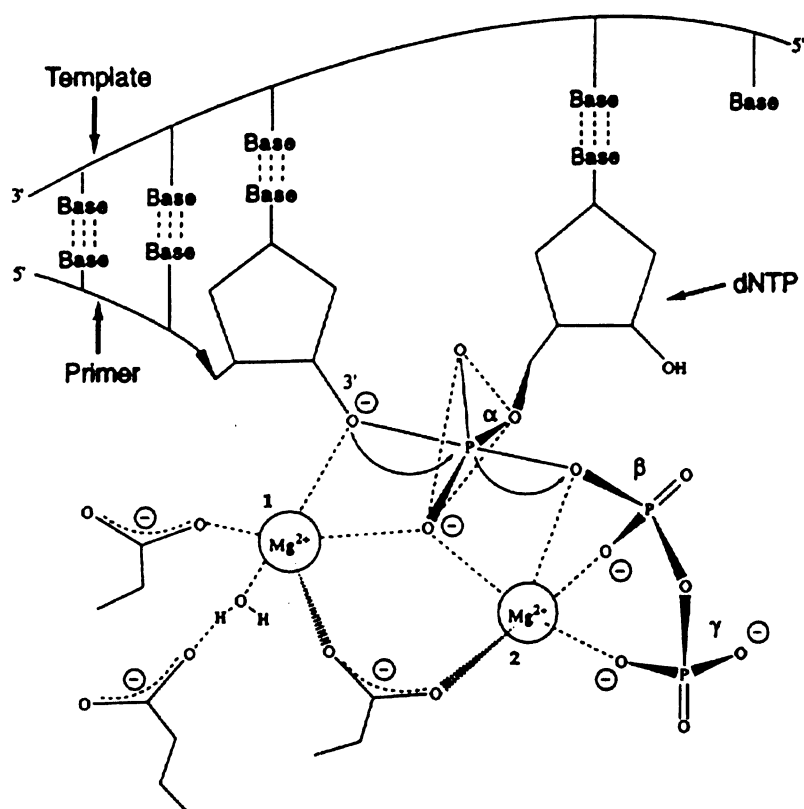
charakterizován rovnovážnou konstantou K_B : $K_B = \frac{[RP_c]}{[RNAP][promotor]}$. k_i je rychlostní

konstanta izomerizace RP_C na RP_O , k_d je rychlostní konstanta celkové disociace.

Různé promotory se liší tím, jak rychle jsou schopny asociovat s RNAP za vzniku RP_C a jak rychle jsou schopny vytvořit RP_O . Dále jak stabilní je jejich RP_O , tedy jaký mají vytvořené RP_O poločas rozpadu.

6. Reakce polymerace nukleosidů

Bylo prokázáno, že polymerace (d)NTP u enzymů s touto funkcí (RNA a DNA polymeráza, reversní transkriptáza) probíhá stejným principem. K polymeraci jsou nezbytně nutné dva ionty hořčíku Mg^{2+} , které jsou koordinovány v katalytickém centru aktivního místa kyselými aminokyselinami, konkrétně třemi zbytky kyselin asparagových v konzervovaném motivu sledu aminokyselin -NADFDGD- β' podjednotky, a fosfáty (d)NTP. Polymerace (d)NTP probíhá vytvořením vazby mezi 3' koncovým kyslíkem sacharidu a α -fosfátem dalšího (d)NTP za odštěpení pyrofosfátu. Mechanismus reakce je nukleofilní atak deprotonované hydroxylové skupiny sacharidu na α -fosfát. pK_A OH skupiny je zvyšována koordinací kyslíku Mg^{2+} iontem č. 1 (obr. 14). Katalytické místo umožňuje i opačnou reakci, tedy hydrolyzu [27].



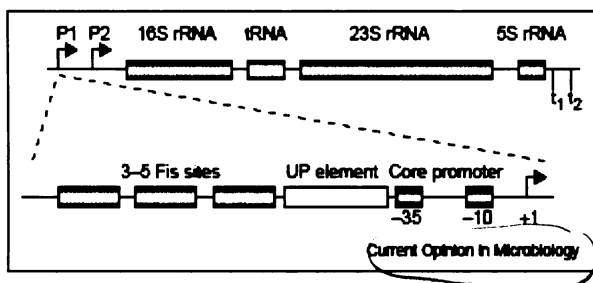
obr. 14: Schéma uspořádání polymerace NTP. 1. Mg^{2+} koordinuje 3' O' sacharidu s α -fosfátem a udržuje úhel 3'-O-P-O 90°. 2. Mg^{2+} stabilizuje pentagonické uspořádání okolních kyslíků a usnadňuje odtržení pyrofosfátu. Převzato z [27].

7. rRNA promotory u *E. coli*

Transkripce ribosomálních operonů u *E. coli* začíná na dvou promotorech, P1 a P2 (obr. 15). Každý tento promotor je různě aktivní v různých růstových fázích buňky.

U promotorů P1 je iniciační nukleotid v šesti případech ATP v jednom GTP, u P2 promotorů se jako iNTP vyskytuje i CTP. Iniciační nukleotid je oddělen 8-bázovým G a C bohatým diskriminátorem od -10 hexameru. -10 hexamer je oddělen 16-bázovým mezerníkem od -35 hexameru. (17)

Protože afinita RNAP k jádru promotoru je nízká, nachází se navíc oproti ostatním promotorům u rRNA promotorů takzvaný UP element a Fis oblast, které afinitu zvyšují (mechanismus viz kap. 8.1.1.). UP element je úsek od -59 do -38, a Fis oblast od -150 do -60 (obr. 16, str. 22). UP element se dělí na proximální a distální část. Protože se u promotorů většinou vyskytuje jen proximální nebo distální část, méně často pak obě části najednou, jejich ustálené sekvence byly určeny odděleně. Samotná proximální sekvence má sled bází od -46 do -38 5'-AAAAAARNR-3' (R = purin, N = jakákoliv báze), distální sekvence od -59 do -46 5'-(NN)AWWWWT(TTTT)(N)-3' (W = A nebo T). Pokud se v promotoru nacházejí obě části najednou má sekvence UP elementu konsenzus od -59 do -38 5'-(NN)AAAWWTWTTTNNNAAANN-3' [2,17,28]. Je vidět že, UP element je u rRNA promotorů A a T bohatý s výskytem dlouhých úseků obsahujících vždy jeden typ báze.



obr. 15: Obecné schéma rRNA promotoru z *E. coli*. Převzato z [2].



obr. 16: Sekvence rRNA promotorů z *E. coli*, v rámečku -10 a -35 hexamer. Oblast distálního, proximálního UP elementu a Fis oblasti je označena nad sekvencemi. Převzato z [29].

8. Faktory ovlivňující regulaci rRNA promotorů u *E. coli*

frekvence

Regulací promotoru je zde myšlena schopnost jeho DNA sekvence ovlivňovat rychlost iniciace transkripce. U tohoto procesu lze rozlišit dvě úrovně, (i) interakci RNAP s DNA, tedy vzájemnou afinitu, (ii) rychlost izomerizace RP_C na RP_O a jeho následnou stabilitu.

(i) Pro afinitu RNAP k promotoru je důležitá vlastní sekvence promotoru (viz. 4.) a sekvence DNA před promotorem, tedy UP elementy a Fis oblast. UP elementy ovlivňují interakci DNA s podjednotkami α , Fis oblast ovlivňuje interakci RNAP s transkripčním faktorem Fis. Vzájemnou interakci RNAP a promotoru ovlivňuje i transkripční faktor H-NS.

(ii) Otevřené komplexy rRNA promotorů s RNAP jsou velmi nestabilní a mají krátký poločas rozpadu. Rychlost limitujícím krokem transkripce je tedy u rRNA promotorů právě čas, po který je RNAP s promotorem v RP_O . Stabilita RP_O určuje, zda bude mít iNTP dostatek času na to vstoupit do transkripční bubliny a jestli bude RNAP schopna vytvořit první vazbu mezi iniciačním a druhým NTP.

Pro tvorbu a stabilitu RP_O jsou důležité koncentrace malých efektorových molekul, iNTP a guanosin-5'-(tri)difosfát-3'-difosfát ((p)ppGpp), a sekvence jádra promotoru. Koncentrace malých efektorových molekul určují jakýsi regulační signál. Dá se říci, že transkripční faktory fungují jako zesilovače signálu tvořeného regulací malými regulačními molekulami [2].

8.1. Afinita RNAP k rRNA promotoru

8.1.1. UP element

S UP elementem promotoru interaguje α CTD, a to ze stejné strany helixu DNA jako podjednotka σ s -35 hexamerem. Pro interakci s DNA jsou důležité aminokyseliny T263, R265, G296, K298 (obr. 17). Tato oblast je téměř 100 % konzervována v bakteriálním světě. α CTD se váže do malého žlábků DNA v sekvenci adeninů UP elementu, který je díky sekvenci adeninů užší než standardní malý žlábek. Podjednotka α interaguje také s podjednotkou σ RNAP (AMK D259, E261) a tím zrychluje iniciaci transkripce (obr. 17) [17,30].

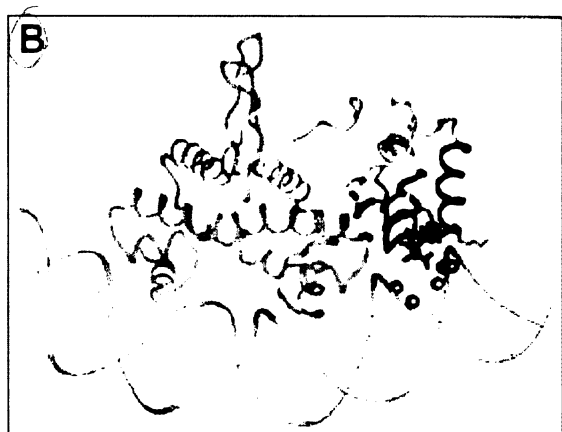


obr. 17: Interakce podjednotky α s DNA. Zeleně a modře označené AMK interagují s DNA v malém žlábků, žlutě označené AMK interagují s podjednotkou σ . Převzato z [30].

Pokud má UP element ideální konsenzus sekvenci zvyšuje za přítomnosti podjednotek α transkripci z jádra rRNA promotoru P1 až 330 x *in vivo*. To je 10 x více než u přirozeného UP elementu rRNA promotoru. Pokud je v UP elementu obsažena jen proximální část, interaguje s ní jedna podjednotka α a transkripce je zvýšena 170 x *in vitro*, pokud jen distální část, transkripce je zvýšena pouze 16 x. 340 x je iniciace transkripce zvýšena *in vitro*, pokud jsou obsaženy obě části a interagují obě podjednotky α , zvýšení je tedy srovnatelné jako *in vivo*. Pokud podjednotka α interaguje ještě s proteinem Fis, je rychlost transkripce ještě zvýšena a to nejspíše ještě větší afinitou RNAP k promotoru [17,29].

8.1.2. Fis faktor

Fis je heterodimerní protein, který stimuluje transkripci při dostatku živin. Tento protein interaguje jak s DNA templátem, tak s RNAP. S DNA interaguje na Fis místech promotoru a to na velkém žlábků DNA. Kontakt s RNAP probíhá přes jednu podjednotku α , konkrétně přes její AMK E273 (obr. 18), a to většinou s podjednotkou navázanou na podjednotku β' . Z experimentů se zdá, že samotná podjednotka α interaguje s DNA jinak než za přítomnosti Fis [29].

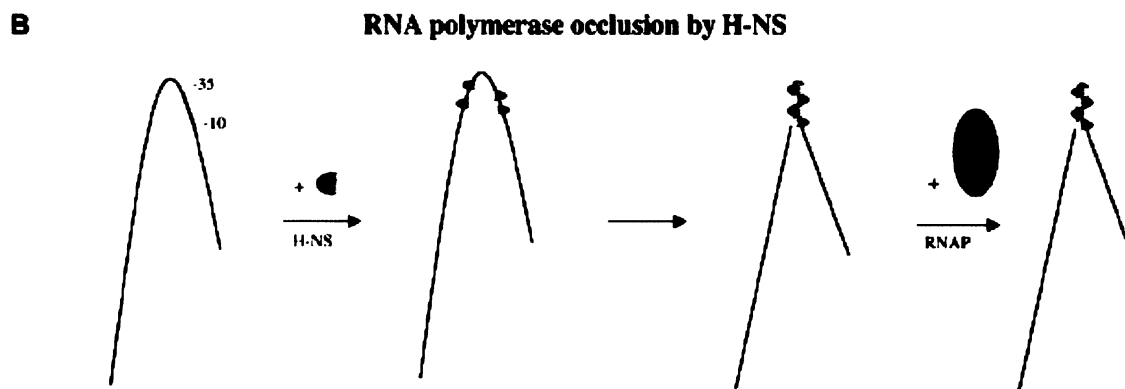


obr. 18: Interakce Fis a podjednotky α s DNA: modrý Fis, červená interakce Fis – podjednotka α , žluté kuličky interakce podjednotky α s DNA. Převzato z [29].

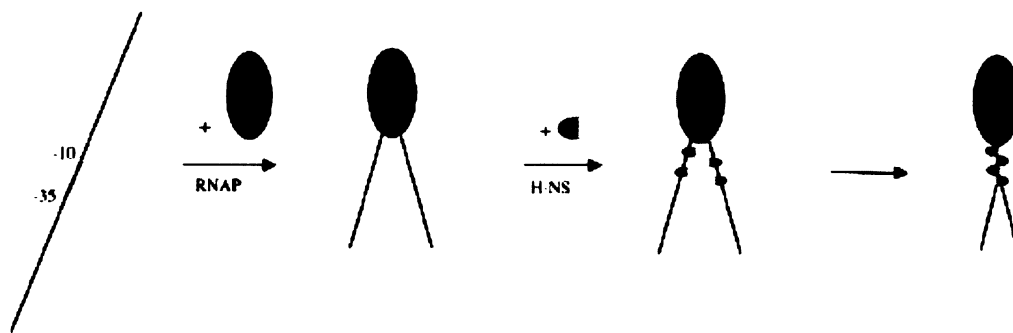
8.1.3. Bílkovina H-NS

H-NS byl popsán jako stabilizující protein důležitý při reakci na teplotní šok, protože sbaluje DNA do smyček a zajišťuje tím její stabilizaci. *In vitro* má H-NS vliv na topologii a kondenzaci DNA. Nyní je však jasné, že hraje důležitou roli v regulaci transkripce [31].

Za přítomnosti proteinu H-NS je nasedání RNAP na DNA znemožňováno jeho interakcí s DNA. (i) Tvořením smyček DNA v oblasti promotoru a tím znemožnění nasednutí RNAP (obr. 19). (ii) Chycením nasednuté RNAP na promotoru a vytvořením smyčky DNA vláken před a za nasednutou RNAP (obr. 20, str. 23).



obr. 19: Zablokování promotoru proteinem H-NS. Převzato z [31].

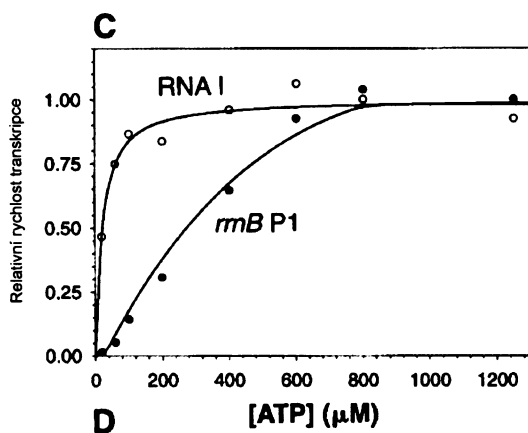
A**RNA polymerase trapping by H-NS**

obr. 20: Zachycení RNAP nasedlé na promotoru pomocí proteinu H-NS. Převzato z [31].

8.2. Stabilita otevřeného komplexu RP_O a její role v regulaci rRNA promotorů

Při náhlých změnách prostředí (změnou koncentrace živin) musí buňka reagovat okamžitě změnou rychlosti transkripce rRNA. Tato reakce se neděje pomocí regulačních proteinů, jejich syntéza *de novo* by trvala příliš dlouho. Rychlá regulace transkripce je zajišťována ovlivněním rychlosti iniciace transkripce pomocí malých molekulových efektorů, iNTP a (p)ppGpp, a to změnou jejich koncentrace.

Pozitivní regulaci zajišťuje iNTP, jehož zvýšená koncentrace má za následek zvýšení rychlosti transkripce (obr. 23) [2,26,32,33]. Tento vliv [iNTP] na promotorovou aktivitu je významný pouze u promotorů, které jsou senzitivní vůči změnám [iNTP]. „Senzitivita“ zde znamená, že promotor vyžaduje relativně vysokou [iNTP] pro maximální rychlost iniciace transkripce *in vitro*. Tato charakteristika pak koreluje s jeho regulací pomocí [iNTP] v buňce. Mechanismem aktivace iniciace transkripce zvýšením [iNTP] je pravděpodobně zvýšení stability RP_O [33].



obr. 23: Vliv koncentrace iNTP na rychlost transkripce. Graf představuje závislost relativní rychlosti (vzhledem k maximu) transkripce na koncentraci ATP u *rrnB* P1 a neregulované RNA I. Převzato z [33].

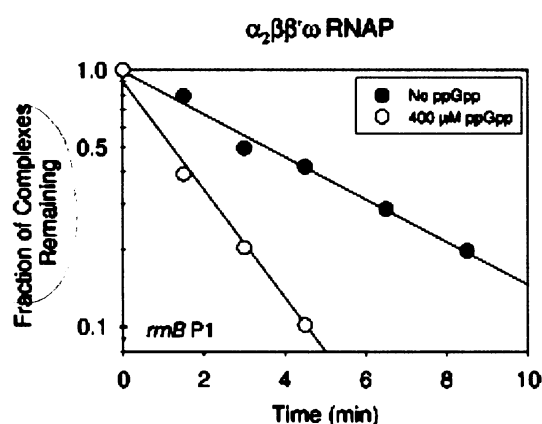
ppGpp je syntetizován proteinem RelA, který je navázán na ribosomu, a je odbouráván proteinem SpoT. Za přítomnosti nenabitých tRNA (tRNA bez navázané AMK) v A místě ribosomu začne enzym RelA syntetizovat ppGpp. ppGpp obecně u všech promotorů zvyšuje k_i i k_d u procesu iniciace transkripce, zrychluje tedy tvorbu RP_O , ale zároveň snižuje jeho stabilitu.

U promotorů s velkou stabilitou RP_O (poločas rozpadu řádově desítky až stovky minut) nemá koncentrace ppGpp výrazný vliv na rychlost transkripce, protože tvorba a stabilita RP_O u nich není krokem určujícím rychlost iniciace transkripce.

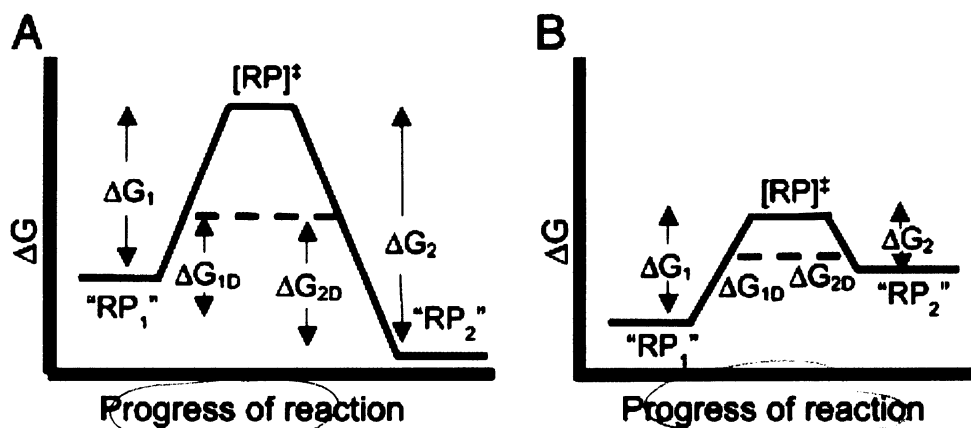
U promotorů, kde je rychlost iniciace transkripce limitována rychlostí izomerizace (nízká k_i například u promotorů pro tvorbu AMK), ppGpp urychluje izomerizaci a tím iniciaci transkripce. ppGpp u těchto promotorů sice urychluje rozpad RP_O (zvyšuje k_d), ale jelikož je u těchto promotorů k_d vysoká, nemá toto snížení za následek snížení rychlosti iniciace [26].

U rRNA promotorů, které mají poločas rozpadu otevřeného komplexu velmi krátký (řádové desítky sekund), jeho další zkrácení (zvýšení k_d) pomocí ppGpp (obr. 21) má za následek snížení rychlosti iniciace transkripce. Termodynamický mechanismus této regulace je vysvětlen snížením aktivační energie reakce přechodu RP_C (nebo jiného intermediátu) na RP_O (obr. 22, str. 27).

Těchto mechanismů buňka využívá při pozitivní i negativní regulaci AMK a rRNA promotorů. Přesné vazebné místo na RNAP ani mechanismus ovlivňování poločasu rozpadu otevřeného komplexu molekulou ppGpp ještě není zcela znám [34], ale nejspíše se bude jednat o allosterický efekt.



obr. 21: Vliv ppGpp na stabilitu RP_O . Graf představuje závislost logaritmu množství RP_O na čase, za přítomnosti a bez ppGpp. Převzato z [19].



obr. 22: A: Usnadnění přechodu do otevřeného komplexu (RP_2) u AMK promotoru snížením aktivační energie přechodu. B: Destabilizace otevřeného komplexu u rRNA promotoru snížením aktivační energie zpětného přechodu. Převzato z [26].

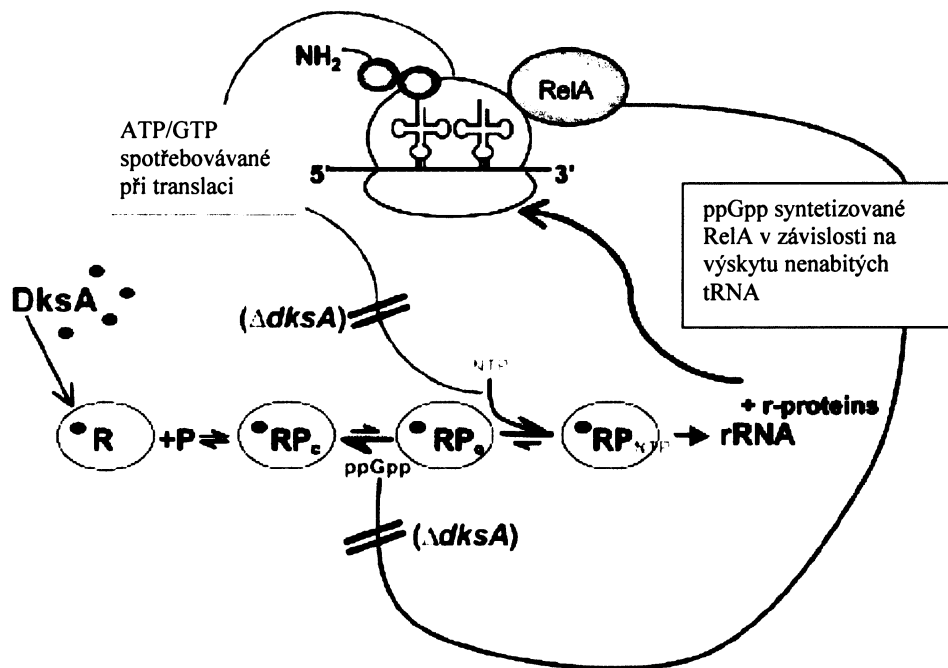
8.3. Faktory podmiňující regulaci pomocí malých efektorových molekul

8.3.1. Bílkovinné faktory

Celý tento mechanismus regulace malými efektorovými molekulami funguje *in vivo* jen za přítomnosti proteinu DksA. DksA má v buňce i další funkce, při jeho absenci nebo naopak příliš velké koncentraci nastávají problémy s funkcí chaperonů, genovou expresí, diferenciací buňky, syntézou AMK a průběhem virulence [19,26,35].

DksA zajišťuje senzitivitu RNAP ke koncentraci iNTP a ppGpp (obr. 24, str. 28). Tento protein interaguje s RNAP i bez DNA promotoru a podle strukturní analýzy zasahuje svým „coiled-coil“ motivem do sekundárního kanálu RNAP, a tím koordinuje Mg^{2+} ion k vazbě s ppGpp.

Do sekundárního kanálu RNAP se mohou vázat i další proteiny jako GreA a GreB. GreB je *in vitro* schopno zastoupit funkci DksA při regulaci rRNA promotorů, *in vivo* však GreB nemá díky své malé koncentraci na regulaci vliv a jeho delece v buňce nemá žádný efekt. GreA má nízkou afinitu k RNAP a proto má i *in vitro* na regulaci rRNA promotorů jen malý vliv. Skutečná biologická funkce Gre faktorů je spíše napomáhání hydrolýze RNA, a tak usnadnění RNAP správnému přepisování RNA při případném zastavení transkripce [36].



obr. 24: Schéma ovlivnění transkripce malými efektorovými molekulami, kde je zapotřebí protein DksA. Převzato z [35].

8.3.2. DNA sekvence promotoru

U *E. coli* bylo popsáno několik výrazných sekvenčních prvků pro regulaci promotoru malými efektorovými molekulami (ovlivnění stability RP_0). Jsou to, zejména (i) sekvence diskriminátoru a (ii) délka mezerníku.

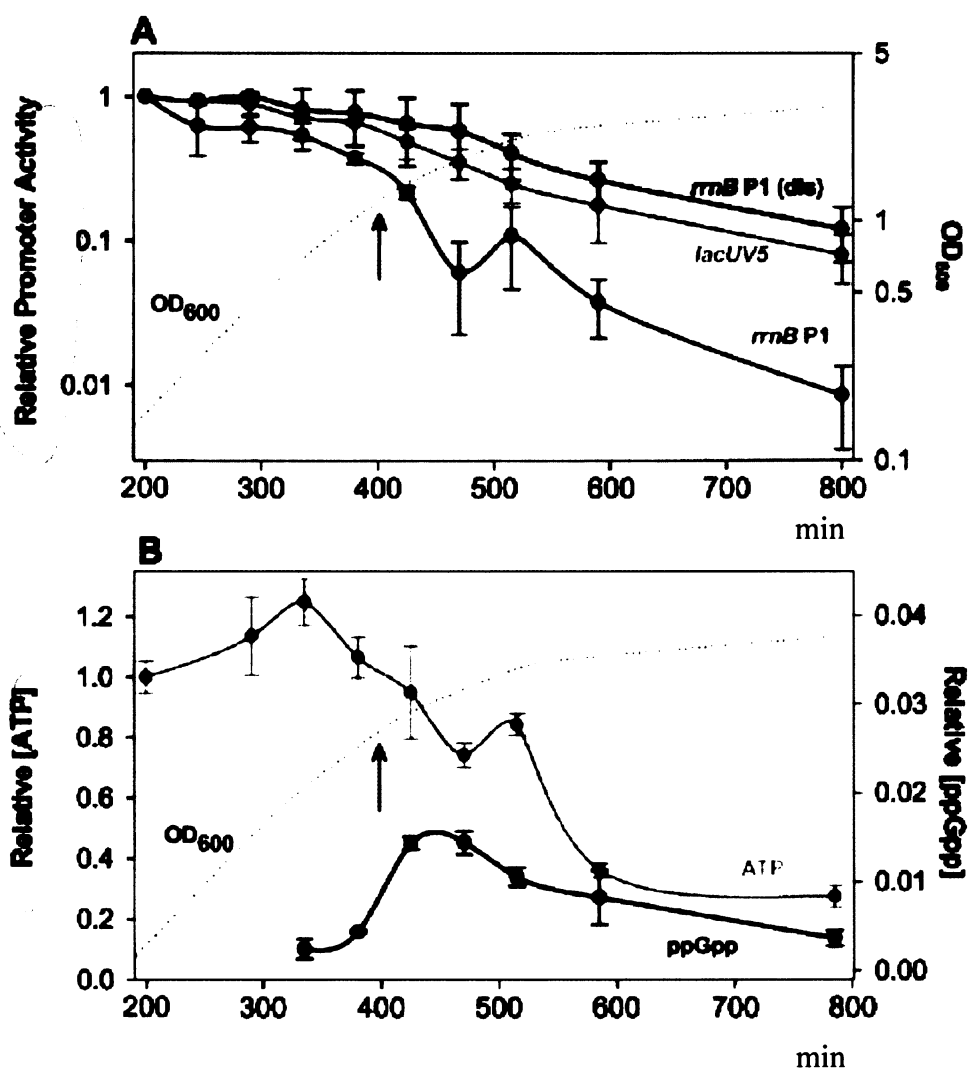
(i) Záměnou G a C bází za A a T báze v diskriminátoru se zcela ztrácí regulovatelnost promotoru. Tento efekt je přisuzován ovlivnění tvorby transkripční bubliny. Nedávno byly navíc určeny pozice a identity bází v diskriminátoru, které tento efekt způsobují. Nejvýznamnější je báze v pozici -7 od iniciačního nukleotidu a to na netemplátovém vlákně. Její záměnou u regulovaných promotorů z konzervovaného C na jakoukoliv jinou bázi se značně zvýší (až 38 x záměnou na G) stabilita jejich otevřených komplexů. To se děje nejspíše odlišnou interakcí mezi netemplátovým vláknem promotoru a 1.2 oblastí podjednotky σ [24,37]. Zvýšení stability otevřeného komplexu sníží regulovatelnost promotoru malými efektorovými molekulami.

(ii) Změnou délky mezerníku z 16 bází na jakoukoliv jinou délku se regulace též ztrácí [22].

8.4. Řízení transkripce pomocí malých efektorových molekul *in vivo*

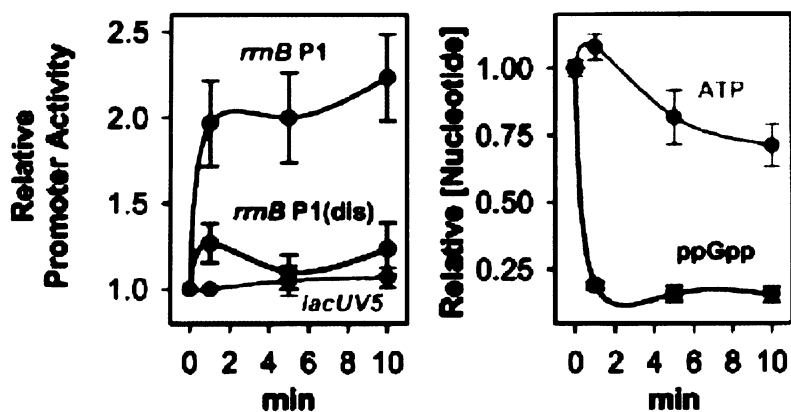
Pokud bychom sledovali růstovou křivku bakteriální kultury je patrné, že během exponenciální fáze růstu v bohatém mediu probíhá dělení buněk rychle a je tedy potřeba syntetizovat mnoho nových proteinů. Aktivita rRNA promotorů je v této fázi růstu vysoká.

Postupem času, kdy se medium začíná vyčerpávat, klesá rychlost dělení buněk a tedy i potřeba tvořit nové bílkoviny, klesá tedy i aktivita rRNA promotorů. Konečně, když je již medium chudé na živiny, dostávají se buňky do stacionární fáze a je zapotřebí zastavit syntézu nových proteinů. Aktivita rRNA proteinů se velmi sníží. Pokud buňky ze stacionární fáze nařídíme znovu do bohatého media, nebo naopak buňky z bohatého média do chudého, musí na tuto změnu rychle odpovědět změnou rychlosti transkripce. Tato regulace se děje změnou koncentrace iNTP a ppGpp, jak ukazují následující grafy závislosti promotorové aktivity na čase a koncentrace iNTP a ppGpp v různých fázích růstu buňky (obr. 25, obr. 26, 27 str. 30). V experimentech byly použity regulovaný promotor *rrnB* P1 a neregulovaný *rrnB* P1(dis) (viz kap. 8.3.2. (i), obr. 28, str. 30) a kontrolní konstitutivní *lacUV5*.

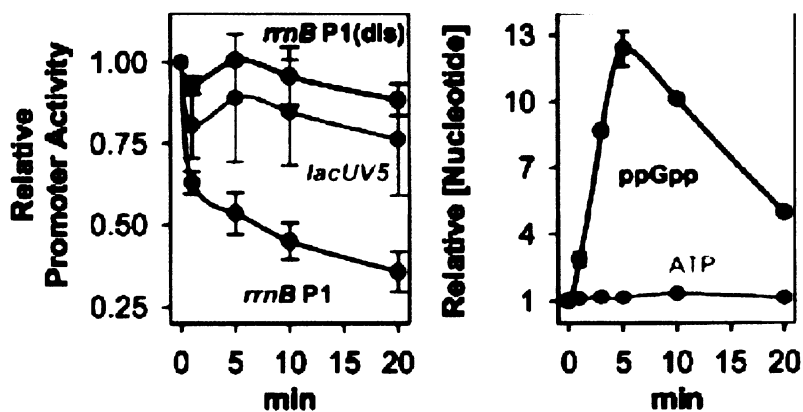


obr 25: A) Závislost relativní aktivity promotorů na čase. Červená křivka naznačuje aktivitu regulovaného rRNA P1 promotoru, černá a šedivá neregulovaných promotorů *rrnB* P1(dis) a *lacUV5* v průběhu růstu buněk, linka *OD*₆₀₀ je růstová křivka.

B) Závislost relativní koncentrace ATP a ppGpp na čase. Žlutá křivka naznačuje průběh vnitrobuněčné koncentrace ATP, zelená ppGpp v průběhu růstu buněk, modrá linka *OD*₆₀₀ je růstová křivka. Převzato z [32].



obr. 26: Situace při zředění buněk ze stacionární fáze růstu do bohatého media. Grafy znázorňují (i) relativní aktivitu jednotlivých promotorů, (ii) relativní koncentraci efektorových molekul: červená křivka je aktivita regulovaného rRNA P1 promotoru, černá a šedivá neregulovaných rRNA P1(dis) a lacUV5, žlutá křivka je koncentrace ATP, zelená ppGpp. Převzato z [32].



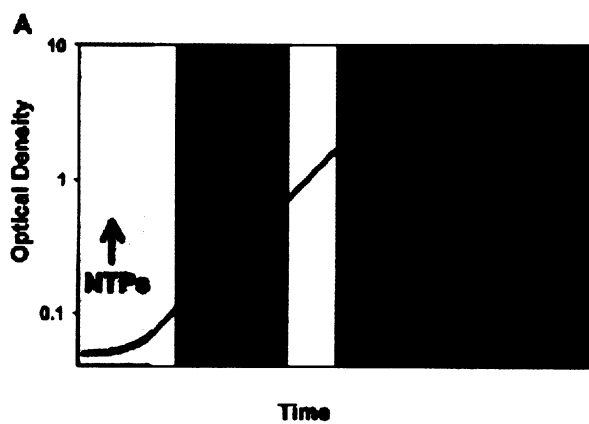
obr. 27: Situace při zředění buněk z exponenciální fáze růstu do chudého media. Grafy znázorňují (i) relativní aktivitu jednotlivých promotorů, (ii) relativní koncentraci efektorových molekul: červená křivka je aktivita regulovaného rRNA P1 promotoru, černá a šedivá neregulovaných rRNA P1(dis) a lacUV5, žlutá křivka je koncentrace ATP, zelená ppGpp. Převzato z [32].

rrnB P1(+1A) **cttgtcaggccggaataactccctataatgcgccaccA**
rrnB P1(dis) **cttgtcaggccggaataactccctataatgatacaccA**

obr. 28: Sekvence použitých promotorů. Převzato z [32].

Je patrné že aktivita rRNA promotorů reaguje na změny koncentrace iNTP jakožto pozitivního a ppGpp jako negativního regulátoru. Z podrobnější analýzy vyplývá, že iNTP řídí transkripci na začátku exponenciální fáze růstové křivky, ppGpp v průběhu exponenciální fáze a ve stacionární fázi je aktivita řízena oběmi molekulami. Tímto způsobem lze zajistit přesnou regulaci syntézy ribosomů a tedy rychlost syntézy bílkovin pro aktuální potřeby buňky (obr. 29, str. 31). Kontrola tohoto systému dvěma molekulami je výhodná z hlediska řízení v různých stadiích buňky. Koncentrace iNTP v exponenciální fázi musí být relativně konstantní i z jiných příčin, regulace pomocí ppGpp tento problém tedy řeší. Naopak v jiných

případech, například při začátku růstu, je koncentrace ppGpp již tak malá, že neovlivňuje transkripci, v tomto případě je regulace závislá na [iNTP] [32,35].



obr. 29: Schéma regulace rRNA transkripce malými efektorovými molekulami (černá linka je růstová křivka). Převzato z [32].

9. rRNA promotory u *B. subtilis*

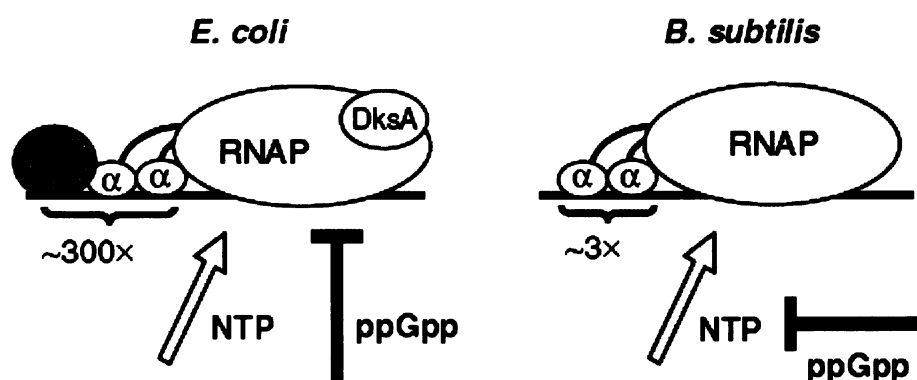
Geny pro rRNA u *B. subtilis* nejčastěji obsahují také dva promotory P1 a P2 (viz kap. 2.2., obr. 30). U obou promotorů P1 i P2 je ve všech případech iniciační nukleotid GTP. Diskriminátor mezi +1 a -10 hexamerem, který je G a C bohatý u *E. coli*, je u *B. subtilis* A a T bohatý. Mezerník mezi -35 a -10 hexamery je obvykle dlouhý 17 párů bází narozdíl od 16ti párů bází u *E. coli*. Hexamery u *B. subtilis* více odpovídají konsenzus sekvencím.

P1	-35 hex	-10 hex	+1
rrnB	ttgca ataataaacaggtgt	tata tattaaacg	
rrnJ	ttgcac tattttactagggtgg	tata tattatttcg	
rrnA	ttgact tagacaactgaagggtgt	tattc taataacg	
rrnI	ttgacc ttttgataatatccgtga	tata tattatttcg	
rrnH	není		
rrnW	není		
rrnG	není		
rrnO	tttac agtcataaaaattatgg	tata atcatttctg	
rrnE	ttgacc aaataaaacaggcatgg	tata tattaaacg	
rrnD	ttgact ctgattcttgaccgtgt	tata tattaaacg	
P2	-35 hex	-10 hex	+1
rrnB	ttgaca aaaaagaagctgaatgt	tata ttagtaaag	
rrnJ	ttgact tcactgagtcaacgagt	tata ataataaag	
rrnA	ttgac agtagcggcggtaaagt	tatg ataataaag	
rrnI	ttgact taaaagaagctaaatgt	tata gtaataaag	
rrnH	ttgact ttgaagaagtgacattg	tata ctaataaag	
rrnW	ttgact ttgaagaagtgacgttg	tata ctaataaag	
rrnG	ttgact ttgaagaagtgacattg	tata ctaataaag	
rrnO	ttgacc tagttaactaaaaatgt	tact attaagtag	
rrnE	není		
rrnD	ttgaca aaagaaagtcaaaatgt	tata ttaataaag	

obr. 30: Sekvence rRNA promotorů P1 a P2 z *B. subtilis*. Tučně červeně vyznačené konsenzus sekvence hexamerů, tučně modře oblasti neodpovídající konsenzus sekvencím, tučně černě iniciační nukleotid. Označení promotorů (P1 a P2) bylo historicky podle pořadí před transkripčním startem, v současnosti je na základě sekvenční podobnosti. Proto mají některé operony jen promotor P2.

10. Regulace rRNA promotorů u *B. subtilis*

V současné době se ukazuje, že regulace rRNA promotorů, popsána u *E. coli*, nemusí platit univerzálně. Příkladem je G^+ bakterie *B. subtilis*, u které byl popsán odlišný způsob regulace exprese rRNA promotorů [38] (obr. 31). Rozdíly začínají již na úrovni DNA sekvence promotoru. Pravidla, která byla odvozena pro promotory z *E. coli*, nejsou aplikovatelná na rRNA promotory z *B. subtilis*. Jak DNA sekvence podmiňuje regulaci rRNA promotorů u *B. subtilis* je v současnosti nejasné a právě tato diplomová práce pokládá tuto otázku.



obr. 31: Schéma regulace rRNA promotorů u *E. coli* a *B. subtilis*. Schéma naznačuje rozdíly v regulaci pomocí UP elementu a pomocí malých efektorových molekul. Převzato z [38].

Již popsáný rozdíl na úrovni DNA je relativně malý vliv UP elementů u *B. subtilis* na aktivitu promotorového jádra.

Dalším velkým rozdílem je, že u všech rRNA promotorů P1 i P2 z *B. subtilis* přímo svou koncentrací reguluje transkripci z malých efektorových molekul jen iNTP, a to GTP.

Dále, že ppGpp ovlivňuje transkripci rRNA promotorů z *B. subtilis* transkripci nepřímou, a to ovlivňováním koncentrace GTP. GTP je spotřebováváno při biosyntéze ppGpp enzymem RelA. Bylo prokázáno že ppGpp inhibuje enzym IMP dehydrogenázu, která je součástí biosyntézy GTP. IMP dehydrogenáza je první enzym v dráze směřující k syntéze GTP z IMP, posledního společného prekurzoru pro syntézu ATP a GTP. Tímto mechanismem také vzniká rozkmih hladin vnitrobuněčných koncentrací ATP a GTP při nedostatku AMK, kdy hladiny GTP klesají a ATP zároveň stoupají [39].

V současné době byla rovněž potvrzena domněnka, že u promotorů z *B. subtilis*, které podléhají regulaci při hladovění po AMK, je důležitá identita jejich iniciačního nukleotidu [40]. Z analýzy transkripčních startů těchto promotorů vyplývá, že většina pozitivně regulovaných promotorů má iniciační nukleotid ATP a většina negativně regulovaných

GTP. Toto uspořádání vyhovuje i fyziologickým požadavkům buňky s ohledem na změny hladin ATP a GTP při nedostatku AMK.

V genomu *B. subtilis* nebyl nalezen homolog proteinu DksA, který by zajišťoval senzitivitu RNAP k ppGpp jako u *E. coli*. *B. subtilis* nemá žádný gen kódující protein Fis ani jemu podobný, takže ovlivnění transkripce jeho pomocí je vyloučeno.

Konečně tento „odlišný“ způsob regulace nemusí být u bakterií výjimkou, jak ukazují současné experimenty s *Thermus thermophilus* [34,41].

Materiál a metody

11. Přístroje

Centrifugy

Beckman Model J2-21M - chlazená centrifuga s možností výměny rotorů

rotor JA 14 – na 6 kyvet o objemu 250 ml s maximálním odstředivým zrychlením 30 100 x g

Heraeus Cryofuge 8000 - chlazená centrifuga s výkyvným rotorem,

maximální zrychlení 8000 x g

Universal 16 R - chlazená mikrocentrifuga s maximálním odstředivým zrychlením 20 000 x g

Qualitron, INC. - stolní centrifuga na krátké stáčení roztoku v mikrozkuhavce

Elektroforézy

Vertikální elektroforéza Sigma - velikost gelu: 16,5 cm x 17,5 cm

Horizontální agarózová elektroforéza OWL - velikost gelu: 13 x 11,5 cm
7 x 8 cm

Agarózová elektroforéza - velikost gelu: 6,5 x 7,5 cm

Vertikální elektroforéza na proteiny Mini-Protean III (Bio-Rad) - velikost gelu: 9,5 - 7,5 cm

Elektroforetické zdroje Bio-Rad Model 500/200 a PAC 3000

Inkubátory a třepačky

Eppendorf Termostat 5320 – používán pro inkubaci roztoků s restrikčními endonukleázami

Thermo 120 – termoblok s možností nastavení teploty

Biological Termostat BT 120 – používán pro inkubace Petriho misek s transformovanými buňkami

Incubator Shaker Model G 25, New Brunswick Scientific (USA) – používán pro inkubace kultur v tekutých médiích

Elpan Water Bath Shaker type 357

Rotační třepačka RT60

Denzitometr: Bio-Rad Molecular Imager FX (USA)

Expoziční kazeta s expoziční fólií BAS-MS2040 Fuji (Japan)

Spektrofotometr - Shimadzu UV - 1601

PCR Cycler - PTC – 100 MJ Research

- PTC – 200 MJ Research

GM počítač mini-monitor Series 900

Sušička gelů Biometra D 62

Vakuová pumpa KNFLAB Laboport

12. Používané chemikálie, enzymy a další preparáty

Agar pro pevné půdy (Lachema, ČR)

Agaróza pro molekulární biologii (Sigma, SRN; Lachema; ČR)

Aqua pro injectione biotika (Biotika, SR)

Akrylamid (Serva, USA)

Amoniumpersulfat (Serva, USA)

Ampicilin (Biotika, SR)

Bromphenole blue (Serva, USA)

EDTA (chelaton III, Lachema, ČR)

GTP (Roche, USA)

ATP (Roche, USA)

CTP (Roche, USA)

UTP (Roche, USA)

[α - 32 P] UTP (M.G.P., ČR)

N, N, N', N' - tetramethylethyldiamine (TEMED) (LKB, Švédsko)

N, N' - methylenbisacrylamid (Serva, USA)

Restrikční endonukleázy –, *EcoR* I, *Hind* III, (TaKaRa, Japonsko)

RNA polymeráza holoenzym z *E. coli* (Epicentre biotechnologies USA)

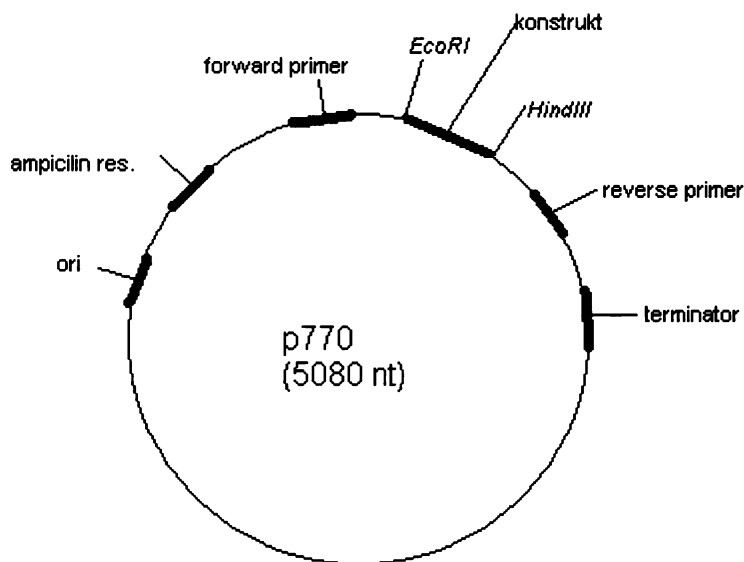
T4 DNA ligáza (Takara, Japonsko)

Trishydroxyethylaminomethan (Serva, USA)

13. Práce s DNA - příprava plazmidů s promotorovými konstrukty

Cílem klonování DNA bylo vytvořit plazmidy obsahující vždy různé promotorové jádro (-38 až +1 vzhledem k počátku transkripce). Takto vytvořené plazmidy sloužily jako DNA templát pro testování při transkripci *in vitro*. Pro klonování byl použit plazmid p770 o velikosti 5080 párů bází (obr. 32, str. 37). Tento plazmid obsahuje námi používaná restrikční místa pro enzymy *Eco* RI a *Hind* III. Mezi tato dvě místa byly vkládány DNA promotorové

konstrukty. Přibližně 120 bp od štěpícího místa *Hind* III je rhó-nezávislý transkripční terminátor, kde končí transkripce z vložených promotorových konstruktů. Dále plazmid obsahuje gen β -laktamázy, ta poskytuje rezistenci na ampicilin, což slouží jako selekční marker při klonování. Dále obsahuje promotor pro RNA 1, který je součástí počátku replikace (RNA1 slouží pro regulaci počtu kopií plazmidu v buňce).



obr. 32: Schéma plazmidu p770 s barevně vyznačenými charakteristikami a restrikčními místy. Forward (30F) a reverse (1620R) primer označují místa nasedání primerů pro sekvenaci.

13.1. Izolace plazmidové DNA z *Escherichia coli* DH5a

13.1.1. Minipreparace

Touto metodou byla získávána plazmidová DNA pro ověření sekvencí vložených DNA konstruktů. Minipreparace byla prováděna pomocí souprav QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy QIAGEN. Principem této izolace plazmidové DNA je adsorpce DNA na silikagel v prostředí vysoké koncentrace solí. RNA, proteiny a další nízkomolekulární nečistoty jsou z kolonky odmyvány zvýšenou koncentrací solí. Plazmidová DNA je z kolonky eluována nízkou koncentrací solí.

Použité roztoky:

Pufr P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNÁza A

Pufr P2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Pufr N, Pufr PB, Pufr PE

Puf EB: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Vlastní postup:

- Jednou kolonií bylo inokulováno 7,5 ml LB média s antibiotikem ampicilin (konečná koncentrace 100 µg/ml). Následně bylo inkubováno a třepáno 12-16 hodin ve 37°C.
- Roztok kultury byl centrifugován při 10 000 x g, 10 minut ve 4°C a supernatant byl odstraněn.
- Sediment byl resuspendován v 250 µl pufru P1 a převeden do mikrozkušavky.
- Bylo přidáno 250 µl pufru P2, směs byla promíchána převrácením mikrozkušavky (5 – 6 x) a inkubována 2 minuty na ledu.
- Lyze byla zastavena přidáním 350 µl pufru N3, směs byla opět několikrát promíchána a inkubována 1 minutu na ledu. Sraženina byla centrifugována 20 minut při 14 500 x g a 4°C.
- Supernatant byl promíchán a přepipetován na kolonku QIAprep, a převeden přes ni pomocí centrifugace (12 000 x g, 1 min., 4°C).
- Prošlý roztok byl přepipetován na kolonku a znovu přes ni pomocí centrifugace převeden.
- Kolonka s navázanou plazmidovou DNA byla přečištěna 1 x 0,5 ml pufru PB a 2 x 0,75 ml pufru PE.
- Zbytky roztoků byly z kolonky odstraněny pomocí centrifugace (1 min)
- Plazmidová DNA byla z kolonky eluována nanesením 50 µl pufru EB a následnou centrifugací roztoku do čisté mikrozkušavky.

13.1.2. Midipreparace

Touto metodou byla získávána plazmidová DNA o dostatečné čistotě i množství pro další pokusy. Midipreparace byla prováděna pomocí soupravy QIAfilter Plasmid Midi Kit od firmy QIAGEN. Principem této izolace plazmidové DNA je aniontoměničová chromatografie. Plazmidová DNA je na kolonce vychytávána na resinové částice při nízké koncentraci solí. RNA, proteiny a další nízkomolekulární nečistoty jsou z kolonky odmyvány zvýšenou koncentrací solí. Plazmidová DNA je z kolonky eluována vysokou koncentrací solí.

Použité roztoky:

Pufri P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNÁza

Pufri P2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Pufri P3: 3 M octan draselný, pH 5,5

Pufri QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % isopropanol (v/v), 0,15 % Triton X-100 (v/v)

Pufri QC: 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % isopropanol (v/v)

Pufri QF: 1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 8,5, 15 % isopropanol (v/v)

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Vlastní postup:

- Bakteriální kultura z glycerinové konzervy byla inokulována do média s antibiotikem ampicilin (konečná koncentrace 100 µg/ml). Kultura byla následně inkubována za stálého třepání 12-16 hodin ve 37°C.
- Narostlá kultura byla centrifugována při 10 000 x g, 10 minut, při teplotě 4°C. Supernatant byl poté dokonale odstraněn.
- Sediment byl resuspendován ve 4 ml pufri P1.
- Byly přidány 4 ml pufri P2 a roztok byl jemně promíchán otáčením kyvety do té doby než celý zmodral (cca 1,5 min). Zmodrání je způsobeno indikátorem, který je obsažen v pufri P2 a indikuje lyzi bakteriálních buněk.
- Přidáno 4 ml pufri P3 a vše bylo opět jemně promícháno do té doby než se roztok odbarvil.
- Následovala centrifugace při 8 000 x g, 20 minut, při 4°C.
- Supernatant byl přelit do stříkačky s filtrem a nanesen na kolonku ekvilibrovanou 4 ml pufri QBT.
- Kolonka byla samospádem promyta 2 x 10 ml pufri GC.
- Plazmidová DNA byla z kolonky eluována 5 ml pufri QF do sterilní zkumavky (falškonky).
- K eluátu bylo přidáno 3,5 ml isopropanolu, plazmidová DNA v tomto prostředí precipituje. Roztok byl následně centrifugován při 9 000 x g, 40 min, při 4°C.
- Supernatant byl opatrně slit, pelet plazmidové DNA opatrně opláchnut vychlazeným 70% ethanolem a usušen ve vakuu.
- Pelet byl rozpuštěn v 600 µl injekční vody a výsledný roztok dále čištěn.

13.1.3. Purifikace plazmidové DNA fenolem, chloroformem

Touto metodou se DNA čistí od znečišťujících proteinů, hlavně od RNÁzy, která se používá při midipreparaci.

Použité roztoky:

Fenol - ekvilibrovaný s 0,1 M Tris, pH 8-9, 0,1 % 8-hydroxychinolinem, 0,2 %
2-merkaptoethanolem

1<

Chloroform

Vlastní postup:

- K roztoku, který obsahoval plazmidovou DNA byl připipetován fenol v poměru 1 : 1, směs byla 5 minut míchána převrácením zkumavky a pak centrifugována 5 minut při 13 500 x g. Do nové mikrozukavky byla přepipetována vodná fáze.
- K vodné fázi byl připipetována 1/2 objemu fenolu a stejné množství chloroformu. Opět následovalo 5 minut míchání převrácením zkumavky a centrifugace 5 minut při 13 500 x g.
- Do nové mikrozukavky byla přepipetována vodná fáze a byl připipetován stejný objem chloroformu, následovalo 5 minut míchání a centrifugace 5 minut při 13 500 x g.
- Plazmidová DNA ve vodné fázi byla precipitována ethanolem v prostředí octanu sodného (viz kap. 13.1.4.).

13.1.4. Precipitace plazmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného

Použité roztoky:

3 M octan sodný, pH 5,2
96 a 70 % ethanol

Vlastní postup:

- Roztok s plazmidovou DNA byl smíchán s 1/10 objemu 3 M octanu sodného, pH 5,2 a k takto vzniklému celkovému objemu byl přidán 2,2 násobek objemu 96 % ethanolu (– 20 °C) a vše bylo důkladně promícháno.
- Směs byla inkubována 15 minut v -80°C.
- Plazmidová DNA byla centrifugována 30 minut při 14 000 x g, při 4°C.
- Sediment byl opláchnut vychlazeným 70 % ethanolem, usušen a rozpuštěn v 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,9.
- Koncentrace plazmidové DNA byla určena spektrofotometricky, při vlnové délce 260 nm. Dále byl určen poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm.

- Plazmidová DNA byla dále analyzována restričním štěpením a pomocí elektroforézy.

13.1.5. Analýza plazmidové DNA restričním štěpením

Použité roztoky:

Restriční endonukleázy *Eco* RI a *Hind* III: konečná koncentrace 1–2 U/500ng DNA

Roztok EDTA 0,5 M, pH 5,2

10 x koncentrovaný restriční pufr

Vlastní postup:

- Nejprve byla namíchána restriční směs o objemu 10 – 50 μ l, která obsahovala (i) plazmidovou DNA, obvykle 10 μ l izolátu z minipreparace nebo 80 ng plazmidu vyizolovaného při midiprepu a (ii) restriční endonukleázu (RE) v koncentraci 1–2 U/500ng DNA a restriční pufr (1/10 celkového objemu).
- V případě, že bylo štěpeno dvěma RE současně, byl použit takový pufr, ve kterém oba enzymy vykazovaly vysokou aktivitu.
- Restriční směs byla inkubována 1 hodinu v 37°C.
- Po inkubaci byla reakce ukončena přidáním roztoku EDTA (chelaton III, sloučenina vyvazující hořčnaté ionty nezbytné pro aktivitu enzymu) na výslednou koncentraci 10 mM.

13.1.6. Elektroforetická analýza DNA

K analýze DNA byla použita horizontální elektroforéza v agarózovém gelu. Princip této metody je založen na skutečnosti, že se DNA v roztoku chová jako polyanion a v elektrickém poli putuje k anodě. Pro kontrolu velikosti DNA a pro odhad její koncentrace byl používán hmotnostní marker (DNA z bakteriofága λ štěpená enzymy *Hind* III a *Eco*R I, velikosti fragmentů v rozmezí 21 226 – 564 bp). Marker byl připravován v naší laboratoři.

Použité roztoky :

Agaróza

50x TAE, pH 8,0 – 2 M Tris-acetát, 50 mM EDTA, pH 8,0

ethidium bromid – 10 mg/ml

vzorkový pufr pro DNA - 2,5 mg/ml bromfenolová modř, 2,5 mg/ml xylen cyanol, 30 % glycerol, 6 mM EDTA

Vlastní postup:

- Nejprve byla sestavena elektroforéza.
- Požadované množství agarózy (hmotnostní jednotky odpovídají objemovým) bylo v mikrovlnné troubě rozvařeno v 1x TAE na 0,8 % agar.
- Agaróza byla poté ochlazená pod tekoucí vodou na teplotu asi 50°C a byl do ní přidán ethidium bromid na výslednou koncentraci 0,5 µg/ml (ethidium bromid byl zároveň přidán do zbylého elektroforetického pufru).
- Na připravený gel byly nanášeny vzorky plazmidové DNA a hmotnostní marker.
- Po nanesení vzorků byla DNA dělena za stálého napětí 5 V.cm⁻¹. Ke sledování průběhu elektroforézy sloužila bromfenolová modř a xylen cyanol (bromfenolová modř putuje přibližně na úrovni 250 bp a xylen cyanol 2500 bp).
- Gely byly prohlíženy na UV transiluminátoru při vlnové délce 320 nm (v této oblasti je vidět ethidium bromid interkalovaný do DNA) a vybrané gely byly fotografovány přístrojem Polaroid nebo Panasonic do digitálního formátu.
- U plazmidů byla zkoumána jejich kvalita i kvantita. ?
- Pokud to vyžadoval další postup, byly vybrané DNA fragmenty z gelu izolovány.

13.1.6. Izolace DNA z gelu

Izolace DNA z gelu byla prováděna pomocí soupravy QIAEX II od firmy Qiagen. Preparace je založena na afinitní chromatografii, kdy se DNA váže na silikagelové kuličky v prostředí chaotropních solí.

Použité roztoky a materiál:

*Pufr QG, pufr PE, pufr EB
isopropanol*

Vlastní postup:

- Z agarózového gelu byl vyříznut bloček obsahující DNA pro izolaci.
- Dílek byl zvážen a vložen do mikrozkušavky.
- Do mikrozkušavky byl přidán pufr QG (300 µl pufru na 100 mg gelu).
- Směs byla důkladně promíchána a inkubována 10 minut v 50 °C (každé dvě minuty inkubace byla směs opět důkladně promíchána).

- Následně bylo upraveno pH roztoku podle přítomného barevného indikátoru. Pokud byla barva roztoku oranžová nebo fialová byl přidán 3 M octan draselný pH 5,0 dokud nebyl roztok žlutý.
- Ke směsi byl přidán isopropanol v poměru 100 µl na 100 mg gelu.
- Roztok byl přenesen na kolonku s membránou a centrifugován 1 minutu při 12 500 x g a tento krok zopakován.
- Na kolonku bylo naneseo 0,5 ml pufru QG, který byl centrifugován 1 minutu při 12 500 x g.
- Na kolonku bylo naneseo 0,75 ml pufru PE, který byl centrifugován 1 minutu při 12 500 x g.
- Kolonka byla centrifugována „na sucho“ 1 minutu při 12 500 x g a supernatant byl odstraněn a kolonka byla přenesena do nové mikrozkušavky.
- DNA byla z membrány eluována 50 µl pufru EB, který byl centrifugován do připravené mikrozkušavky.

13.2. Klonování DNA

13.2.1. Příprava DNA inzertů

Inzerty byly skládány z komplementárních jednovláknových DNA řetězců. Jednovláknové DNA řetězce byly komplementární tak, že na vzniklém dvouvlákně DNA vznikly přesahující lepivé konce odpovídající štěpení RE *Eco* RI a *Hind* III, které ale neobsahovaly fosfát na konci vláken. Schéma DNA inzertu:

tatttgacaaaaatgggctcgtggttgtaatatgagttcggctc

Ve schématu jsou žlutě a zeleně vyznačena komplementární vlákna DNA, červeně jsou vyznačeny lepivé konce odpovídající štěpení RE. Jednotlivé jednovláknové DNA řetězce byly objednávány u externí firmy (EastPort, ČR).

Vlastní postup:

- Do mikrozkušavky bylo napipetováno po 5 µl forward a reverse vlákna DNA, 10 µl 10 x pufru Tag pol, 5 µl 25 mM MgCl a doplněno vodou do objemu 100 µl.
- Směs byla vložena do PCR cycleru v programu kdy během 1 hodiny klesá teplota směsi z 95°C na 45°C rychlostí 1°C za minutu.

13.2.2. Příprava plazmidu a ligace DNA inzertu

Plazmid p770 byl nejprve štěpen odpovídajícími restrikčními endonukleázami (viz kap. 13.1.5.), restrikční směsi byly rozděleny agarózovou elektroforézou a štěpený plazmid z gelu izolován. Takto připravený plazmid byl použit pro ligaci s inzertem.

K ligaci byla používána T4 DNA ligáza od firmy Takara o koncentraci 20 U/μl. Enzym DNA ligáza spojuje kohezní konce plazmidů a ligovaných inzertů za vzniku fosfodiesterových vazeb. Reakce je energeticky náročná a vyžaduje přítomnost ATP v pufru.

Vlastní postup:

- Nejprve byly namíchané reakční směsi tak, aby obsahovaly plazmid a inzert v molárním poměru 1 : 5. Obvykle bylo použito 50 – 100 ng plazmidu, 1-5 U ligázy a ligační pufr o koncentraci 1 x.
- Směs byla inkubována 3 – 16 hodin při 16°C.
- Ligace byla ukončena inaktivací enzymu inkubací při 65°C po dobu 15 minut.

13.2.3. Transformace buněk *Escherichia coli* DH5a

Transformace všech kmenů byla prováděna metodou tepelného šoku.

Vlastní postup:

- Zmražené kompetentní buňky uchovávané při -80°C byly roztáty v ledové lázni.
- Ligační směs nebo plazmidy byly rozpipetovány do vychlazených (0°C) mikrokumavek a bylo připipetováno po 200 μl kompetentních buněk. Směsi byli lehce protřepány a inkubovány 30 minut v ledové lázni.
- Mikrokumavky byly inkubovány 90 sekund ve 42°C a pak 5 minut v ledové lázni.
- Do každé mikrokumavky byl přidán 1 ml LB média. Mikrokumavky byly třepány 1 hodinu v 37 °C v horizontální poloze.
- Buňky byly krátce centrifugovány, supernatanty byly odlity a sedimenty byly resuspendovány ve zbytku média, který stekl zpět ze stěn mikrokumavky.
- Buňky byly rozetřeny na misky se selekčním antibiotikem a inkubovány 12-16 hodin ve 37°C dnem vzhůru.

5 mi
h

13.2.4. Sekvenační reakce

K ověření úspěšnosti klonování a transformace byla použita sekvenační reakce a její vyhodnocení na kapilárním sekvenátoru. K amplifikaci byl použit systém BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). K sekvenaci byly použity tyto primery:

30 F forward primer pro p770 (~ 60 bp 5'směrem od *Eco* RI):

ccacctgacgtctaagaaacc

1620 R reverse primer pro p770 (~25 bp 3'směrem od *Hind* III):

gcgctacggcgtttcacttc

Vlastní postup:

- Nejprve byl do 200 μ l mikrozkušavek namíchán sekvenační mix o finálním objemu 10 μ l, Jedna reakce obsahovala:
 - 2 μ l premixu BigDye Terminátor
 - 1 μ l forward nebo reverse primeru (3-10 pmol)
 - 7 μ l plasmidové DNA z minipreparace vybraných kolonií
- Směs byla dobře promíchána, vložena do cycleru a reakce probíhala v cyklu sec
min
96°C 10 sec. - taní DNA, 45°C 5 sec. - nasedání primerů, 60°C 4 min – polymerace, celkově v 35ti cyklech.
- K produktům reakce bylo přidáno 10 μ l 3 M octanu sodného a 80 μ l vody. Vzorek byl promíchán a přepipetován do 1,5 ml mikrozkušavky.
- Bylo přidáno 5 μ g glykogenu a promícháno. Následně bylo přidáno 300 μ l 96 % ethanolu a opět promícháno, tímto krokem byl produkt sekvenční reakce sražen.
- Vzorek byl centrifugován 20 minut při 17 000 x g a 4°C.
- Pelet byl opláchnut 250 μ l 70% ethanolu a centrifugován jako v předchozím bodě.)
- Pelet byl usušen ve vakuu a odeslán do sekvenační laboratoře.
- DNA sekvence byla kontrolována pomocí programu Chromas a ClustalX. Bakteriální kolonie obsahující požadovaný plazmid s inzertem byly zakonzervovány do glycerinových konzerv (850 μ l buněčné kultury a 150 μ l glycerolu) a uschovány při -80°C.

14. Metody práce s proteiny

14.1. Exprese a izolace podjednotky σ^A RNAP z *B. subtilis*

Podjednotka σ^A RNAP byla exprimována v buňkách *E. coli* BL21. Tyto buňky obsahovaly gen pro podjednotku σ^A na plazmidu pCD2 pod IPTG inducibilním promotorem. Protein se exprimuje do inkluzních tělísek, které byly rozpuštěny guanidin hydrochloridem. Protein byl následně renaturován a poté izolován na diethylaminoethyl celulóse Whatman DE52 principem ionexové chromatografie.

Použité roztoky:

Lyzační pufr: 40 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,3 M KCl, 10 mM EDTA

Pufr A: 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,5 mM EDTA, 5 % glycerol (v/v), 0,1 mM DTT

Uchovávací pufr: 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,5 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 0,1 mM DTT, 50 % glycerol (v/v)

6 M guanidin-HCl

100 mM IPTG

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Vlastní postup:

- Z glycerolové konzervy bylo inokulováno 15 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) a inkubováno 12-16 hodin ve 37°C.
- 10 ml noční kultury bylo inokulováno do 1 l LB s AP (100 μ g/ml) a inkubováno při 37°C za stálého míchání dokud kultura nedosáhla absorbance $A_{600} = 0,6-0,8$.
- Následovala indukce exprese proteinu přidáním IPTG (finální koncentrace 0,1 mM) a inkubace pokračovala další 3 hodiny.
- Buňky byly centrifugovány při 7 700 x g, 15 minut při 4°C. Supernatant byl dokonale odstraněn a sediment byl resuspendován v 10 ml lyzačního pufru, další práce probíhaly při 4 °C.
- Byl přidán lysozym do finální koncentrace 100 μ g/ml a buňky byly 3 x sonikovány s přestávkami na ledu (1 min.).
- Inkluzní tělíška byla izolována centrifugací při 27 000 x g, 15 minut a znovu sonikována.
- Inkluzní tělíška byla znovu izolována centrifugací při 27 000 x g a supernatant byl odstraněn.
- Inkluzní tělíška byla promyta 10 ml vody a znovu centrifugována, celkem 2 x.
- Inkluzní tělíška byla rozpuštěna přidáním 10 ml 6 M guanidin-HCl a inkubována 30 minut při 4°C.

- Renaturace proteinu byla prováděna ředěním rozpuštěného proteinu pufrém A. Během 4 hodin byl původní roztok vždy 2 x ředěn do konečného objemu 1280 ml.
- K renaturovanému proteinu byl přidán 1 g diethylaminoethyl celulosy Whatman DE52 a směs byla míchána 5 hodin při 4°C. Roztok se nechal sedimentovat 12-16 hodin.
- Čirý roztok byl odsát, celulosa byla převedena na kolonu a promyta 2 x 5 ml pufru A.
- Protein byl eluován gradientem NaCl, vždy 5 ml pufru A se vzrůstající koncentrací NaCl (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 a 0,5 M).
- Frakce byly jímány manuálně po 1,5 ml, v jednotlivých frakcích byl zkoumán obsah proteinů metodou podle Bradfordové.
- Frakce byly dále analyzovány na SDS-PAGE elektroforéze.
- Frakce obsahující podjednotku σ^A RNAP byly spojeny a dialyzovány 2 x proti 0,5 l uchovávacího pufru.
- Protein byl uskladněn při -20°C.

l citac

14.2. Měření koncentrace bílkovin – metoda podle Bradfordové

Použité roztoky:

Bradfordovo činidlo – roztok Coomassie Brilliant Blue G-250

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (rozpustit v 50 ml ethanolu); 8,5 % H_3PO_4 (100 ml 85 % H_3PO_4 na 1l činidla) a doplnit dH_2O na 1l

BSA 1 $\mu g/\mu l$

Vlastní postup:

- Vzorek bílkoviny byl doplněn dH_2O na objem 200 μl a zároveň byla podle tabulky namíchána kalibrační křivka. Jako standard bylo použito BSA.

Množství BSA ($\mu g/\mu l$)	0	1	2	3	4	5	6	10	20	30
μl BSA (1 $\mu g/\mu l$)	0	1	2	3	4	5	6	10	20	30
dH_2O	200	199	198	197	196	195	194	190	180	170

- Dále bylo přidáno 800 μl činidla, směs byla dobře promíchána a inkubována 5 minut v pokojové teplotě (stálost roztoku je poté 5 – 20 minut od zamíchání).
- Vzorek byl měřen při A_{595} a naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel.

14.3. Polyakrylamidová elektroforéza proteinů

K elektroforetické analýze proteinů byla použita metoda vertikální polyakrylamidové elektroforézy v prostředí SDS (SDS-PAGE). Jednalo se o denaturující elektroforézu. Bylo používáno diskontinuální uspořádání, tedy použití zaostřovacího a separačního gelu. Proteiny byly děleny podle své molekulové hmotnosti.

Použité roztoky:

Vzorkový pufr: složení pro objem 8 ml: 1 ml 0,5 M Tris.HCl, pH 6,8; 0,8 ml Glycerol; 1,6 ml 10% SDS; 0,2 ml 0,05% Bromfenol. modř.; 1,2 ml 2-merkptoethanol; 3,2 dH₂O

30% AA, bis AA

1,5 M Tris.HCl, pH 8,8

0,5 M Tris.HCl, pH 6,8

10 % SDS

Elektrodový pufr (5x), pH 8.3

10 % APS

TEMED

roztok Coomassie Blue R-250 – 0,2 g Coomassie Brilliant R-250; 2,5 g CuSO₄.5 H₂O; 135 ml ethanolu (ve kterém byla rozpuštěna Coomassie Brilliant Blue R-250); 315 ml H₂O (v ní byl rozpuštěn CuSO₄); 50 ml kys. octové

odbarvovací roztok – 25 % methanol; 10 % kyselina octová
– použitý roztok se odbarvuje přes aktivní uhlí

uchovávací roztok na gely – 1 % glycerol; 4 % kyselina octová

Vlastní postup:

- 5 µl vzorku bylo smícháno s 5 µl vzorkového pufru a ponecháno 5 minut při 95°C. Analyzován byl obvykle 1 µg proteinu.
- Byla sestavena aparatura na elektroforézu Mini Protean III Bio-Rad.
- Podle tabulky byl namíchán roztok pro separační gely (množství jsou uvedena pro dva gely při použití aparatury Mini Protean III Bio-Rad).

Hustota gelu	12 %
30% AA, bis AA	4,0 ml
1,5 M Tris.HCl, pH 8,8	2,5 ml
dH ₂ O	3,5 ml
10% SDS	100 µl

Tab. 1

- Do směsi bylo přidáno 35 µl 10 % APS a 4,5 µl TEMED, směs byla dobře promíchána a roztok byl okamžitě injekční stříkačkou s jehlou nalit mezi skla, a to 1,5 cm pod hranici menšího skla. Nalité gely byly převrstveny dH₂O a nechány utuhnout.

- Po utužení byla odstraněna vrstva vody, a byl namíchán roztok pro zaostřovací gely (množství jsou uvedena pro dva gely při použití aparatury Mini Protean III Bio-Rad)

Hustota gelu	4 %
30% AA, bis AA	325 μ l
0,5 M Tris.HCl, pH 8,8	625 μ l
dH ₂ O	1,52 ml
10% SDS	25 μ l

- Před naléváním bylo přidáno 35 μ l 10% APS a 3,8 μ l TEMED. Roztoky byly pipetovány na povrch separačního gelu a do nich byly vsunuty hřebeny, zaostřovací gel se nechal polymerovat (přibližně 15 minut).
- Elektroforéza obvykle probíhala při napětí 180 V. Průběh elektroforézy byl sledován podle putování bromfenolové modři.
- Gely byly dány do roztoku Coomassie Brilliant Blue a za stálého míchání barveny alespoň 1 hodinu.
- Gely byly odbarvovány v odbarvovacím roztoku a poté uloženy ve 4°C v uchovávacím roztoku (alespoň 12 hod.), následně byly převedeny do digitální podoby.

14.4. Rekonstituce jádra RNAP a podjednotky σ^A z *B. subtilis*

Touto metodou se oba proteiny složí do funkční holoenzymu RNAP. Jádro RNAP bylo izolováno v naší laboratoři metodou afinitní chromatografie na Ni²⁺ iontech.

Použité roztoky:

Roztok jádra RNAP 3,26 μ M

Roztok σ^A podjednotky 54,7 μ M

Vlastní postup:

- Roztoky jádra RNAP a σ^A podjednotky byly v molárním poměru 1:9 smíchány a inkubovány 30 minut při 30°C. Saturující poměr 1:9 byl stanoven titrací σ^A k jádru RNAP.
- Takto rekonstituované proteiny se uchovávají při -20°C.
- Pro transkripční reakci *in vitro* se dále ředí uchovávacím pufrům na požadovanou koncentraci 300 nM.

15. Transkripční experimenty

Transkripční experimenty byly prováděny s RNAP z *B. subtilis* rekonstituovanou z jádra RNAP a z σ^A podjednotky nebo s komerčně dostupnou RNAP z *E. coli*. Tyto RNAP byly použity pro transkripci z jednotlivých plazmidů *in vitro*.

Při reakci byl použit radioaktivně značený nukleosid trifosfát - UTP. Radioaktivně značen je jeho α fosfát obsahující ^{32}P . ^{32}P je β^- zářič s poločasem rozpadu 14,3 dne a silou emitovaných β^- částic 1,71 MeV. Rozpad probíhá podle rovnice $^{32}\text{P} \rightarrow e^- + ^{32}\text{S}$. Záření vniklé rozpadem UTP zabudovaného do řetězce vnikající RNA se absorbuje pomocí absorpční folie. Množství produktu transkripční reakce bylo měřeno denzitometricky. Protože jsou vznikající transkripty vždy stejně velké, poměr jejich intenzit záření odpovídá poměru jejich množství a odpovídají tedy za daných podmínek rychlosti iniciace transkripce nebo množství RNAP schopné transkripce. Jelikož se pracuje se zdrojem ionizujícího záření, musí se používat příslušné ochranné pomůcky.

15.1. Určování K_{GTP} u jednotlivých promotorových konstruktů

K_{GTP} je hodnota koncentrace iniciačního nukleosidu GTP potřebná pro 50 % maximální rychlosti iniciace transkripce z daného promotoru. Hodnota K_{GTP} se používá jako srovnávací faktor mezi jednotlivými promotory. Transkripce se provádí při 10 různých koncentracích iniciačního nukleosid trifosfátu GTP, koncentrace ostatních reaktantů je konstantní. Množství produktu transkripční reakce přímo odpovídá rychlosti iniciace transkripce při dané koncentraci iNTP. Množství produktu se po elektroforéze měří denzitometricky.

Použité roztoky a materiál:

20x koncentrovaný transkripční pufr: 800 mM Tris.HCl 7,9, 200 mM MgCl₂, 20 mM DTT

20 mM ATP, CTP, GTP

1 mM UTP

[α - ^{32}P] UTP (9,25 Mbq)

zásobní roztok plazmidu 40ng/ μ l

1 M KCl

BSA 10 mg/ml

zásobní roztok RNAP z *B. subtilis* (300 nM)

zásobní roztok RNAP z *E. coli* (1U/ μ l)

stop roztok: 95 % formamid, 20 mM EDTA pH 8,0, 0,05 % bromfenolová modř, 0,05 % xylene cyanol

5,5 % roztok AA v 7M močovíně a TBE pufru

10 % APS

TEMED

10 x TBE pufr: 0,9 M Tris.HCl, 0,02 M EDTA pH 8,0, 0,9 M kyselina boritá

Vlastní postup:

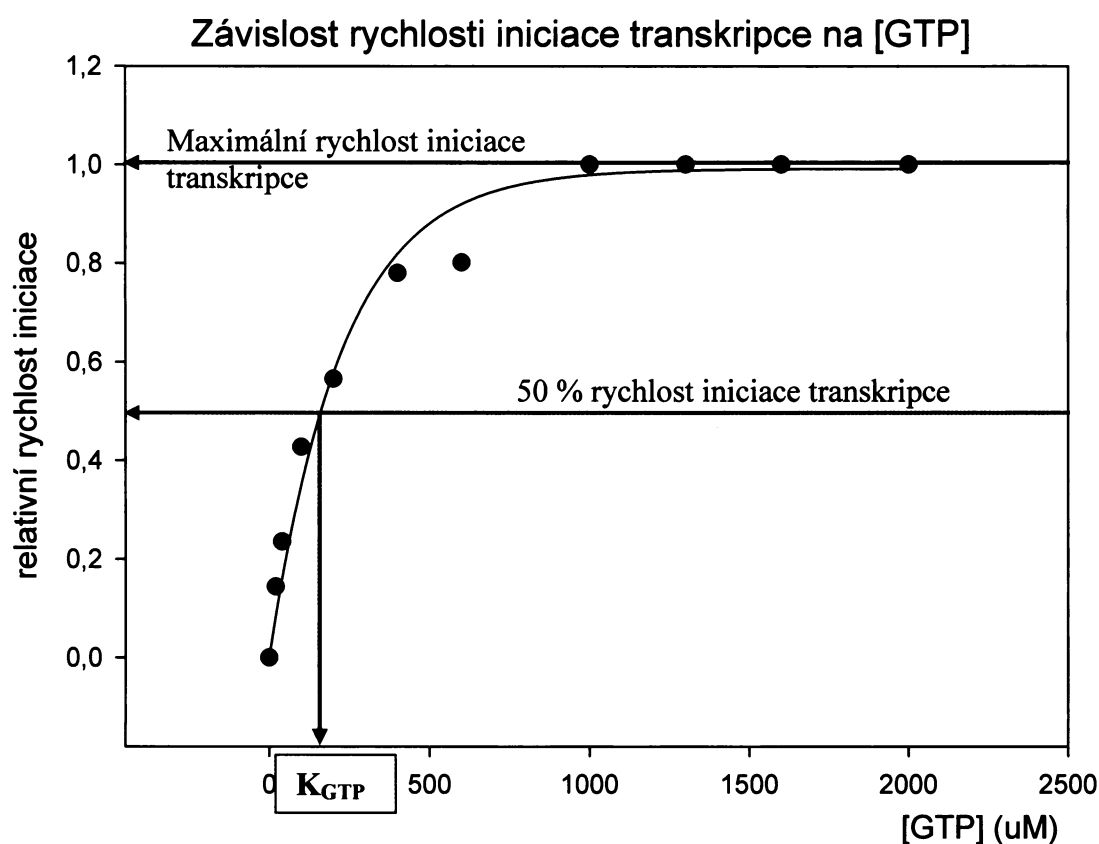
- Jelikož se při experimentu pracuje se zdrojem ionizujícího záření, musí se používat příslušné ochranné pomůcky (rukavice, brýle, plexisklové štíty) a pracovat na vyhrazeném místě (digestoř).
- Transkripční reakce byla prováděna při 20, 40, 100, 200, 400, 600, 1000, 1300, 1600, 2000 μM GTP. Vychází se ze zásobního roztoku 20mM GTP, který se příslušně ředí.
- Následně byla připravena reakční směs obsahující všechny složky potřebné pro transkripci, kromě RNAP. Složení reakční směsi pro 1 reakci (v praxi se připravuje pro více reakcí najednou příslušným znásobením):

Objem (μl)	Složka směsi
0,5	20 x koncentrovaný transkripční pufr
0,1	20 mM ATP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	20 mM CTP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	1 mM UTP (finální koncentrace 10 μM)
1	GTP příslušného ředění
0,1	$[\alpha - ^{32}\text{P}] \text{UTP}$
2	plazmid (finální množství 80 ng)
3,5	iH_2O
1,5	1M KCl (finální koncentrace 150mM)
0,1	BSA 10 mg/ml

iH_2O ?

- Do připravených mikrozkušavek bylo odměřeno 1 μl GTP příslušného ředění a k němu 8 μl reakční směsi.
- Zkušavky byly preinkubovány 5 minut při 30°C a reakce byla iniciována přidáním 1 μl RNAP (finální koncentrace 30 nM). Celkový objem reakce byl 10 μl .
- Transkripce probíhala 15 minut při 30°C a byla ukončena se přidáním 10 μl stop roztoku (obsahuje chelatony vychytávající Mg^{2+} ionty potřebné pro transkripci a formamid denaturující RNAP).
- Produkty transkripce byly separovány na 5,5 - 7 % polyakrylamidovém gelu v TBE pufru. Gel byl následně sušen a poté uzavřen do expoziční kazety, kde se na citlivou folii absorbuje záření vznikající z transkriptů.

- Primárním výsledkem byl obraz gelu se zřetelně ozářenými pásy odpovídající transkriptům. Intenzity jednotlivých pásů byly měřeny na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikovány pomocí softwaru Bio-Rad Quantity One. Množství transkriptu bylo určeno jako intenzita příslušného pásu zmenšená o intenzitu pozadí.
- Jednotlivé intenzity se vztahují vzhledem k hodnotě intenzity v plateau fázi. Plateau fáze je fáze, kdy se zvýšením koncentrace iGTP již nezvýší rychlost iniciace transkripce, tedy ani množství produktu transkripční reakce.
- Výsledky byly matematicky zpracovány, vyneseny do grafu (obr. 33) a z rovnice vynesené křivky byla určena hodnota K_{GTP} příslušná danému promotoru.
- Prokládaná křivka má tvar $y = a \cdot (1 - \exp(-b \cdot x))$ a pro K_{GTP} platí $K_{GTP} = -\ln(1 - (a/b)) / 0,5$



obr. 33: Závislost rychlosti iniciace transkripce na [GTP]. Modrá šipka vyznačuje maximální rychlost iniciace transkripce, zelená šipka 50 % rychlost iniciace transkripce, červená šipka vyznačuje K_{GTP} .

15.2. Určování poločasu rozpadu $t_{1/2}$ otevřeného komplexu jednotlivých promotorových konstruktů a RNAP pomocí heparinu

Poločas rozpadu $t_{1/2}$ určuje stabilitu otevřeného komplexů promotoru a RNAP. Tento komplex je charakteristický tím, že je odolný vůči působení kompetitoru, jako je heparin. Heparin je polyanionický sacharid. Heparin se zdá být schopný vázat volnou RNAP a disociovat v uzavřeném komplexu vázanou RNAP. Není ale schopný vázat RNAP

v otevřeném komplexu RNAP. K určení $t_{1/2}$ se používá metoda transkripce *in vitro* právě v přítomnosti heparinu. Na začátku experimentu se nechají reagovat a dojdít do rovnováhy molekuly promotoru a RNAP, vzniká tedy určité množství uzavřených a otevřených komplexů a určitý podíl promotoru a RNAP zůstává volný. Poté se do reakce přidá heparin, ten naváže volnou a disociuje v uzavřeném komplexu vázanou RNAP. V roztoku zůstávají jen otevřené komplexy RNAP a promotoru. Pokud se v této chvíli otevřený komplex rozpadne je přístupná RNAP navázána na kompetitor a znovu již nový otevřený komplex vznikat nemůže. Po přidání kompetitoru se z reakce odebírá vždy stejné množství roztoku a přidává se ke směsi všech čtyř NTP včetně radioaktivně značeného UTP. Z otevřených komplexů proběhne transkripce. Po terminaci transkripce disociuje RNAP z DNA templátu a je okamžitě navázána na kompetitor. Množství transkriptu tedy přímo odpovídá množství otevřených komplexů v čase, kdy byl přidán ke směsi NTP. Množství transkriptu se po elektroforéze měří denzitometricky. Pokud se odebírá roztok v časových intervalech, dostáváme jako výsledek rozpadovou řadu otevřeného komplexu RNAP se zkoumaným promotorem. Z rozpadové křivky se vypočte poločas rozpadu $t_{1/2}$.

Ke každému experimentu se provádí kontrolní experiment ověřující účinnost kompetitoru. Reakční směs tohoto experimentu na začátku obsahuje jak DNA templát, tak kompetitor heparin, ale neobsahuje RNAP. RNAP se ke směsi přidá v čase nula, a pokud je kompetitor v dostatečné koncentraci vyváže veškerou RNAP, transkripce vůbec neproběhne. Výsledkem kontrolního experimentu by tedy měla být nulová transkripce.

Použité roztoky a materiál:

20 x koncentrovaný transkripční puf: 800 mM Tris.HCl 7,9, 200 mM MgCl₂, 20 mM DTT

20 mM ATP, CTP, GTP

1 mM UTP

α ³²P UTP (aktivita 9,25 Mbq)

zásobní roztok plazmidu 40ng/ μ l

1 M KCl

BSA 10 mg/ml

zásobní roztok RNAP z *B. subtilis* (300 nM)

zásobní roztok RNAP z *E. coli* (1U/ μ l)

stop roztok: 95 % formamid, 20 mM EDTA pH 8,0, 0,05 % bromfenolová modř, 0,05 % xylene cyanol

5,5 % roztok AA v 7M močovíně a TBE pufu

10 % APS

TEMED

heparin 0,05 μ g/ μ l

10 x TBE puf: 0,9 M Tris.HCl, 0,02 M EDTA pH 8,0, 0,9 M kyselina boritá

Vlastní postup:

- Jelikož se při experimentech pracuje se zdrojem ionizujícího záření, musí se používat příslušné ochranné pomůcky.
- Nejdříve byly namíchány reakční směsi I a II a poté kontrolní reakční směs.
- Složení reakční směsi I pro jednu reakci:

Objem (μl)	Složka směsi
0,4	20 x koncentrovaný transkripční pufr
2	plazmid (finální množství 80 ng)
3,4	iH ₂ O
0,3	1M KCl (finální koncentrace 30mM)
0,1	BSA 10 mg/ml
1	RNAP (finální koncentrace 30 nM)

- Složení reakční směsi II pro jednu reakci:

Objem (μl)	Složka směsi
0,1	20 x koncentrovaný transkripční pufr
0,2	20 mM ATP (finální koncentrace 200 μM)
0,2	20 mM CTP (finální koncentrace 200 μM)
0,2	20 mM GTP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	1 mM UTP (finální koncentrace 10 μM)
0,1	α ³² P UTP
0,84	iH ₂ O
0,06	1M KCl (finální koncentrace 30mM)
0,2	heparin 0,05 μg/μl (finální koncentrace 0,5 μg/ml)

- Složení kontrolní reakční směsi pro jednu reakci:

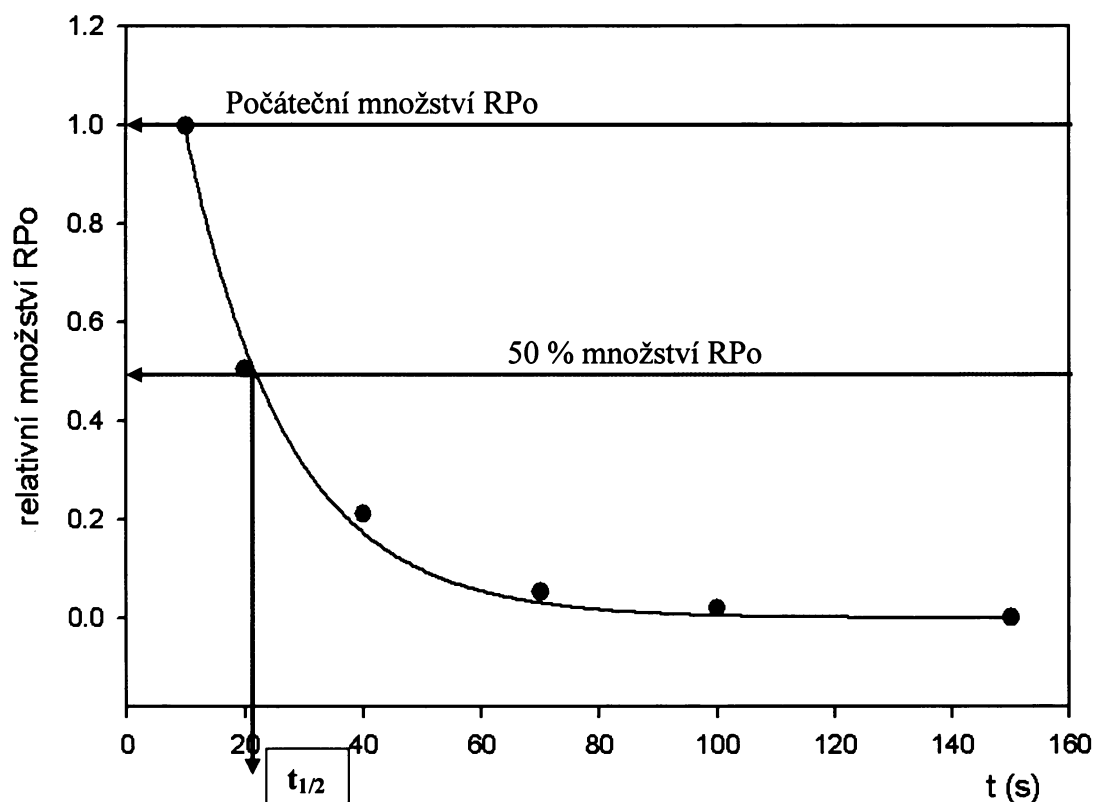
Objem (μl)	Složka směsi
0,5	20 x koncentrovaný transkripční pufr
0,2	20 mM ATP (finální koncentrace 200 μM)
0,2	20 mM CTP (finální koncentrace 200 μM)
0,2	20 mM GTP (finální koncentrace 200 μM)

0,1	1 mM UTP (finální koncentrace 10 μ M)
0,1	α 32 P UTP
2	plazmid (80 ng)
4,3	iH ₂ O
0,3	1M KCl (finální koncentrace 30mM)
0,1	BSA 10 mg/ml
1	heparin 0,05 μ g/ μ l (finální koncentrace 0,5 μ g/ml)

- Reakční směsi I a II byly namíchaný pro 6 reakcí, směs I byla inkubována 15 minut před startem reakce v 30°C.
- Reakční směs II byla rozpipetována do 6 zkumavek a inkubována 5 minut před startem reakce v 30°C.
- V čase „0“ byl do reakční směsi I přidán na jednu reakci 0,64 μ l heparinu 0,05 μ g/ μ l (finální koncentrace 0,5 μ g/ml) a poté byla reakční směs I v časových intervalech přidávána k reakční směsi II v objemech příslušných 1 reakci.
- Každá reakce probíhala 15 minut při 30°C a poté byla zastavena přidáním 10 μ l stop roztoku.
- Kontrolní směs byla inkubována 5 minut při 30°C a iniciována přidáním 1 μ l RNAP na jednu reakci.
- Kontrolní reakce probíhala také 15 minut při 30°C a poté byla zastavena přidáním 10 μ l stop roztoku.
- Všechny reakční produkty byly důkladně promíchány a centrifugovány.
- Produkty byly separovány na 5,5 -7 % polyakrylamidovém gelu v TBE pufru. Gel byl následně sušen a poté uzavřen do expoziční kazety, kde se na citlivou folii absorbuje záření vznikající z transkriptů.
- Primárním výsledkem byl obraz gelu s zřetelně ozářenými pásy. Intenzity jednotlivých pásu byly měřeny na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikovány pomocí softwaru Bio-Rad Quantity One.
- Množství transkriptu bylo určeno jako intenzita příslušného pásu zmenšená o intenzitu pozadí. Jednotlivé intenzity se vztahují vzhledem k hodnotě intenzity prvního nejsilnějšího pásu.
- Výsledky byly matematicky zpracovány, vyneseny do grafu (obr. 34, str. 56) a z rovnice vynesené křivky byl určen $t_{1/2}$ příslušný danému promotoru.

- Prokládaná křivka má tvar $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$ a pro $t_{1/2}$ platí $t_{1/2} = (-\ln(0,5/a))/b$.

Rozpad RP_0



obr. 34: Rozpad RP_0 v závislosti na čase. Modrá šipka vyznačuje počáteční množství RP_0 , zelená šipka 50 % množství RP_0 , červená poločas rozpadu $t_{1/2}$ RP_0 .

15.3. Určování poločasu rozpadu $t_{1/2}$ komplexů jednotlivých promotorových konstruktů a RNAP pomocí dsDNA

Postup experimentu je shodný jako při použití heparinu. Liší se v použití dsDNA, která má velkou afinitu k RNAP, jako kompetitoru. V experimentu se používá 600 nM finální koncentrace dsDNA.

Sekvence dsDNA kompetitoru:

5'GGCTCTTGACAAAAGTGTAAATTGTGCTATACTGTATTGGTATGGATGACAGA
ATTCGG3'

Cíl práce

Z teoretické části je patrné, že DNA sekvence rRNA promotoru, zejména jeho jádra je velmi důležitá pro jeho regulaci pomocí koncentrace iNTP jak u *E. coli* tak u *B. subtilis in vivo*. Všechny známé DNA elementy a pravidla pro DNA sekvenci rRNA promotoru z *E. coli*, které jsou podmínkou pro jeho fyziologickou regulaci pomocí [iNTP], jsou u rRNA promotorů z *B. subtilis* „ukázkově“ naopak. Jinými slovy, pokud by byl v *E. coli* rRNA promotor z *B. subtilis* veškerá tato regulace by byla ztracena. Klíčovou otázkou je, která část rRNA promotoru z *B. subtilis* je důležitá pro tuto regulaci.

U *B. subtilis* koreluje senzitivita promotoru k [iNTP] *in vitro* s jeho regulací pomocí [iNTP] *in vivo* [38]. Cílem praktické části je definovat úseky rRNA promotoru zodpovědné za senzitivitu iniciace transkripce ke koncentraci iniciačního nukleosid trifosfátu GTP v systému *in vitro* z *B. subtilis*.

Výsledky

16. Experimentální strategie

(i) V první fázi byla použita sada promotorů, kdy na jednom pólu této sady byl *in vivo* [iNTP] regulovaný *rrnB* P1, který *in vitro* požaduje vysokou koncentraci iNTP pro maximální rychlost iniciace transkripce. Na druhém pólu byl *in vivo* neregulovaný konstitutivní promotor genu *Pveg*, který je pro maximální rychlost iniciace transkripce *in vitro* saturován již nízkou koncentrací iNTP [38]. Oba promotory jsou z *B. subtilis*. Mezi těmito póly byla vytvořena škála chimérních promotorů, kdy byl *Pveg* progresivně měněn na *rrnB* P1. U těchto promotorů byl sledován požadavek na koncentraci iGTP pro 50 % maximální rychlosti iniciace transkripce *in vitro* (charakterizovaný konstantou K_{GTP} viz kap. 15.1.) jako funkce sekvence sledovaného promotoru. K_{GTP} vyjadřuje senzitivitu iniciace transkripce na daném promotoru ke koncentraci iNTP, tedy jak [iNTP] ovlivňuje rychlost iniciace. K_{GTP} slouží jako srovnání mezi jednotlivými promotory.

(ii) Následně, pro ověření hypotéz vytvořených na základě výsledků experimentů z první fáze, byly vytvořeny další promotorové konstrukty vycházející z regulovaných *rrnB* P1 a *Pilv*, a neregulovaného *Pveg*.

(iii) Navrhli jsme pravděpodobný mechanismus regulace promotorů pomocí [iNTP]. Protože se iNTP váže do transkripční bubliny v otevřeném komplexu (RP_O), zkoumali jsme zda stabilita RP_O promotorových konstruktů koreluje s jejich schopností být senzitivní k [iNTP]. Byly určovány poločasy rozpadu ($t_{1/2}$) komplexů jednotlivých promotorů a RNAP z *B. subtilis* a *E. coli*.

(iv) Provedli jsme srovnání K_{GTP} vybraných promotorů s jejich *in vivo* reakcí na pokles koncentrace GTP. *In vivo* experimenty provedl Mgr. Luděk Sojka.

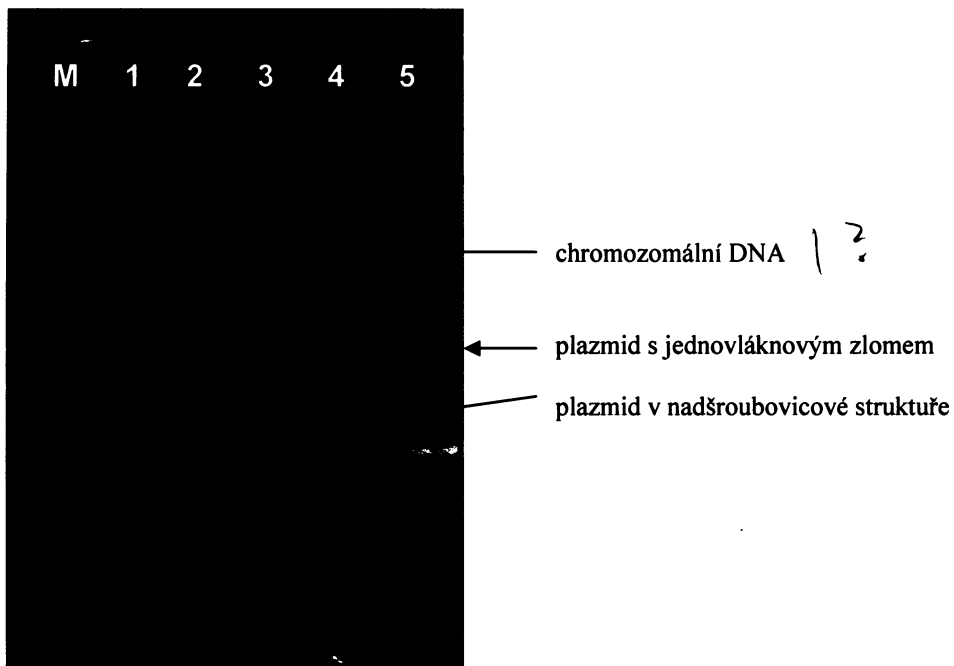
17. Příprava plazmidů pro experimenty *in vitro*

Promotorové konstrukty byly vloženy do plazmidového vektoru p770 (obr. 32, str. 37). Takto zhotovené plazmidy byly transformovány do buněk *E. coli* DH5 α (Tabulka 2).

Tabulka 2: Seznam vytvořených bakteriálních kmenů.

kmen	plazmid	genotyp	rezistence
138	p770 Pveg -38/+1,+1G	DH5 α	Ampicilin
176	p770 BPI -39/+1	DH5 α	Ampicilin
180	p770	DH5 α	Ampicilin
374	p770 P ilv 7,8GG	DH5 α	Ampicilin
382	p770 BPI -39 to -2, +1G=7	DH5 α	Ampicilin
383	p770 veg-10DBP1	DH5 α	Ampicilin
384	p770 veg+1=8	DH5 α	Ampicilin
387	p770 vegDiscBP1	DH5 α	Ampicilin
388	p770 veghexDBP1	DH5 α	Ampicilin
389	p770 vegSp-10DBP1	DH5 α	Ampicilin
517	p770 veg-10BP1+1=8G	DH5 α	Ampicilin
518	p770 veg-10BP1	DH5 α	Ampicilin
539	p770 veg-10DP ilv	DH5 α	Ampicilin
540	p770 BP1-10Dveg	DH5 α	Ampicilin

Ověření sekvencí promotorů vložených do plazmidů bylo provedeno sekvenací. Všechny plazmidy obsahovaly správnou sekvenci vloženého promotoru. Plazmidy byly poté z buněk *E. coli* izolovány v dostatečném množství a byly přečištěny od proteinů pomocí fenolace. Koncentrace jednotlivých plazmidů byla měřena spektrofotometricky a jejich čistota byla ověřena poměrem jejich A_{260}/A_{280} . Všechny plazmidy měly $A_{260}/A_{280} > 1,7$. Všechny plazmidy byly naředěny na koncentraci 40 ng/ μ l a jejich kvalita byla ověřena pomocí separace na agarózovém gelu (obr. 35, str. 60). Požadavkem bylo aby měly plazmidy nadšroubovicovou strukturu (z angl. „supercoiled structure“) Všechny použité roztoky plazmidů obsahovaly jen minimální množství chromozomální DNA nebo plazmidů s jednovláknovým zlomem (z angl. „open circle“) (obr. 35, str. 60, dráha 1). Plazmidová DNA, která nevyhovovala stanoveným kritériím (obr. 35, str. 60, dráha 4, 5) byla vyřazena a byla připravena nová DNA.



obr. 35: Ilustrační fotografie separace plazmidů. 0,8 % agarozový gel; M – marker λ DNA *Hind* III, *Eco* RI; 1, 2 plazmidové vzorky s minimálním množstvím chromozomální DNA i plazmidu s jednovláknovým zlomem; 3, 5 plazmidové vzorky s velkým obsahem plazmidu s jednovláknovým zlomem, 4 plazmidový vzorek s velkým obsahem chromozomální DNA.

18. Exprese a izolace podjednotky σ^A RNAP z *B. subtilis*

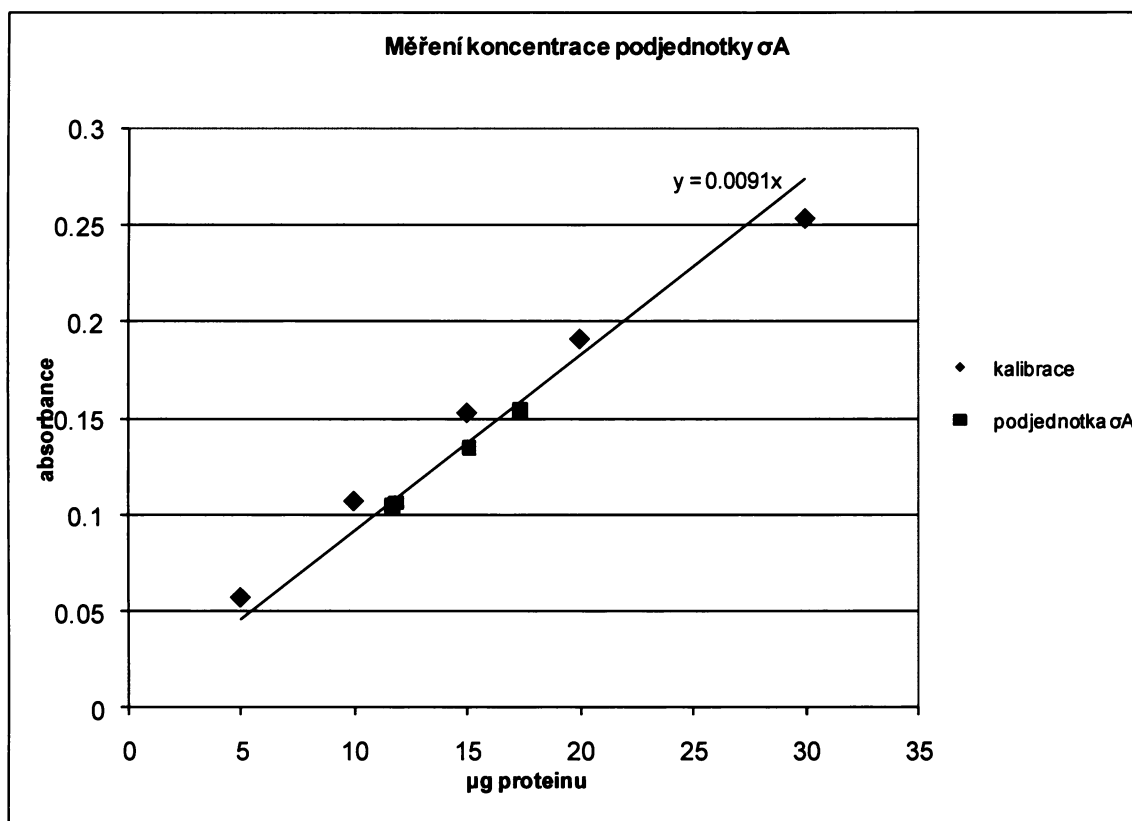
Buňky *E. coli* BL21 s plazmidem pCD2 obsahujícím gen pro podjednotku σ^A narostly v LB mediu do optické hustoty $OD_{600} = 0,84$. Poté byly indukovány IPTG a inkubovány ještě další 3 hodiny. Vzniklá inkluzní tělíska podjednotky σ^A byla izolována a protein byl renaturován. Renaturovaný protein byl navázán na 1 g diethylaminoethyl celulosy Whatman DE52. Celulosa Whatman DE52 byla sedimentací oddělena od renaturačního roztoku a nanesena na kolonku. Podjednotka σ^A byla poté eluována gradientem NaCl. Jímané frakce byly měřeny na obsah proteinů metodou podle Bradfordové. Frakce 4-11 obsahovaly větší množství proteinů a byly dále analyzovány na SDS-PAGE (obr. 36). Podle srovnání vůči jinému preparátu podjednotky σ^A bylo určeno že nejvíce obsahují podjednotku σ^A frakce 5-9.



obr. 36: SDS-PAGE analýza frakcí po eluci podjednotky σ^A z celulosy Whatman DE52 gradientem NaCl. 1 - roztok renaturovaného proteinu, 2 - roztok renaturačního pufru po oddělení od celulosy Whatman DE52, M - marker, 4-11 - jednotlivé frakce, σ^A čistá podjednotka σ^A .

Frakce 5-9 byly spojeny a dialyzovány uchovávacím puftrem. Koncentrace podjednotky σ^A byla měřena metodou podle Bradfordové. Bylo měřeno 5 a 7 μ l vzorku získaného po dialýze. Podle kalibrační křivky BSA (obr. 37, Tabulka 3, str. 62) byla spočtena výsledná koncentrace roztoku.

Výsledný roztok podjednotky σ^A měl koncentraci 2,30 μ g/ μ l (54,7 μ M), jeho kvalita a kvantita byla analyzována vůči jinému preparátu podjednotky σ^A pomocí SDS-PAGE (obr. 38, str. 62).



obr. 37: Kalibrační křivka BSA a výsledky měření koncentrace podjednotky σ^A .

Tabulka 3: Měření koncentrace výsledného roztoku podjednotky σ^A

Objem roztoku podjednotky σ^A (μl)	Absorbance	Odpovídající množství proteinu (μg)	Výsledná koncentrace roztoku podjednotky σ^A ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
5	0,0595	11,85	2,38
5	0,0586	11,67	2,34
7	0,0757	15,08	2,16
7	0,0871	17,35	2,32
průměr			2,30



obr. 38: SDS-PAGE analýza podjednotky σ^A : 1 - 1 μg podjednotky σ^A výsledného roztoku; 2 - vzorek podjednotky σ^A jiného preparátu.

19. Testované promotory I

Byly navrženy chimerní promotory, kde byla postupně zaměňována sekvence promotoru *Pveg* sekvencí *rrnB* P1. Byly modifikovány tyto elementy: (i) délka diskriminátoru, (ii) sekvence diskriminátoru, (iii) hexamery -10 a -35 a (iv) mezerník. Tímto způsobem vzniklo 8 různých promotorových sekvencí, postupně se měnících z promotoru *Pveg* k promotoru *rrnB* P1 (obr. 39). Na 5' konec promotorů bylo vloženo restriční místo pro enzym *Eco* RI (5'-G/AATTC-3'), na 3' konec promotorů pro enzym *Hind* III (5'-A/AGCTT-3'). Za iniciačním nukleotidem G a před restričním místem *Hind* III byla vložena sekvence TCT, která neobsahuje G, aby se zamezilo iniciaci na jiném nukleotidu (purinu) a aby všechny konstrukty dávaly vzniknout identické RNA.

Testované promotory I pro transkripci *in vitro*:

Označení promotorů

1. **WT *Pveg*+1=G** (*Pveg*) je promotor se sekvencí genu *Pveg* se změněným iniciačním nukleotidem z původního A na G, aby byl iniciační nukleotid všech promotorů shodný (záměna A na G nemá na senzitivitu k [iNTP] vliv [40])
2. **veg+1=8** je promotor s prodlouženým diskriminátorem promotoru *Pveg* o jeden nukleotid C.
3. **vegDiscBP1** je promotor *Pveg* s diskriminátorem promotoru *rrnB* P1
4. **veg-10DBP1** je promotor *Pveg* s -10 hexamerem a diskriminátorem promotoru *rrnB* P1
5. **veghexDBP1** je promotor *Pveg* s -10, -35 hexamerem a diskriminátorem promotoru *rrnB* P1
6. **vegSp-10dBP1** je promotor *Pveg* s mezerníkem, -10 hexamerem a diskriminátorem promotoru *rrnB* P1
7. **WT BP1** (BP1) je promotor *rrnB* P1
8. **BP1+1G=7** je promotor *rrnB* P1 se zkráceným diskriminátorem o jeden C.

	-35		-10		+1		
1.	aattctat	ttgacaaaaat	gggctcgtg	ttg	tacaat	aaatgt	gtcta
2.	aattctat	ttgacaaaaat	gggctcgtg	ttg	tacaat	aaatgt	tcta
3.	aattctat	ttgacaaaaat	gggctcgtg	ttg	tacaat		tcta
4.	aattctat	ttgacaaaaat	gggctcgtg	ttg			tcta
5.	aattctat		aaaatgggctcgtg	ttg			tcta
6.	aattctat	ttgaca					tcta
7.	aattc						tcta
8.	aattc						gtcta

obr. 39: Sekvence promotorů I od 5' k 3'; barevné schéma: žlutý podklad - sekvence promotoru *Pveg*, modrý podklad - sekvence promotoru *rrnB* P1, tučně červeně - hexamery promotoru *Pveg*, tučně modře - hexamery promotoru *rrnB* P1, modře - zbytky sekvence po štěpení restričními enzymy, tučně černě - iniciační nukleotid

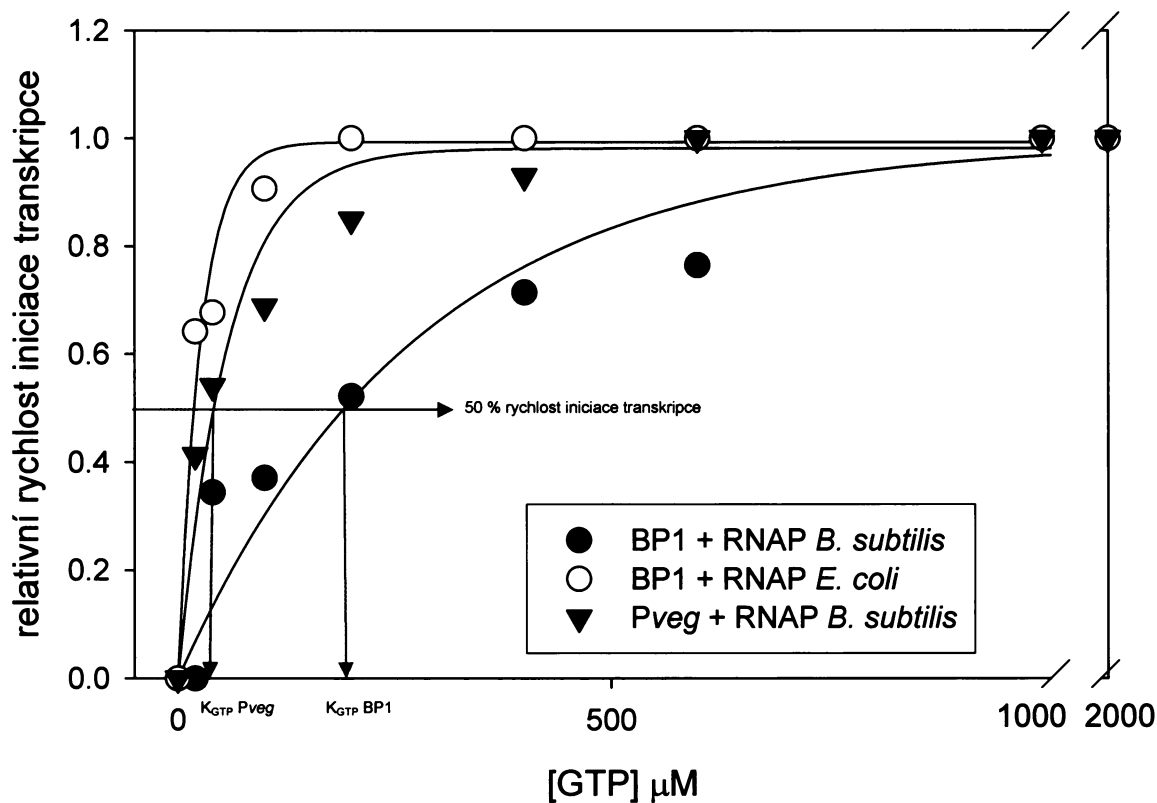
19.1. K_{GTP} promotorů Pveg a BP1 s RNAP z *B. subtilis* a *E. coli*

Nejprve byla znovu ověřena vstupní hypotéza, že *in vivo* regulovaný promotor BP1 má oproti *in vivo* neregulovanému Pveg vysoký požadavek na koncentraci iNTP pro maximální rychlost iniciace transkripce s RNAP z *B. subtilis in vitro* (obr. 40, 41). Tento rozdíl je patrný z rozdílu jejich K_{GTP} . K_{GTP} BP1 je 6,7 x vyšší než K_{GTP} Pveg.

Dále bylo ukázáno, že BP1 ztrácí svůj požadavek na vysokou koncentraci iNTP pro maximální rychlost iniciace transkripce s RNAP z *E. coli in vitro* a chová se při těchto podmínkách podobně jako Pveg (obr. 40)

RNAP	PROMOTOR <i>B. subtilis</i>	K_{GTP} (μ M)	[GTP]
<i>B. subtilis</i>	BP1	172	
<i>B. subtilis</i>	Pveg	26	
<i>E. coli</i>	BP1	18	
<i>E. coli</i>	Pveg	16	

obr. 40: Regulace transkripce pomocí [iNTP]. V řádku vždy použita RNAP, promotor a K_{GTP} . Primární data experimentu - elektroforeogram radioaktivně značených produktů transkripce *in vitro*.



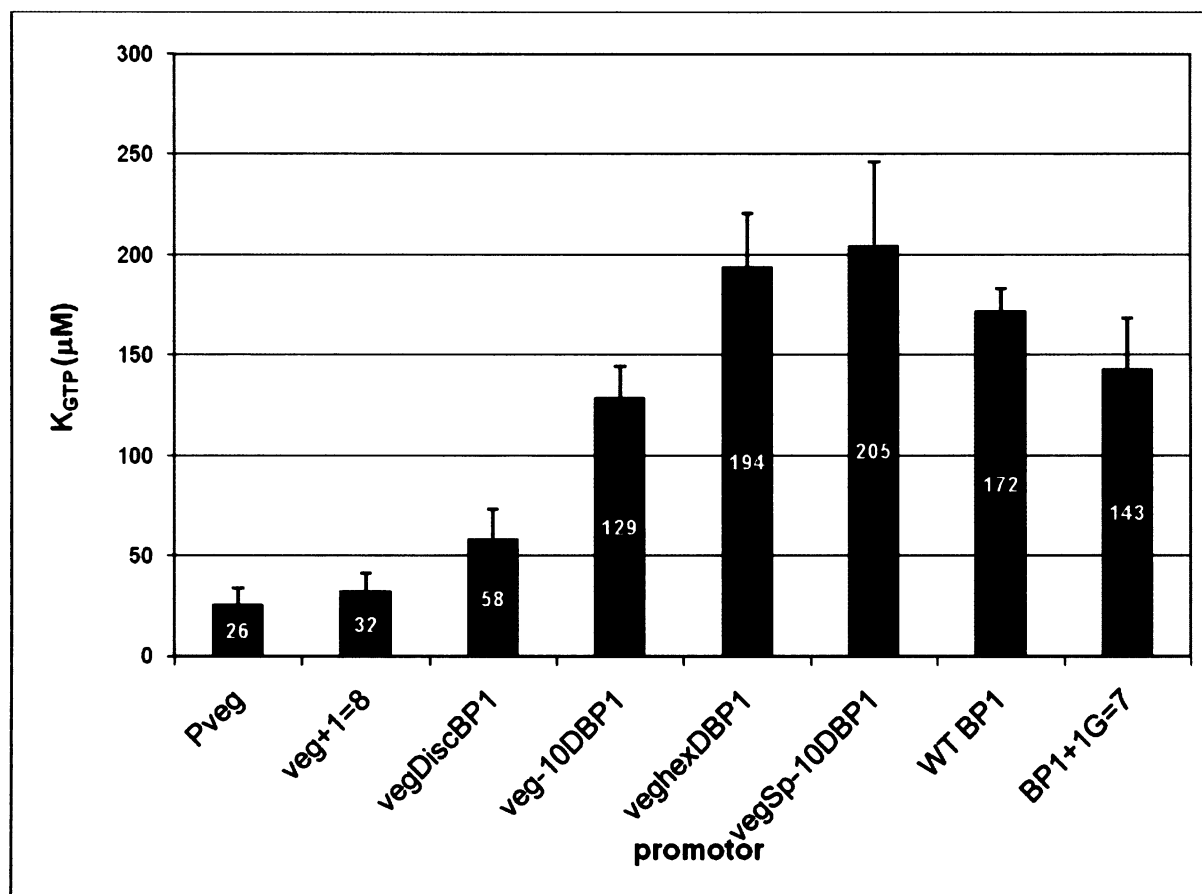
obr. 41: Závislost rychlosti iniciace transkripce na [iNTP]. Graf znázorňuje vyhodnocení primárních dat. Modrou šipkou je vyznačena 50 % rychlost iniciace transkripce, zelenou šipkou K_{GTP} BP1 + RNAP *B. subtilis*, červenou šipkou K_{GTP} Pveg + RNAP *B. subtilis*.

19.2. K_{GTP} testovaných promotorů I

Byly provedeny transkripční reakce při různých koncentracích iGTP pro získání K_{GTP} jednotlivých promotorů. Všechna měření proběhla nejméně třikrát. K_{GTP} z jednotlivých experimentů byly zprůměrnovány a byla určena jejich směrodatná odchylka $\pm \sigma$ (Tabulka 4, obr. 42).

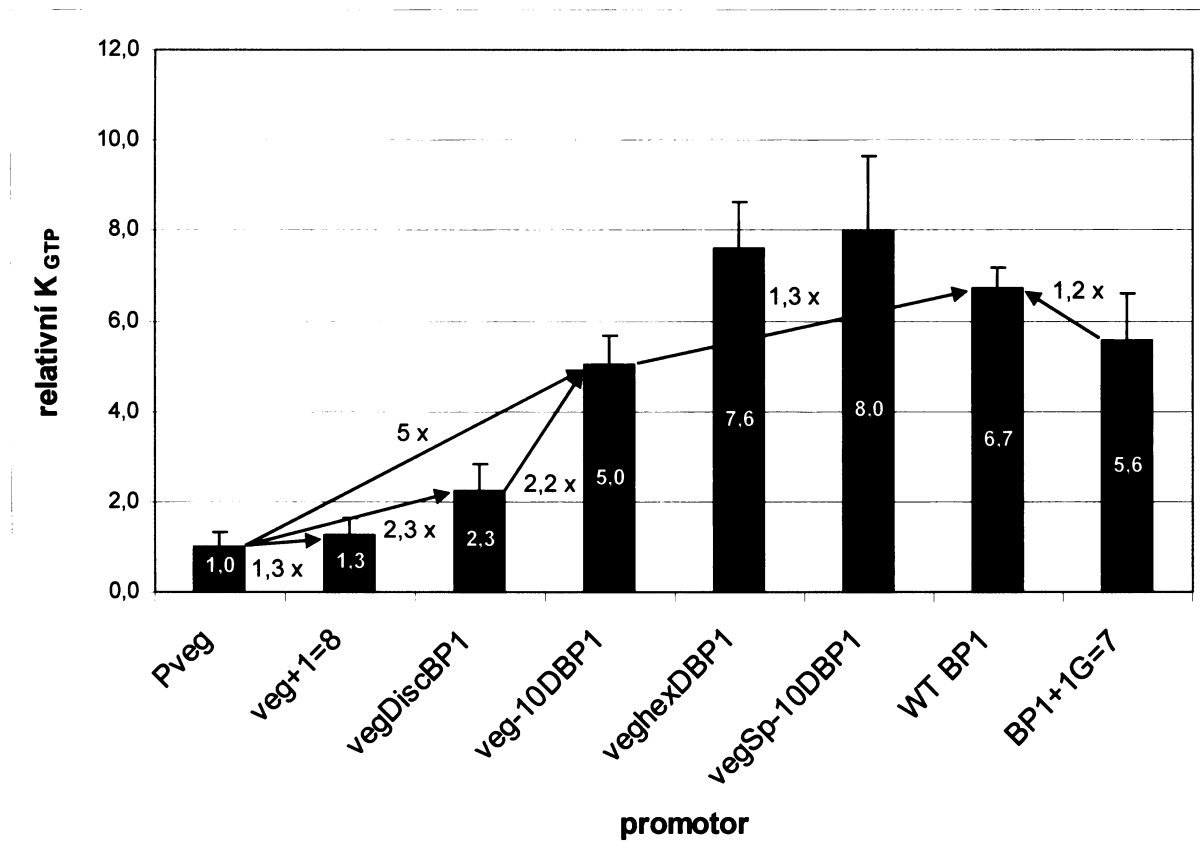
Tabulka 4: K_{GTP} jednotlivých promotorů I se směrodatnou odchylkou $\pm \sigma$.

promotor	K_{GTP} (μM)	$\pm \sigma$
WT Pveg+1=G	25,6	8,6
veg+1=8	32,4	9,0
vegDiscBP1	58,2	14,7
veg-10DBP1	129,0	15,5
veghexDBP1	194,4	26,3
vegSp-10DBP1	205,0	41,4
WT BP1	171,8	11,5
BP1+1G=7	143,1	25,2



obr. 42: K_{GTP} (μM) jednotlivých promotorů I měřená *in vitro*.

Dále bylo provedeno relativní srovnání jednotlivých K_{GTP} (obr. 43), kde K_{GTP} promotoru Pveg bylo definováno jako 1. Rozdíly mezi K_{GTP} vypovídají o rozdílném požadavku jednotlivých promotorů na [iNTP] pro maximální rychlost iniciace transkripce, tedy senzitivitu promotoru k [iNTP].



obr. 43: Relativní K_{GTP} jednotlivých promotorů I, kde K_{GTP} promotoru Pveg je definována jako 1. Červeně jsou vyznačeny relativní rozdíly mezi jednotlivými K_{GTP} .

Postupná přeměna Pveg v BP1 korelovala s postupným nárůstem K_{GTP} . Hledali jsme nejmenší změnu sekvence promotoru Pveg, která ho nejvíce přiblíží k promotoru BP1 v požadavku na [iNTP]. Takovým promotorem byl veg-10DBP1, jehož K_{GTP} (129,0 μ M) byla již srovnatelná s K_{GTP} (171,8 μ M) BP1 (obr. 42, str. 65). K_{GTP} promotoru veg-10DBP1 je 5 x vyšší než promotoru Pveg (obr. 43). Tyto výsledky naznačily, že pro senzitivitu k [iNTP] je důležitá 3' oblast promotoru, tedy úsek od -10 hexameru (včetně) k iniciačnímu nukleotidu.

Analýza výsledků ukázala, že relativně vysoká K_{GTP} promotoru veg-10DBP1 je dána několika faktory: (i) sekvencí a délkou diskriminátoru, (ii) sekvencí -10 hexameru.

(i) 2,3 x vyšší K_{GTP} promotoru vegDiscBP1 než promotoru Pveg, oproti jen 1,3 x vyšší K_{GTP} promotoru veg+1=8 (obr. 43), naznačila, že sekvence spíše než délka diskriminátoru napomáhá dosažení senzitivity k [iNTP]. Nevýrazný vliv délky diskriminátoru byl potvrzen i

u promotoru BP1+1G=7, kde se zkrácení diskriminátoru projevilo na poklesu K_{GTP} jen minimálně (obr. 43, str. 66).

(ii) Zdá se že sekvence -10 hexameru má na regulaci také vliv, což je patrné z rozdílu K_{GTP} (2,2 x) mezi promotory vegDiscBP1 a veg-10DBP1 (obr 43, str. 66).

20. Testované promotory II

Těmito promotory (obr. 44, str. 68) jsme chtěli ověřit zda, (i) 3' oblast je důležitá pro senzitivitu k [iNTP] i u jiného promotoru než BP1 a (ii) jak vybrané prvky 3' oblasti (-10 hexamer v kontextu délky diskriminátoru) přispívají k senzitivě promotoru k [iNTP].

(i) WT $Pilv+1=7,8GG$ (*Pilv*) vychází z *in vivo* regulovaného promotoru pro syntézu AMK, který je *in vitro* senzitivní k [iNTP] [42]. Pveg-10DPilv má 3' oblast z *Pilv* a zbytek promotoru z *Pveg*. Předpokladem bylo že Pveg-10DPilv se bude v senzitivě k [iNTP] podobat *Pilv*.

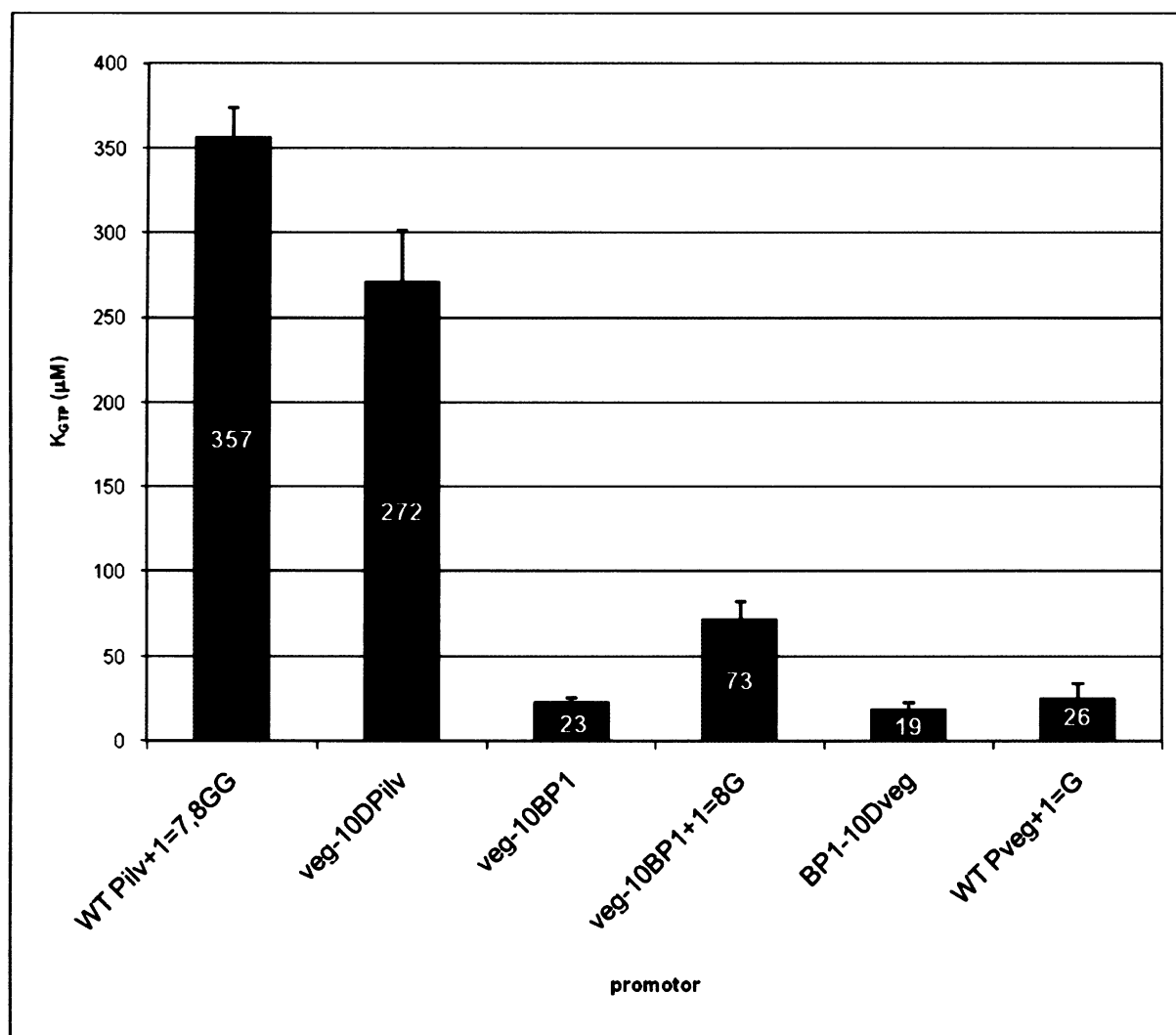
Dalším krokem pro ověření hypotézy důležitosti 3' oblasti bylo navržení promotoru BP1-10Dveg, který obsahuje 3' oblast z promotoru *Pveg* a zbytek promotoru z BP1. Předpokladem bylo, že u promotoru BP1-10Dveg nedojde k výraznému nárůstu požadavku na [iNTP] oproti *Pveg*.

(ii) Pro určení vlivu sekvence -10 hexameru byly vytvořeny konstrukty veg-10BP1 a veg-10BP1+1=8G. Oba mají -10 hexamer z regulovaného BP1, zbytek promotoru z *Pveg* a diskriminátor dlouhý buď 7 nebo 8 párů bází. Tyto promotorové konstrukty byly navrženy tak, aby ukázaly, zda sekvence -10 hexameru ovlivňuje senzitivitu k [iNTP] samostatně nebo v kontextu s délkou diskriminátoru.

Testované promotory II pro transkripci *in vitro*:

Označení promotorů

9. **WT $Pilv+1=7,8GG$** (*Pilv*) je promotor operonu pro syntézu AMK, se změněnými iniciačními nukleotidy z původních AA na GG, aby byl iniciační nukleotid všech promotorů shodný (záměna AA na GG nemá na senzitivitu k [iNTP] vliv [40])
10. **veg-10DPilv** je promotor *Pveg* s -10 hexamerem a diskriminátorem z promotoru *Pilv*
11. **veg-10BP1** je promotor *Pveg* s -10 hexamerem z promotoru *rrnB P1*
12. **veg-10BP1+1=8G** je promotor *Pveg* s -10 hexamerem z promotoru *rrnB P1* a na 3' konci prodlouženým diskriminátorem o jedno C
13. **BP1-10Dveg** je promotor *rrnB P1* s -10 hexamerem a diskriminátorem promotoru *Pveg*
7. **WT BP1 (BP1)** je promotor *rrnB P1*



obr. 45: K_{GTP} (μM) jednotlivých promotorů II a vybraných promotorů I měřená *in vitro*.

Promotor *Pilv* měl vysoký požadavek na [iNTP] v souladu s publikovanými výsledky [42]. Vnesení jeho 3'oblasti do *Pveg* se projevilo vysokým požadavkem *Pveg*-10D*Pilv* na [iNTP]. 3'oblast *Pilv* změnila *Pveg* na promotor senzitivní vůči [iNTP]. K_{GTP} (272 μM) hybridního promotoru veg-10D*Pilv* nedosáhla úplně K_{GTP} (357 μM) *Pilv*, podobně jako tomu bylo v případě veg-10DBP1 a BP1.

K_{GTP} (19,4 μM) promotoru BP1-10Dveg byla v podstatě stejně nízká jako K_{GTP} promotoru *Pveg*. BP1-10Dveg nebyl senzitivní k [iNTP]. To ukázalo že 5' oblast promotoru není důležitá pro senzitivitu k [iNTP].

Promotor veg-10BP1 měl K_{GTP} také stejně nízkou jako *Pveg*, což naznačilo že samotná sekvence -10 hexameru není schopna podmínit senzitivitu k [iNTP]. Promotor veg-10BP1+1=8G měl K_{GTP} 2,8 x vyšší než *Pveg*, to naznačilo, že sekvence -10 hexameru podmiňuje senzitivitu v kontextu s délkou diskriminátoru. Promotor veg-10BP1+1=8G však nedosahoval chování BP1.

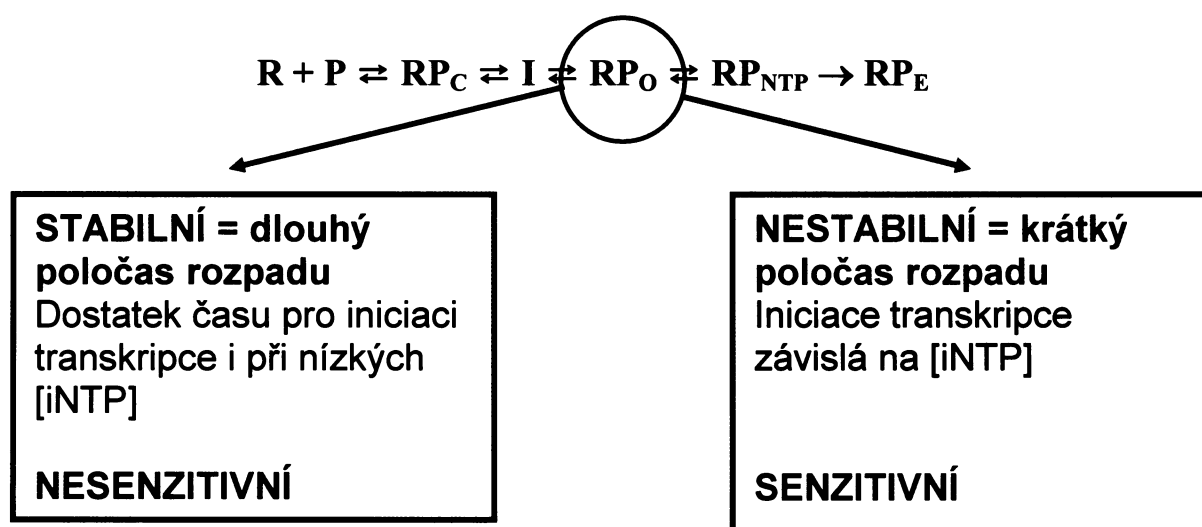
21. $t_{1/2}$ komplexů promotorů I a II a RNAP

Mechanismus regulace pomocí koncentrace $iNTP$ není u *B. subtilis* jasný. Naší hypotézou bylo, že senzitivita rychlosti iniciace transkripce ke koncentraci $iNTP$ je dána stabilitou komplexu (nejspíše RP_O) daného promotoru a RNAP (obr. 46). Analogicky, jako je tomu u *E. coli* [33].

Tedy pokud promotor tvoří s RNAP nestabilní RP_O s krátkým poločasem rozpadu, má $iNTP$ jen krátký čas na to, aby vstoupil do vytvořené transkripční bubliny. Rychlost iniciace transkripce je v tomto případě ovlivněna koncentrací $iNTP$, protože koncentrace $iNTP$ určuje zda bude $iNTP$ schopen proniknout do transkripční bubliny a zda RNAP bude schopna začít transkripci. Pro maximální rychlost iniciace transkripce je v tomto případě potřeba vysoká koncentrace $iNTP$ čemuž odpovídá vysoká K_{GTP} daného promotoru.

Pokud promotor tvoří s RNAP stabilní RP_O s dlouhým poločasem rozpadu, má $iNTP$ dostatek času na to, aby vstoupil do vytvořené transkripční bubliny i při jeho nízké koncentraci. V tomto případě nemůže být rychlost iniciace transkripce $[iNTP]$ ovlivněna.

Bylo tedy otázkou, zda stabilita RP_O koreluje s hodnotami K_{GTP} jednotlivých promotorů.



obr. 46: Mechanismus regulace iniciace transkripce pomocí $[iNTP]$ - hypotéza.

hypotéza

$t_{1/2}$ komplexů promotorů I a II a RNAP byly měřeny v přítomnosti 2 typů kompetitorů (i) heparinu nebo (ii) dsDNA (kap. 15.2. a 15.3.). Obě metody byly původně vyvinuty pro transkripční systém *in vitro* z *E. coli* [43].

(i) Při použití heparinu se měří stabilita RP_O (RP_C je okamžitě disociován působením heparinu). Nevýhodou této metody je, že heparin může atakovat i RP_O a tudíž výsledky jsou

spíše kvalitativní povahy. Množství produktu transkripční reakce v tomto případě odpovídá množství RP_0 v daném čase.

(ii) Při použití dsDNA se monitoruje souhrnný rozpad otevřených a uzavřených komplexů (nebo i dalších intermediátů) promotoru a RNAP. Uzavřený komplex se v tomto případě může rozpadat na volnou RNAP a promotor, nebo přecházet na RP_0 . Takto vzniklý RP_0 dává další produkty transkripční reakce a ovlivňuje výsledný $t_{1/2}$. Výhodou této metody je, že dsDNA neovlivňuje stabilitu žádného komplexu.

Kombinace těchto 2 metod umožnila porovnání korelace stability komplexů promotor-RNAP s K_{GTP} .

21.1. $t_{1/2}$ RP_0 promotorů BP1 a Pveg s RNAP z *B. subtilis* a *E. coli*

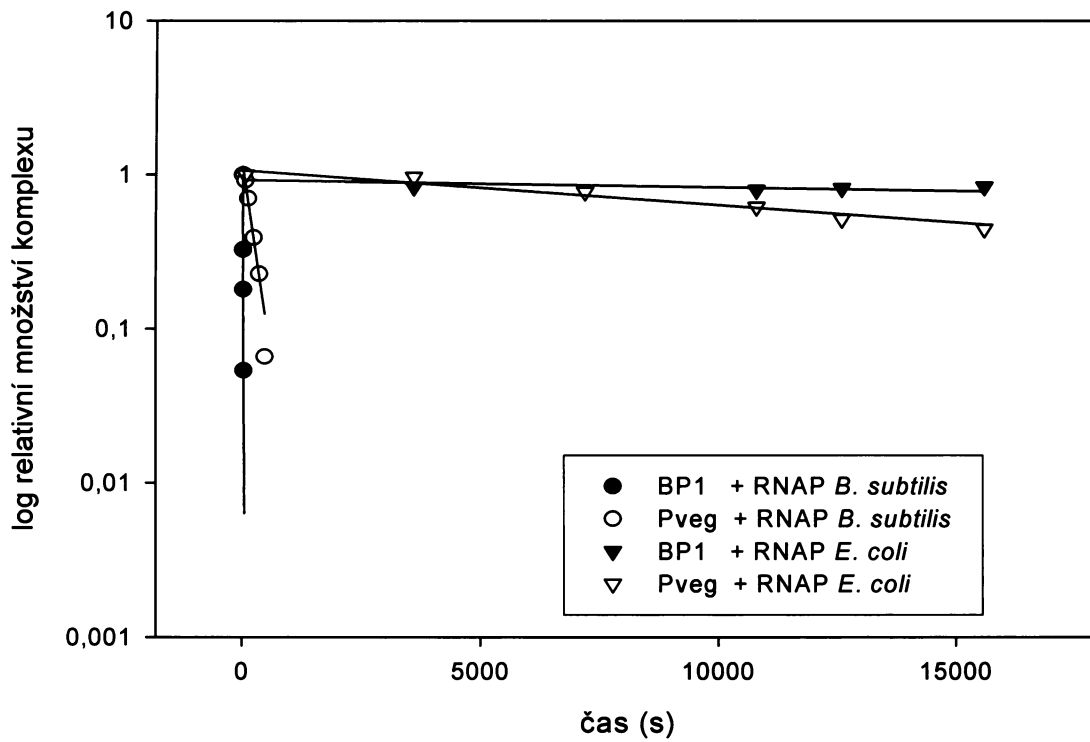
Nejprve byly provedeny experimenty s promotory BP1 a Pveg a RNAP z *B. subtilis* a *E. coli* za použití heparinu. Na první pohled jsou vidět rozdíly v chování komplexů RNAP z *B. subtilis* a *E. coli*. Komplexy RNAP z *E. coli* s promotory z *B. subtilis* jsou mnohonásobně stabilnější než komplexy tvořené RNAP z *B. subtilis* s promotory z *B. subtilis* (obr. 47, obr. 48, str. 71).

Je vidět i rozdíl ve stabilitě komplexů mezi promotory BP1 a Pveg a RNAP z *B. Subtilis*. Promotor BP1 senzitivní k [iNTP] tvoří relativně nestabilní komplexy, oproti tomu nesenzitivní Pveg tvoří relativně stabilní komplexy (obr. 47, obr. 49 str. 72)

RNAP	PROMOTOR <i>B. subtilis</i>	$t_{1/2}$ (s)	čas (různé časové škály) →
<i>B. subtilis</i>	BP1	26	
<i>B. subtilis</i>	Pveg	343	
<i>E. coli</i>	BP1	61464	
<i>E. coli</i>	Pveg	14687	

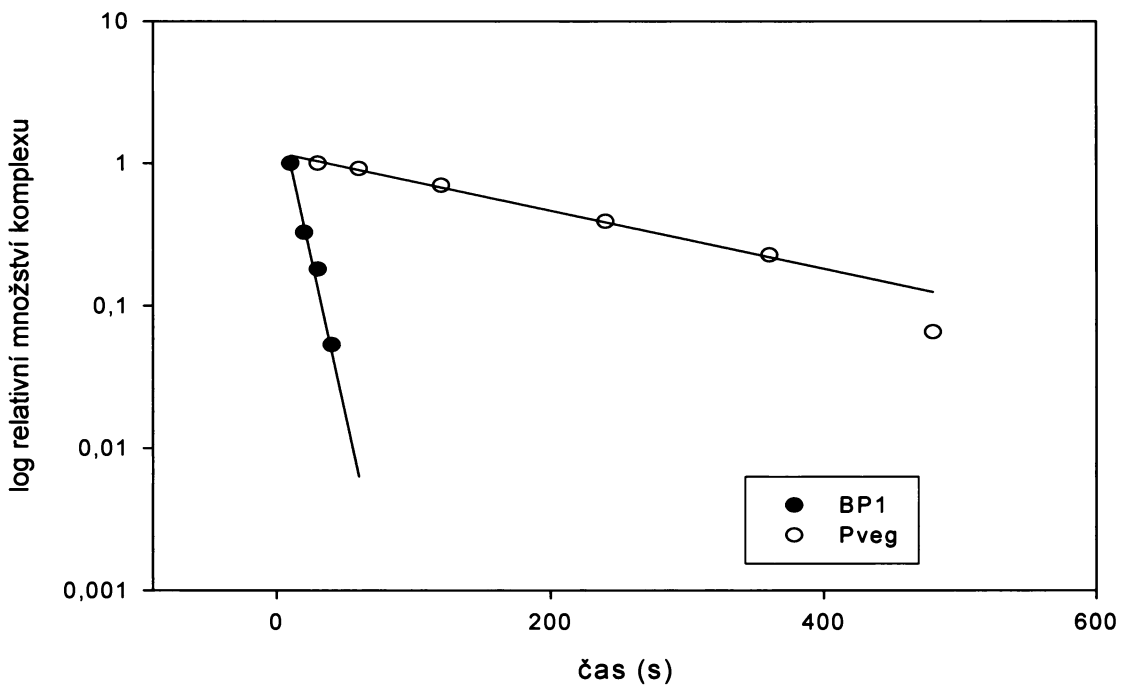
obr. 47: Poločas rozpadu $t_{1/2}$ (s) RP_0 promotorů BP1 a Pveg a RNAP z *B. subtilis* a *E. coli* za použití heparinu. V řádce vždy použítá RNAP, promotor a $t_{1/2}$. Primární data experimentu - elektroforeogram radioaktivně značených produktů transkripce *in vitro*.

čas ?



obr. 48: Poločas rozpadu $t_{1/2}$ (s) RP_O promotorů BP1 a Pveg a RNAP z *B. subtilis* a *E. coli* za použití heparinu.

f 1)



obr. 49: Poločas rozpadu $t_{1/2}$ (s) RP_O promotorů BP1 a Pveg a RNAP z *B. subtilis* za použití heparinu.

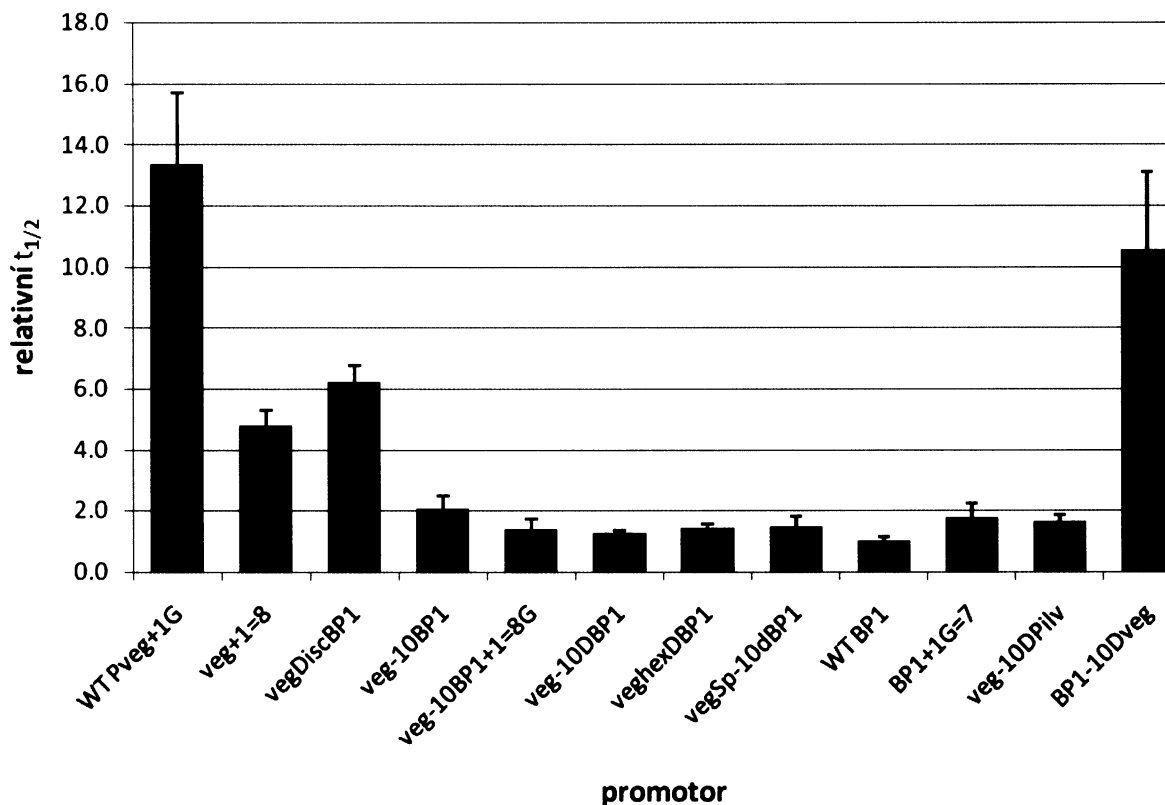
f 1)

21.2. $t_{1/2}$ RP_O promotorů I a II a RNAP z *B. subtilis*

Všechna měření rozpadů RP_O proběhla nejméně třikrát. $t_{1/2}$ za použití heparinu byly zprůměrnovány a byla určena jejich směrodatná odchylka $\pm \sigma$ (Tabulka 6, obr. 50).

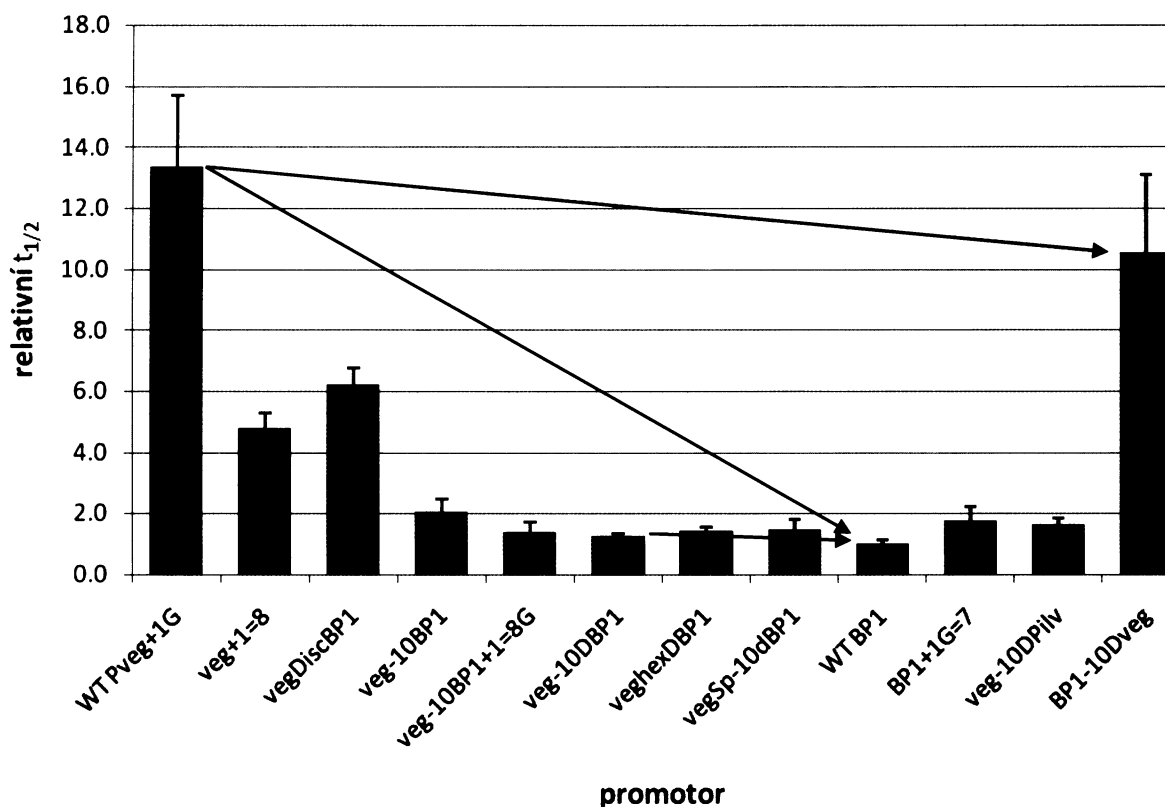
Tabulka 6: Poločas rozpadu $t_{1/2}$ (s) RP_O promotorů I a II za použití heparinu se směrodatnou odchylkou $\pm \sigma$.

promotor	$t_{1/2}$ (s)	$\pm \sigma$
WT Pveg+1=G	342,7	60,4
veg+1=8	122,5	13,5
vegDiscBP1	159,4	14,3
veg-10BP1	53,2	10,2
veg-10BP1+1=8G	35,2	8,6
veg-10DBP1	32,1	2,0
veghexDBP1	36,7	3,6
vegSp-10DBP1	37,5	8,4
WT BP1	25,7	3,8
BP1+1G=7	45,7	11,5
veg-10DPilv	41,8	5,2
BP1-10Dveg	269,9	66,7



obr. 50: Grafické znázornění poločasu rozpadu $t_{1/2}$ (s) RP_O promotorů I a II za použití heparinu.

Dále bylo provedeno relativní porovnání jednotlivých $t_{1/2}$ (obr. 51), kde $t_{1/2}$ promotoru WT BP1 byl definován jako 1.



obr. 51: Relativní srovnání $t_{1/2}$ RP_O promotorů I a II za použití heparinu.

Promotory s vysokou K_{GTP} měly krátké $t_{1/2}$ RP_O a naopak promotory s nízkou K_{GTP} měly dlouhé $t_{1/2}$. $t_{1/2}$ (26 s) promotoru BP1 byl 13,3 x kratší než $t_{1/2}$ (343 s) promotoru Pveg. Tyto výsledky potvrdily hypotézu, že senzitivitu k [iNTP] ovlivňuje stabilita RP_O tvořeného promotorem a RNAP z *B. subtilis*.

Dále bylo potvrzeno, že 3' oblast promotoru výrazně ovlivňuje stabilitu RP_O a tím senzitivitu promotoru k [iNTP]. $t_{1/2}$ (32 s) promotoru veg-10DBP1 je v podstatě totožný s $t_{1/2}$ (26 s) WT BP1, což potvrzuje důležitost 3' oblasti. $t_{1/2}$ promotoru Pilv nebyl měřitelný, protože jeho rozpad je příliš rychlý, potvrzení důležitosti 3' oblasti však poskytuje $t_{1/2}$ (42 s) promotoru veg-10Dpilv, který je také velmi krátký.

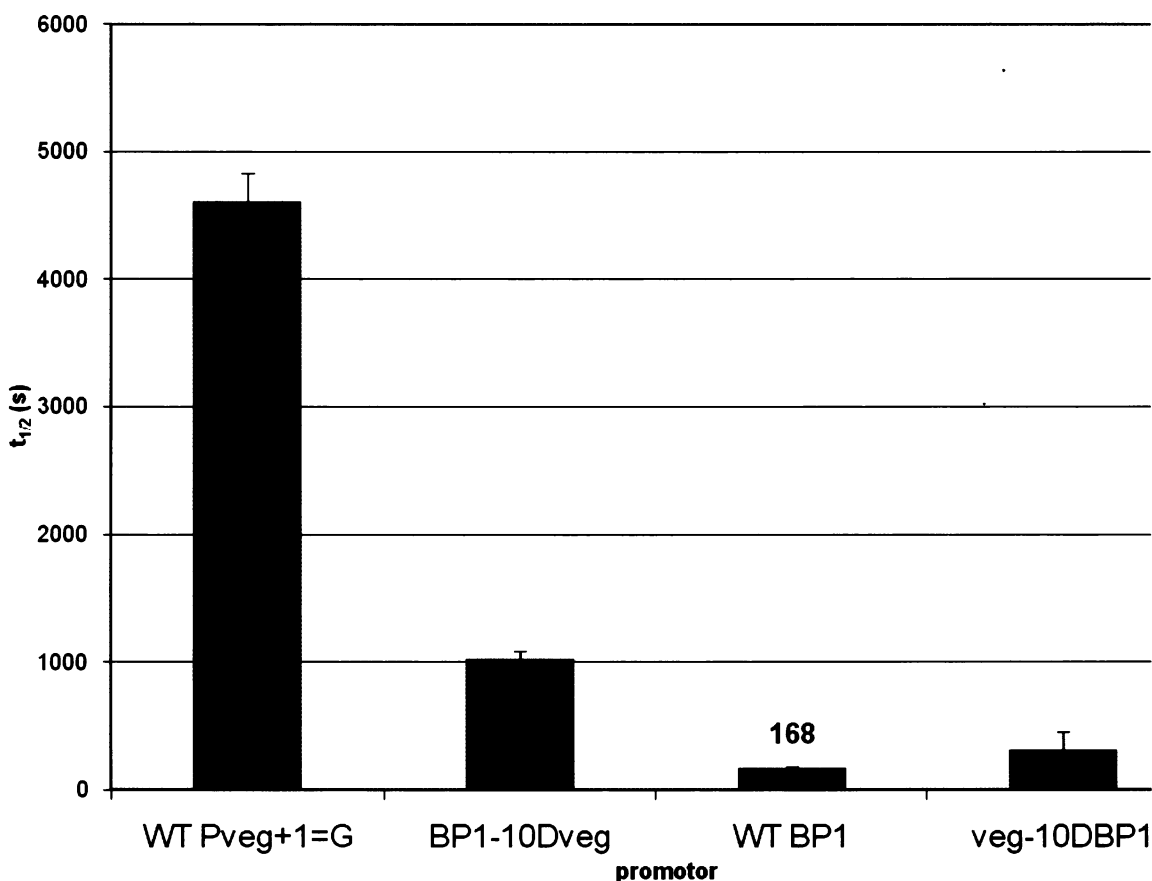
Ukázalo se, že 5' oblast ovlivňuje $t_{1/2}$ velmi málo, což je patrné z podobně relativně dlouhého $t_{1/2}$ promotoru BP1-10Dveg (270 s) jako $t_{1/2}$ promotoru Pveg (343 s).

21.3. Rozpad komplexů promotorů a RNAP z *B. subtilis* za přítomnosti dsDNA

Všechna měření rozpadů komplexů promotorů a RNAP z *B. subtilis* za přítomnosti dsDNA proběhla nejméně dvakrát. $t_{1/2}$ za použití dsDNA byly měřeny jen u 4 promotorů (Tabulka 7, obr. 52). Výsledky byly kvalitativně srovnatelné s výsledky obdrženy mi heparinovou metodou.

Tabulka 7: Poločas rozpadu $t_{1/2}$ komplexů vybraných promotorů za použití dsDNA se směrodatnou odchylkou $\pm \sigma$

promotor	$t_{1/2}$ (s)	$\pm \sigma$
WT Pveg+1=G	4615,6	214,4
BP1-10Dveg	1029,3	56,7
WT BP1	167,8	12,6
veg-10DBP1	309,4	144,6



obr. 52: Grafické znázornění poločasu rozpadu $t_{1/2}$ komplexů vybraných promotorů za použití dsDNA.

Obecný trend krátkého $t_{1/2}$ senzitivních promotorů a dlouhého $t_{1/2}$ nesenzitivních je patrný i při použití dsDNA jako kompetitoru. U těchto experimentů se ovšem projevuje i stabilita dalších komplexů (nejspíše RP_C) mezi promotorem a RNAP, které mohou přecházet do

ch

RP_O , a ovlivňovat tak množství produktu tvořeného transkripční reakcí, a tak i výsledný $t_{1/2}$. To je nejvíce patrné na promotorech WT Pveg+1=G a BP1-10Dveg, které mají K_{GTP} a $t_{1/2}$ RP_O v podstatě shodné, ale liší se $t_{1/2}$ určeném pomocí dsDNA jako kompetitoru.

Diskuze

22. Porovnání transkripce s RNAP z *B. subtilis* a *E. coli in vitro*

Bylo porovnáno chování promotorů BP1 a Pveg z *B. subtilis* s RNA polymerázami z *B. subtilis* a *E. coli*. Experimenty byly provedeny *in vitro*. Rozdíly mezi K_{GTP} (obr. 40, str. 65) promotorů BP1 a Pveg s RNAP z *B. subtilis* a *E. coli* jasně ukázaly rozdíly mezi jejich chováním při iniciaci transkripce.

Přirozené rRNA promotory z *E. coli* jsou s RNAP z *E. coli* jsou *in vitro* senzitivní k [iNTP] [33]. RNAP z *E. coli* však není schopna v senzitivě k [iNTP] odlišit přirozeně regulovaný rRNA promotor BP1 od přirozeně neregulovaného konstitutivního promotoru Pveg. Oba se v těchto podmínkách chovají nesenzitivně.

Naopak RNAP z *B. subtilis* tyto dva promotory v senzitivě k [iNTP] odlišuje. BP1 má vysokou K_{GTP} a je senzitivní k [iNTP], naopak Pveg má nízkou K_{GTP} a senzitivní není (obr. 40, str. 64).

23. DNA elementy ovlivňující K_{GTP} u *B. subtilis in vitro*

Byla hledána část promotoru, která je odpovědná za jeho senzitivitu k [iNTP]. Z analýzy K_{GTP} promotorů I vyplynulo, že pro zajištění senzitivity k [iNTP] je důležitá 3' oblast jádra promotoru, nejvíce sekvence -10 hexameru a diskriminátoru. To ukazují podobně vysoké hodnoty K_{GTP} promotoru BP1 a veg-10DBP1 (obr. 43, str. 66). Důležitost 3' oblasti byla potvrzena i promotory z druhé série, kde bylo u podobné dvojice (*Pilv* a veg-10DPilv) nalezeno obdobné chování (obr. 45, str. 69).

Naopak 5' oblast promotoru se jeví jako nedůležitá pro zajištění senzitivity k [iNTP], což ukazuje nízká hodnota K_{GTP} promotoru BP1-10Dveg (obr. 45, str. 69).

Podrobnějším zkoumáním 3' oblasti, byly určeny další prvky této oblasti ovlivňující senzitivitu k [iNTP]. Bylo ukázáno, že samostatné prodloužení diskriminátoru z 7 na 8 párů bází mělo na senzitivitu jen malý vliv. Dále, že prodloužení diskriminátoru se projevilo na senzitivě až v kontextu se změnou sekvence -10 hexameru (obr. 45, str. 69). Konečně, že i samotná sekvence diskriminátoru také senzitivitu ovlivňuje (obr. 43, str. 66). Je tedy patrné že efekty jednotlivých prvků sekvence 3' oblasti působí provázaně.

24. Porovnání $t_{1/2}$ RP_O promotorů s RNAP z *B. subtilis* a *E. coli*

Rozdíly mezi $t_{1/2}$ (obr. 47, str. 71) promotorů BP1 a Pveg s RNAP z *B. subtilis* a *E. coli* dokreslují rozdíly mezi jejich chováním při iniciaci transkripce.

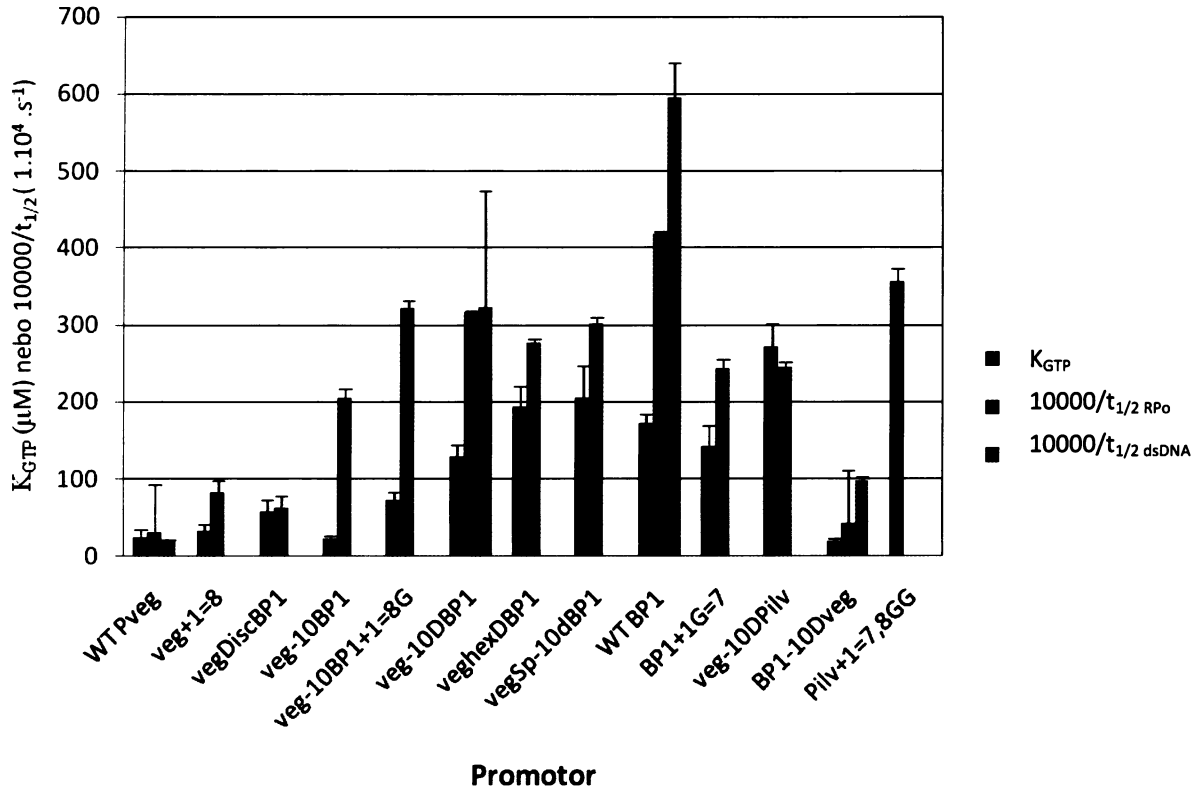
Promotor BP1 i Pveg tvoří s RNAP z *E. coli* velmi stabilní RP_O . To neodpovídá obecnému chování rRNA promotorů, které se od ostatních promotorů odlišují právě tím, že mají RP_O spíše nestabilní.

Naopak při použití RNAP z *B. subtilis* jsou promotory BP1 a Pveg zřetelně odlišeny. Promotor BP1 tvoří s RNAP z *B. subtilis* relativně nestabilní RP_O a promotor Pveg relativně stabilní.

To společně s rozdíly v K_{GTP} odpovídá různým vzájemným interakcím promotorů a RNAP z obou organismů při iniciaci transkripce, a jiným požadavkům obou polymeráz na sekvence promotorů pro dosažení senzitivity k [iNTP].

24. Mechanismus senzitivity promotorů k [iNTP] u *B. subtilis*

Obecně lze říci, že K_{GTP} koreluje s reciprokou hodnotou $t_{1/2}$ RP_O , respektive i s reciprokou hodnotou $t_{1/2}$ určenou pomocí dsDNA (obr. 53, str. 79). To naznačuje, že tyto parametry jsou na sobě závislé a že popisují stejný děj při iniciaci transkripce. Je ale nutné říci, že tato korelace má své výjimky (např. veg-10BP1), jejichž vysvětlení zůstává nezodpovězené.



obr. 53: Korelace K_{GTP} (μM) a reciproké hodnoty $t_{1/2} RP_O$ ($10000/t_{1/2} RP_O$ ($1.10^4 s^{-1}$)) a $t_{1/2}$ za požití dsDNA ($(10000/t_{1/2} dsDNA$ ($1.10^4 s^{-1}$)).

Provázanost K_{GTP} a $t_{1/2}$ promotoru potvrdila správnost námi navrženého principu regulace iniciace transkripce pomocí [iNTP] u *B. subtilis in vitro* (kap. 21, obr. 46, str. 70). Senzitivita rychlosti iniciace transkripce k [iNTP] je dána stabilitou otevřeného komplexu daného promotoru a RNAP. Iniciace transkripce je senzitivní k [iNTP], pokud je RP_O promotoru nestabilní a naopak.

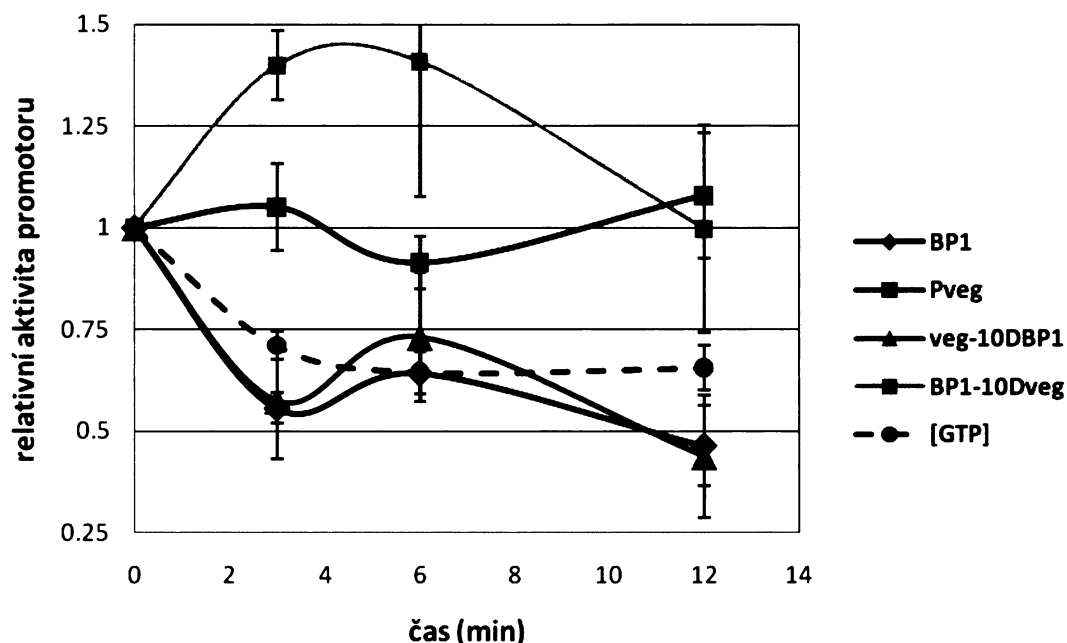
Analogicky, jako tomu je u *E. coli*, 3' oblast nejspíše interaguje s podjednotkou σ^A a jejich vzájemné interakce ovlivňují stabilitu RP_O , a tedy i stabilitu vytvořené transkripční bubliny. To potvrzuje změna $t_{1/2} RP_O$ mezi promotory Pveg a veg-10DBP1 a veg-10DPilv, kde změna 3' oblasti destabilizuje RP_O .

Naopak změna promotoru Pveg na BP1-10Dveg, kde se mění 5' oblast promotoru, stabilitu RP_O neovlivňuje.

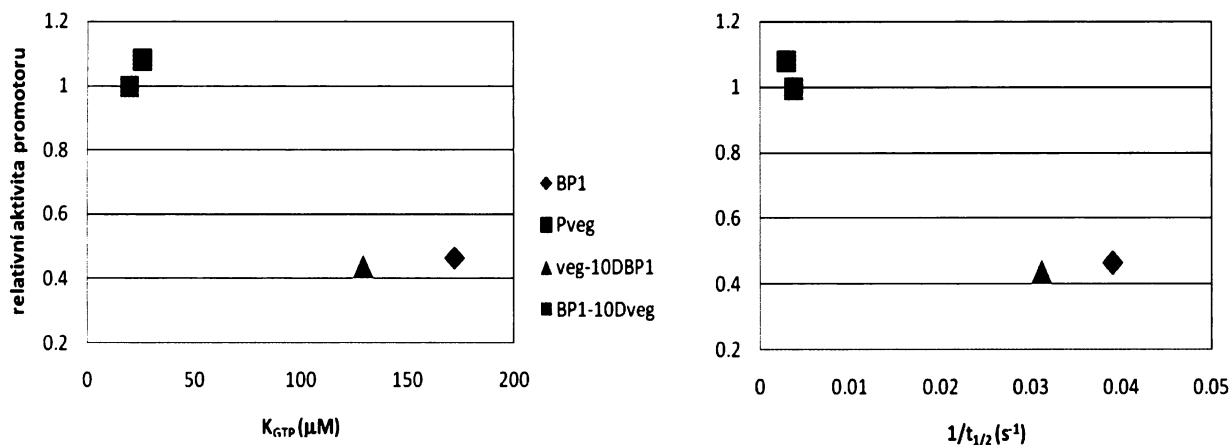
Je ale nutné říci že interakce 3' oblasti promotoru a podjednotky σ^A nejspíše nejsou u RNAP z *B. subtilis* a *E. coli* shodné. To je nejspíše dáno odlišnostmi v RNAP z obou organismů.

25. Srovnání chování promotorů *in vitro* a *in vivo*.

Obr. 54 ukazuje reakce aktivit vybraných promotorů na pokles [iGTP] *in vivo* (experimenty provedl Mgr. Luděk Sojka). Reakce na pokles [iGTP] *in vivo* promotorů BP1 a Pveg byly srovnány s jejich hodnotami K_{GTP} a $1/t_{1/2}$ (obr. 55). Ukázalo se, že hodnota K_{GTP} i $t_{1/2}$ RP_O promotoru vypovídá o jejich schopnosti být *in vivo* regulovaný pomocí [iNTP].



obr. 54: Reakce aktivity promotorů na pokles [GTP] v buňce. Černá čárkovaná křivka: pokles hladiny GTP v buňkách *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu po přidání decoyininu do media. Decoyinin inhibuje tvorbu GTP, po jeho přidání do média [GTP] v buňkách klesá. Reakce aktivity promotorů: BP1 modře, Pveg červeně, veg-10DBP1 zeleně a BP1-10Dveg žlutě. Experimenty provedl Mgr. Luděk Sojka.



obr. 55: Závislost aktivity promotoru při poklesu [GTP] v buňce na K_{GTP} a $1/t_{1/2}$ RP_O. Hodnota aktivit promotorů byla brána v čase 12 min. po inhibici tvorby GTP *in vivo* (viz obr. 54).

Promotor BP1 negativně reagoval na pokles [GTP] v buňce, je tedy regulovaný pomocí [iNTP] *in vivo*, což koreluje s vysokou K_{GTP} a krátkým $t_{1/2}$ RP_O. Naopak promotor

P_{veg} na pokles [GTP] nereagoval, není tedy regulovaný, což koreluje s nízkou K_{GTP} a dlouhým $t_{1/2}$ RP_O .

In vivo experimenty s uměle vytvořeným promotorem veg-10DBP1 potvrdily domněnku, že 3' oblast promotoru ovlivňující jeho K_{GTP} i $t_{1/2}$ ovlivňuje i jeho regulaci pomocí [iNTP] *in vivo* (obr. 55, str. 80). Promotor veg-10DBP1 *in vivo* negativně reagoval na změnu [iGTP] podobně jako BP1 (obr. 54, str. 80). Naopak *in vivo* experimenty s promotorem BP1-10DBP1 (obr. 54), který na pokles [iGTP] nereagoval poklesem promotorové aktivity, potvrdily že 5' oblast promotoru nemá na regulaci pomocí [iNTP] vliv.

Podle korelace aktivit měřených promotorů při poklesu [GTP] v buňce s jejich K_{GTP} a $1/t_{1/2}$ RP_O jsme vyvodili dva závěry:

- (i) Regulace promotorů pomocí [iNTP] je závislá na sekvenci promotoru v 3' oblasti.
- (ii) Mechanismus regulace promotorů pomocí [iNTP] je nespíše podmíněn stabilitou jejich RP_O . Promotory, které tvoří nestabilní RP_O , jsou *in vivo* regulované pomocí [iNTP].

Závěr

Bylo vytvořeno 13 promotorových konstruktů. U všech byl určen jejich požadavek na koncentraci iGTP pro 50 % maximální rychlosti iniciace transkripce *in vitro* charakterizovaný konstantou K_{GTP} . Na základě hodnot K_{GTP} jednotlivých promotorů byla identifikována 3' oblast promotoru (úsek od -10 hexameru k transkripčnímu startu), jako zodpovědná za senzitivitu promotorů k [iNTP].

Na základě měření stability komplexů promotorů a RNAP a jejich následném srovnáním s K_{GTP} byl navržen mechanismus senzitivity k [iNTP], kdy relativně nestabilní otevřený komplex promotoru s RNAP umožňuje promotoru být senzitivní k [iNTP].

Konečně na základě srovnáním výsledků získaných *in vitro* a reakcí promotorů na změny koncentrace iGTP v buňce bylo ověřeno, že 3' oblast promotoru ovlivňuje i aktivitu promotorů i *in vivo* a že navržený princip mechanismu senzitivity promotorů k [iNTP] *in vitro* pravděpodobně platí i pro regulaci pomocí [iNTP] *in vivo*.

Celkově práce přispěla k pochopení mechanismu regulace iniciace transkripce pomocí [iNTP] u *B. subtilis*. Výsledky ale přinesly další otázky v tomto klíčovém ději regulace buňky. (i) Které jednotlivé báze v oblasti promotoru podmiňují senzitivitu k [iNTP]? (ii) Jaké jsou přesné interakce mezi DNA a RNAP při iniciaci transkripce?

Dalším směrem výzkumu by mohlo být hledání promotorů, které jsou u *B. subtilis* přirozeně nesenzitivní k [iNTP] a mají stabilní RP_0 . Zdá se, že oproti *E. coli*, kde je většina promotorů právě takových, jsou tyto promotory u *B. subtilis* minoritní. Jejich identifikace by mohla přispět k pochopení mechanismu regulace promotorů v tomto organismu.

Seznam literatury

- [1] M. Nomura, R. Gourse and G. Baughman, Regulation of the Synthesis of Ribosomes and Ribosomal Components, *Annual Review of Biochemistry*, 53 (1984) 75-117.
- [2] D. A. Schneider, W. Ross and R. L. Gourse, Control of rRNA expression in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Microbiol.*, 6 (2003) 151-156.
- [3] Peter Graumann, *Bacillus Cellular and Molecular Biology*, Caistar Academic Press, Norfolk (2007).
- [4] R. L. Gourse, H. A. de Boer and M. Nomura, DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination, *Cell*, 44 (1986) 197-205.
- [5] A.L.Sonenschein, *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: from Gens to Cells*, ASM Press, Washington, D.C., (2002)
- [6] J. J. Schwartz, A. Gazumyan and I. Schwartz, rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, *J. Bacteriol.*, 174 (1992) 3757-3765.
- [7] S. E. Aiyar, T. Gaal and R. L. Gourse, rRNA promoter activity in the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens*, *J. Bacteriol.*, 184 (2002) 1349-1358.
- [8] D. Evans, S. M. Marquez and N. R. Pace, RNase P: interface of the RNA and protein worlds, *Trends Biochem. Sci.*, 31 (2006) 333-341.
- [9] C. J. Green and B. S. Vold, A cluster of nine tRNA genes between ribosomal gene operons in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 174 (1992) 3147-3151.
- [10] E. D. Jarvis, R. L. Widom, G. LaFauci, Y. Setoguchi, I. R. Richter and R. Rudner, Chromosomal organization of rRNA operons in *Bacillus subtilis*, *Genetics*, 120 (1988) 625-635.
- [11] R. L. Widom, E. D. Jarvis, G. LaFauci and R. Rudner, Instability of rRNA operons in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 170 (1988) 605-610.
- [12] B. S. Vold, C. J. Green, N. Narasimhan, M. Strem and J. N. Hansen, Transcriptional analysis of *Bacillus subtilis* rRNA-tRNA operons. II. Unique properties of an operon containing a minor 5 S rRNA gene, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 14485-14490.
- [13] B. S. Vold, K. Okamoto, B. J. Murphy and C. J. Green, Transcriptional analysis of *Bacillus subtilis* rRNA-tRNA operons. I. The tRNA gene cluster of *rrnB* has an internal promoter, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 14480-14484.
- [14] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton and A. Danchin, The complete

- genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature*, 390 (1997) 249-256.
- [15] G. Zhang, E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst, Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution, *Cell*, 98 (1999) 811-824.
- [16] D. G. Vassylyev, S. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M. N. Vassylyeva, S. Borukhov and S. Yokoyama, Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution, *Nature*, 417 (2002) 712-719.
- [17] R. L. Gourse, W. Ross and T. Gaal, UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition, *Mol. Microbiol.*, 37 (2000) 687-695.
- [18] P. Ghosh, A. Ishihama and D. Chatterji, *Escherichia coli* RNA polymerase subunit omega and its N-terminal domain bind full-length beta' to facilitate incorporation into the alpha2beta subassembly, *Eur. J. Biochem.*, 268 (2001) 4621-4627.
- [19] C. E. Vrentas, T. Gaal, W. Ross, R. H. Ebricht and R. L. Gourse, Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA, *Genes Dev.*, 19 (2005) 2378-2387.
- [20] E. C. Achberger and H. R. Whiteley, The role of the delta peptide of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase in promoter selection, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 7424-7432.
- [21] I. J. MacDougall, P. J. Lewis and R. Griffith, Homology modelling of RNA polymerase and associated transcription factors from *Bacillus subtilis*, *J. Mol. Graph. Model.*, 23 (2005) 297-303.
- [22] A. Typas and R. Hengge, Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigma promoter selectivity in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, 59 (2006) 1037-1051.
- [23] J. D. Helmann and P. L. deHaseth, Protein-nucleic acid interactions during open complex formation investigated by systematic alteration of the protein and DNA binding partners, *Biochemistry*, 38 (1999) 5959-5967.
- [24] S. P. Haugen, W. Ross, M. Manrique and R. L. Gourse, Fine structure of the promoter-sigma region 1.2 interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (2008) 3292-3297.
- [25] C. A. Davis, C. A. Bingman, R. Landick, M. T. Record, Jr. and R. M. Saecker, Real-time footprinting of DNA in the first kinetically significant intermediate in open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (2007) 7833-7838.
- [26] B. J. Paul, M. B. Berkmen and R. L. Gourse, DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (2005) 7823-7828.

- [27] T. A. Steitz, S. J. Smerdon, J. Jager and C. M. Joyce, A Unified Polymerase Mechanism for Nonhomologous Dna and Rna-Polymerases, *Science*, 266 (1994) 2022-2025.
- [28] W. Ross, K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov and R. L. Gourse, A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase, *Science*, 262 (1993) 1407-1413.
- [29] S. E. Aiyar, S. M. McLeod, W. Ross, C. A. Hirvonen, M. S. Thomas, R. C. Johnson and R. L. Gourse, Architecture of Fis-activated transcription complexes at the *Escherichia coli* rrnB P1 and rrnE P1 promoters, *J. Mol. Biol.*, 316 (2002) 501-516.
- [30] W. Ross, A. Ernst and R. L. Gourse, Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove, *Genes Dev.*, 15 (2001) 491-506.
- [31] R. T. Dame, C. Wyman, R. Wurm, R. Wagner and N. Goosen, Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the rrnB P1, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 2146-2150.
- [32] H. D. Murray, D. A. Schneider and R. L. Gourse, Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant, *Mol. Cell*, 12 (2003) 125-134.
- [33] T. Gaal, M. S. Bartlett, W. Ross, C. L. Turnbough, Jr. and R. L. Gourse, Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria, *Science*, 278 (1997) 2092-2097.
- [34] C. E. Vrentas, T. Gaal, M. B. Berkmen, S. T. Rutherford, S. P. Haugen, W. Ross and R. L. Gourse, Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation, *J. Mol. Biol.*, 377 (2008) 551-564.
- [35] B. J. Paul, M. M. Barker, W. Ross, D. A. Schneider, C. Webb, J. W. Foster and R. L. Gourse, DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP, *Cell*, 118 (2004) 311-322.
- [36] O. Laptenko, J. Lee, I. Lomakin and S. Borukhov, Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase, *Embo Journal*, 22 (2003) 6322-6334.
- [37] S. P. Haugen, M. B. Berkmen, W. Ross, T. Gaal, C. Ward and R. L. Gourse, rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase, *Cell*, 125 (2006) 1069-1082.
- [38] L. Krásný and R. L. Gourse, An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation, *EMBO J.*, 23 (2004) 4473-4483.
- [39] J. M. Lopez and P. Fortnagel, Nitrofurantoin prompts the stringent response in *Bacillus subtilis*, *J. Gen. Microbiol.*, 126 (1981) 491-496.

- [40] Krásný, L., Tišerová, H., Jonák J., Rejman D. and Šanderová H. The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol.*, in press.
- [41] K. Kasai, T. Nishizawa, K. Takahashi, T. Hosaka, H. Aoki and K. Ochi, Physiological analysis of the stringent response elicited in an extreme thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, *J. Bacteriol.*, 188 (2006) 7111-7122.
- [42] J. A. Grandoni, S. B. Fulmer, V. Brizzio, S. A. Zahler and J. M. Calvo, Regions of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon involved in regulation by leucine, *J. Bacteriol.*, 175 (1993) 7581-7593.
- [43] R. L. Gourse, Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter in vitro, *Nucleic Acids Res.*, 16 (1988) 9789-9809.

