

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



**Podjednotka delta bakteriální RNA polymerázy a její role v regulaci genové
exprese u *Bacillus subtilis***

Lukáš Dvořáček

Praha, 2010

Vedoucí práce: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

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

Praha, 20. 8. 2010

Lukáš Dvořáček

Diplomová práce vznikala v letech 2006 – 2010 v rámci grantových projektů MŠMT 2B06065 a GAČR 204/09/0583.

Rád bych poděkoval Mgr. Liborovi Krásnému, Ph.D. a Mgr. Haně Šanderové, Ph.D. za trpělivé vedení diplomové práce a všem ostatním členům Laboratoře molekulární genetiky bakterií za všeobecnou podporu.

1. Abstrakt

Podjednotka delta bakteriální RNA polymerázy a její role v regulaci genové exprese u *Bacillus subtilis*.

V této práci se zabývám regulací genové exprese u eubakterií. V první části shrnuji současné poznatky o klíčové fázi genové exprese - transkripci, blíže se pak zaměřuji na regulaci iniciace transkripce pomocí malých efektorových molekul (guanosin tetrafosfát, iniciační nukleosid trifosfát) u genů pro ribozomální RNA. Ve druhé, experimentální části této práce se zabývám rolí relativně málo studované podjednotky RNA polymerázy z gram pozitivních bakterií - proteinu δ - při iniciaci transkripce a jejího vlivu na regulaci RNA polymerázy pomocí koncentrace iniciačního nukleosid trifosfátu.

Delta subunit of bacterial RNA pol and its role in regulation of gene expression in *B. subtilis*.

In this work I focus on regulation of eubacterial gene expression. First, I describe recent knowledge about a key stage of gene expression - transcription, focusing on regulation of transcription initiation via small effector molecules (guanosine tetraphosphate, initiating nucleoside triphosphate) that are important for the regulation of ribosomal RNA. Second, in the experimental part of my work, I focus on the role of the δ protein, a subunit of RNA polymerase in gram positive bacteria, in transcription initiation and its effects on regulation of RNA polymerase by the concentration of initiating nucleoside triphosphates.

Klíčová slova: genová exprese, transkripce, *Bacillus subtilis*, protein delta, ribozomální RNA, iniciační nukleosid trifosfát.

Keywords: gene expression, transcription, *Bacillus subtilis*, delta protein, ribosomal RNA, initiating nucleoside triphosphate.

Obsah

1. Abstrakt	4
2. Seznam zkratek	8
3. Úvod	9
4. Přehled literatury	10
4.1. Genová exprese.....	10
4.2. Regulace genové exprese	13
4.2.1. Regulace iniciace transkripce pomocí malých efektorových molekul	15
4.3. Ribozomy.....	19
4.4. Změny v intracelulárních koncentracích NTP	29
4.5. Podjednotka bakteriální RNAP - δ	32
5. Materiál a metody	35
5.1. Materiál	35
5.2. Seznam používaných bakteriálních kmenů a plazmidů	39
5.3. Metody	41
5.3.a. Ověření přítomnosti neobvyklých nukleotidů vázaných na protein δ u <i>B. subtilis</i>	41
5.3.1. Měření optické denzity (OD)	41
5.3.2. Elektroforetická analýza DNA	41
5.3.3. Štěpení plazmidu.....	43
5.3.4. Izolace DNA z gelu	43
5.3.5. Defosforylace plazmidu	44
5.3.6. Štěpení PCR produktu.....	45
5.3.7. Ligace.....	45
5.3.8. Transformace buněk <i>E. coli</i> DH5 α	46
5.3.9. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> DH5 α	46
5.3.10. Precipitace plazmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného	49
5.3.11. Analýza plazmidové DNA restrikčním štěpením.....	49

5.3.12. Sekvenační reakce	50
5.3.13. Glycerínová konzerva	51
5.3.14. Transformace <i>B. subtilis</i> MO1099.....	51
5.3.15. Izolace chromozomální DNA z <i>B. subtilis</i>	53
5.3.16. PCR chromozomální DNA	54
5.3.17. Nadprodukce proteinu δ	55
5.3.18. Izolace proteinu δ metodou afinitní chromatografie.....	55
5.3.19. Izolace proteinu δ metodou ionexu a izoelektrické precipitace.....	56
5.3.20. Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové	58
5.3.21. Dialýza – přečištění proteinového izolátu.....	58
5.3.22. Polyakrylamidová elektroforéza proteinů v prostředí SDS (SDS-PAGE).....	59
5.3.b. Vliv proteinu δ na regulace iniciace transkripce <i>rrnB</i> P1 pomocí [iNTP]	61
5.3.23. Zjištění intracelulární hladiny GTP	61
5.3.24. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	62
5.3.25. Zjišťování intracelulární aktivity promotoru <i>rrnB</i> P1.....	63
5.3.26. Příprava radioaktivně značeného primeru.....	64
5.3.27. Extrakce RNA fenolem a chloroformem.....	65
5.3.28. Primer extension.....	67
5.3.29. Polyakrylamidová elektroforéza cDNA.....	68
5.3.30. Rychlost syntézy celkové buněčné RNA.....	69
6. Cíle diplomové práce.....	70
7. Výsledky a diskuse.....	71
7.1. Ověření přítomnosti neobvyklých nukleotidů vázaných na protein δ u <i>B. subtilis</i>	72
7.1.a. Experimentální strategie 1:.....	72
7.1.1. Příprava proteinu δ s histidinovou kotvou	74
7.1.2 Příprava proteinu δ bez histidinové kotvy	77
7.1.2.a. Příprava vektoru pro expresi proteinu δ bez histidinové kotvy.....	77
7.1.3. Diskuse 1.....	81

7.2. Vliv proteinu δ na regulaci iniciace transkripce <i>rrnB</i> P1 pomocí [iNTP].....	83
7.2.a. Experimentální strategie 2:.....	84
7.2.1. Kolísání hladiny GTP během růstové křivky.....	85
7.2.2. Intracelulární hladina GTP při různých růstových rychlostech.....	86
7.2.3.1. Hladina transkriptu <i>rrnB</i> P1 při různých růstových rychlostech.....	88
7.2.3.2. Rozdíl v celkové syntéze RNA u mutantního kmene $\Delta rpoE$ a kmene wt <i>B. subtilis</i>	90
7.2.4. Diskuse 2.....	92
8. Souhrn	93
9. Seznam literatury.....	95

2. Seznam zkratek

AMK	aminokyselina
AP	ampicilin
ATP	adenosin-5'-trifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	počet párů bází
cNTP	cyklický nukleosid trifosfát
CTD	C - terminální doména
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dsDNA	dvouvláknová DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G+	gram pozitivní
G-	gram negativní
GTP	guanosin-5'-trifosfát
NK	nukleová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
NTP	nukleosid trifosfát
iGTP	iniciační guanosin -5'-trifosfát
IMP	inosin monofosfát

iNTP	iniciační nukleosid trifosfát
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
OD	optická denzita
P	promotor
ppGpp	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
RNA	kyselina ribonukleová
RNAP	RNA polymeráza
r - proteiny	ribozomální proteiny
rRNA	ribozomální RNA
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SDS	dodecyl sulfát sodný
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TF	transkripční faktor
Wt	„wild type“, divoký typ
$\Delta rpoE$	kmen <i>B. subtilis</i> s deletovaným genem <i>rpoE</i>

3. Úvod

Odhaduje se, že bakterie na Zemi existují 3,5 mld let a za tu dobu se rozšířily do všech prostředí, počínaje krátery podvodních sopek, přes arktická moře, po vnitřky jiných buněk. Na podmínky panující v těchto prostředích se dokázaly úspěšně adaptovat. Jak ukazují genetické, biochemické a molekulárně biologické výzkumy, tato schopnost adaptace závisí na genové výbavě bakterie, na úspěšné expresi této genové výbavy a v závislosti na měnících se podmínkách prostředí také na schopnosti účinně genovou expresi regulovat.

Genová exprese je proces, ve kterém dochází k vyjádření sekvence obsažené v DNA do trojrozměrné struktury proteinu. Genová exprese má dvě hlavní fáze: transkripci a translaci. Prvním krokem genové exprese je transkripce, je zajištěna DNA - dependentní RNA - polymerázou, která přepisuje vlákno DNA do vlákna RNA. Druhá fáze (translace) je charakteristická syntézou bílkovin, což je zajištěno translačním aparátem buňky. Obě fáze zahrnují mnoho kroků, kde může docházet k regulaci.

Moje práce se zabývá regulací genové exprese na klíčové úrovni - iniciaci transkripce. Studovaným organismem je modelová půdní gram pozitivní (G+) bakterie *Bacillus subtilis*. Na regulaci iniciace transkripce se do značné míry podílí málo prozkoumaná podjednotka bakteriální RNA polymerázy – δ . Tato podjednotka se vyskytuje pouze u G+ bakterií, je důležitá pro virulenci některých patogenů, ale znalost molekulárních detailů jejího působení je dosud jen skicovitá.

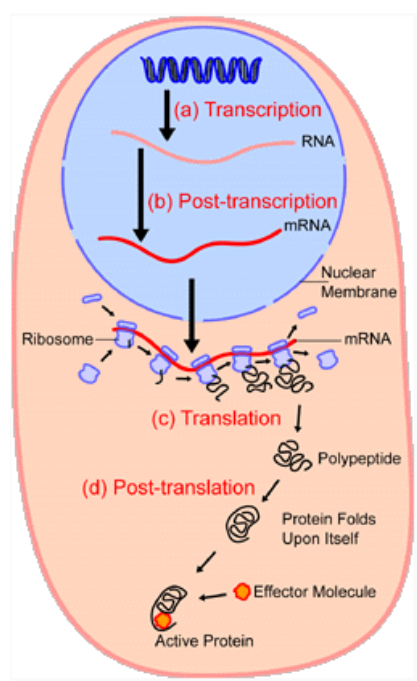
Tato diplomová práce se skládá ze dvou částí. První část je věnovaná teoretickému úvodu. Vysvětluje biologické a biochemické pozadí studovaných molekulárních dějů a stručně mapuje současný stav jejich poznání u bakterií. Pozornost je věnována zejména dvěma modelovým organismům, (i) gram negativní *Escherichia coli* a (ii) gram pozitivní *Bacillus subtilis*. Druhá část popisuje experimenty provedené na modelovém organismu *B. subtilis* zaměřené na bílkovinu δ .

4. Přehled literatury

4.1. Genová exprese

Genová exprese je proces, kterým se vyjadřuje informace obsažená v genech do RNA nebo proteinu. RNA a proteiny tedy slouží jako efekторы makromolekulárního mechanismu nutného pro životní funkce buňky. Proces genové exprese probíhá ve dvou hlavních krocích (obrázek 1):

- 1) přepis DNA → RNA označujeme jako transkripci
- 2) překlad RNA → protein označujeme jako translaci



Obrázek 1 - Obecné schéma genové exprese. Převzato z www.wikipedia.com.

4.1.1. Transkripce

U bakterií je transkripce zajišťována jedinou RNA polymerázou. Ta zajišťuje tvorbu veškeré buněčné RNA - stabilní RNA (tRNA, rRNA), protein kódující RNA (mRNA) i malé nekódující RNA. Tato všestrannost je zajištěna interakcemi RNAP s různými kofaktory a DNA (Lewis *et al.*, 2008).

Transkripce je proces, kdy RNAP nasedá na dvouvláknovou DNA (dsDNA), rozplete obě vlákna od sebe, následně přepíše templátové vlákno DNA do struktury RNA. Tento proces lze rozdělit na tři části:

- 1) **Iniciace** – RNAP se váže na specifickou sekvenci DNA, kterou označujeme jako promotor. Tím je zformován tzv. uzavřený komplex (obě vlákna DNA jsou dosud uzavřena – nerozpletena). RNAP nyní obklopuje DNA v pozici od místa -55 do místa +1 (v pozici +1 začíná transkripce). Poté přes konformační intermediáty přechází komplex RNAP - DNA do tzv. otevřeného komplexu, kdy dochází k „tání“ promotoru v oblasti - 10 hexameru, vlákna jsou separována v rozmezí -11 až +3. V otevřeném komplexu je pozice +1 templátového vlákna DNA připravena k přiřazení iniciačního nukleosidtrifosfátu (iNTP) (Haugen *et al.*, 2008; Ross and Gourse, 2009).
- 2) **Elongace** – RNAP opouští promotor, posunuje se podél templátového vlákna DNA, probíhá syntéza nové RNA připojením komplementárních (k templátovému vláknu DNA) NTP k volné 3'OH skupině ribózy posledního nukleotidu. Dojde k odštěpení pyrofosfátu. RNA se postupně z ternárního komplexu uvolňuje a DNA samovolně obnovuje svou původní konformaci (Vassylyev, 2009).
- 3) **Terminace** – Jedná se o ukončení syntézy RNA a její konečné uvolnění. Je kódována speciálními sekvencemi DNA, které označujeme jako terminátory. Jsou dva hlavní modely terminace transkripce – Rho - závislý (vyžaduje mRNA elementy a terminační proteinový faktor Rho – „*trans acting*“) a Rho - nezávislý (využívá převážně mRNA elementy – „*cis acting*“) (Canals *et al.*, 2010).

4.1.2. Posttranskripční modifikace

RNA molekuly mohou být syntetizovány ve formě prekurzorů (zejména stabilní molekuly jako rRNA, tRNA). Tyto RNA prekurzory jsou upraveny (v procesu zvaném RNA maturace) do konečné podoby, kdy mohou vykonávat svou funkci. Obecně lze říci, že jednotlivé RNA jsou vystřiženy endonukleázami z prekurzorových RNA, následují úpravy 3' a 5' konce, kam patří například polyadenylace. Maturovaná RNA je chráněna před rychlou degradací a je schopna plnit svoji funkci (Deutscher, 2006).

4.1.3. Translace

Translace je proces, kdy genetická informace obsažená v mRNA je využívána k syntéze proteinů. Pro tento proces jsou nezbytné rovněž translační faktory. Aktivované tRNA, nesoucí každá určitou aminokyselinu, jsou přenášeny pomocí elongačního faktoru Tu na ribozom, kde jsou párovány s odpovídajícím tripletem mRNA (označovaným jako kodon). Aminokyseliny jsou připojovány ke vznikajícímu polypeptidu a posun mRNA je zajišťován elogačním faktorem G dokud se neobjeví stop kodon ukončující translaci za asistence terminačních faktorů (Czworkowski *et al.*, 1994).

Regulace translace probíhá hlavně na těchto úrovních: konformace mRNA, tRNA, správná funkce aa-tRNA syntetázy (přiřazení správné AMK ke správné tRNA), správné párování nabitě tRNA s kodonem (Ibba and Soll, 1999).

4.1.4. Posttranslační modifikace

Po dokončení syntézy proteinu může tento získat konečnou podobu v procesu zvaném posttranslační modifikace a vykonávat tak svoji přesnou funkci. Jedná se například o acetylaci, metylaci, fosforylaci atd. (Yang and Gregoire, 2007).

4.2. Regulace genové exprese

Pro přežití buňky je třeba, aby vhodně reagovala na podněty z okolí změnami v genové expresi. Tyto změny mohou být regulovány na několika úrovních – na úrovni transkripce nebo na úrovni translace, či následně při posttranskripčních, posttranslačních modifikacích.

První proces genové exprese, který může být regulován, je proces transkripce a to zejména její první krok – iniciace transkripce. Regulace tohoto procesu je obzvlášť důležitá, protože správné rozhodnutí v této fázi ušetří buňce energii a zdroje.

Mechanismy regulace genové exprese na úrovni iniciace transkripce jsou:

- 1) Obecně známý proteinový systém represor / aktivátor a další proteiny zprostředkované způsoby regulace.

Transkripční faktory (TF) jsou proteiny, které pozitivně či negativně ovlivňují proces transkripce. Těchto proteinů kóduje např. *E. coli* více než 300. Některé transkripční faktory ovlivňují mnoho různých genů, jiné jsou specifické pro daný gen. Samotné transkripční faktory mohou být regulovány buď zpětnou vazbou (koncentrace daného TF kontroluje vlastní expresi), dále vazebná aktivita TF může být regulována pomocí ligandů, které v buňce kolísají na základě stavu prostředí a nakonec aktivitu TF ovlivňují kovalentní modifikace (fosforylace atd.) (Browning and Busby, 2004).

Typy proteinových regulátorů:

- a) Většinou se jedná o specifické **DNA vazebné proteiny** (např. Fis, IHF, CRP, atd.), které brání vazbě RNAP na DNA či ji stimulují. Některé TF mohou mít obojí účinek v závislosti na konkrétním promotoru.

b) Některé proteiny se mohou vázat **přímo na RNAP** (např.: DksA, NusA, Mfd, atd.) (Browning and Busby, 2004).

2) Neproteinové způsoby regulace:

a) **Atenuace transkripce** (Landick *et al.*, 1996). Jedná se o regulaci v časně fázi transkripce, kdy může dojít k předčasné terminaci. K této terminaci dochází na takzvaném atenuátoru, což je většinou sekvence na DNA ležící v oblasti tzv. „*leader region*“ – mezi promotorem a prvním genem operonu. V závislosti na dalších faktorech může docházet k terminaci nebo antiterminaci transkripce (Henkin and Yanofsky, 2002; Winkler and Breaker, 2005; Turnbough, Jr. and Switzer, 2008; Arnvig *et al.*, 2008).

b) Regulace genové exprese na úrovni iniciace transkripce pomocí **malých efektorových molekul** jako je ppGpp a iniciační NTP (iNTP). Tato regulace souvisí s funkcí proteinu δ , a proto jí zde věnuji širší prostor.

4.2.1. Regulace iniciace transkripce pomocí malých efektorových molekul

Bakterie potřebují velice rychle reagovat na změny v prostředí, jako jsou například změny v koncentracích živin. Syntéza regulačních bílkovin je relativně pomalá, proto bakterie využívají i různé neproteinové způsoby regulace genové exprese.

Na úrovni iniciace transkripce se uplatňují především tyto dva typy neproteinové regulace:

- 1) Regulace pomocí „alarmonu“ guanosin tetrafosfátu (ppGpp).
- 2) Regulace pomocí koncentrace iniciačních nukleosid trifosfátů ([iNTP]).

4.2.1.1. Regulace genové exprese pomocí guanosin tetrafosfátu (ppGpp)

Proteiny syntézy ppGpp:

- 1) **RelA**: z prekurzorů GTP / GDP syntetizuje guanosin pentafosfát (pppGpp), s využitím energie ATP. Enzym je asociován s ribozomem a reaguje na přítomnost tRNA bez navázané aminokyseliny.
- 2) **GppA**: pppGpp fosfohydroláza – konvertuje pppGpp na ppGpp.
- 3) **SpoT**: v závislosti na rovnováze reakce může ppGpp syntetizovat nebo hydrolyzovat (Srivatsan and Wang, 2008).

RelA a SpoT se vyskytují u *E. coli* (Barker *et al.*, 2001). U *B. subtilis* jsou tyto dvě funkce spojeny v jednom RelA proteinu. Navíc byly u tohoto organismu nalezeny ještě dva funkční homology označované jako „small *alarmon synthetases*“ (SAS). Jsou to produkty genů *yjbM* a *ywaC* (Nanamiya *et al.*, 2008). U *E. coli* je pro správnou funkci ppGpp potřeba protein DksA, který se váže do sekundárního kanálu RNAP (Mallik *et al.*, 2006). Homolog tohoto proteinu nebyl u *B. subtilis* nalezen, možná by jím mohla být podjednotka ω_2 , která se podobně jako ppGpp váže na podjednotku β' (Winkler and Breaker, 2005; Vrentas *et al.*, 2005). ppGpp se účastní regulace mnoha genů:

1) **Obecný vliv ppGpp:**

ppGpp snižuje afinitu podjednotky σ^{70} (důležité pro přepis „*housekeeping*“ genů) k RNAP a zvyšuje afinitu u ostatních faktorů σ (Srivatsan and Wang, 2008).

2) **Geny stringentní odpovědi:**

Stringentní odpověď: tento stav je vyvolán vstupem nenabitě tRNA (bez AMK) do místa A ribozomu, čímž se aktivuje RelA a dochází k syntéze ppGpp, který negativně reguluje geny pro stabilní RNA (rRNA, tRNA) a pozitivně reguluje geny pro enzymy biosyntézy aminokyselin a jejich transport (Winkler and Breaker, 2005).

3) **Geny pro sporulaci:**

Koncentrace ppGpp stoupá v pozdní exponenciální fázi, kdy dochází u některých bakterií k nástupu sporulace (Lopez *et al.*, 1981).

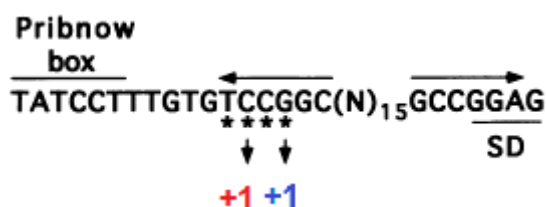
4) **Geny pro virulenci a senzitivitu k antibiotikům** (Abranches *et al.*, 2009).

4.2.1.2. Regulace pomocí iniciačního nukleosid trifosfátu (iNTP)

První zmínka, že by transkripce mohla být regulována pomocí [NTP] pochází z roku 1975, kdy Schwarz a kol. (Schwartz and Neuhard, 1975) publikovali práci o regulaci genů *pyr*. Je to pět genů produkujících enzymy pro syntézu pyrimidinových NTP (*pyrB*, *pyrC*, *pyrD*, *pyrE*, *pyrF*). Exprese těchto genů je ovlivněna hladinou UTP (*pyrB*, *pyrE*, *pyrF*) nebo CTP / GTP (*pyrC*, *pyrD*), nikoli jejich di- nebo mono- fosfátovými variantami.

Později bylo na promotoru *pyrC*, *pyrD* ukázáno (Sorensen *et al.*, 1993), že regulace funguje na principu výběru +1 místa v závislosti na koncentraci NTP, což je dáno kinetikou, kdy daný NTP (první NTP transkriptu označujeme jako iNTP) vstupuje do příslušného kanálu RNAP a stabilizuje komplex RNAP – promotor. Různě dlouhý transkript poté buď tvoří, nebo netvoří vlásenku a to určuje jeho stabilitu (obrázek 2).

Dále bylo ukázáno, že výběr +1 místa je ovlivněn i tvorbou první fosfodiesterové vazby (systém je senzitivní i na koncentraci druhého NTP) (Lund and Dahlberg, 1979). Při výběru místa +1 hraje roli jeho „síla“, kdy ATP (jako iNTP) \geq GTP \succ UTP \succ CTP a vzdálenost tohoto místa od Pribnowova boxu 7 \gg 6 = 8 \succ 9 \succ 10 (pořadí udává preferovanou pozici +1, nebo preferovaný iNTP) (Liu and Turnbough, Jr., 1994). Například u promotoru *pyrC* začíná transkripce při vysoké hladině CTP na pozici C7 a při nízké hladině CTP na pozici G9. Transkript začínající +1C není translatován, formuje totiž stabilní vlásenku na svém 5' konci, která schová Shine - Dalgarno sekvenci. Tento mechanismus dovoluje bakteriím regulovat množství enzymů pro syntézu pyrimidinů v závislosti na jejich koncentraci (Turnbough, Jr., 2008).



Obrázek 2 - Sekvence iniciačního regionu genu *pyrC*. Při vysoké hladině CTP začíná transkripce na místě +1 (červeně) a transkript tvoří vlásenku (horizontálními šipkami označené sekvence). Při nízké hladině CTP začíná transkripce na místě +1 (modře), vlásenka se netvoří (Liu and Turnbough, Jr., 1994).

Další variantou regulace pomocí [NTP] je tzv. podmíněná opakující se transkripce. V tomto případě je dané NTP v nadbytku (v případě např. *pyrB* u *E. coli* je tímto NTP UTP o vyšší koncentraci) připojováno opakovaně k 3' konci nascentního transkriptu díky zpětnému „sklouzávání“ RNA po DNA templátu, který kóduje počáteční sekvenci polyU. Produkt této reakce je rychle uvolněn z iniciačního transkripčního komplexu (Gaal *et al.*, 1997). Při nadbytku UTP není tedy syntetizována mRNA potřebná pro translaci bílkoviny důležité pro syntézu UTP. Pokud je UTP hladina nízká, dojde k transkripci této počáteční polyU sekvence a RNAP pokračuje v transkripci genu. Přepsaná mRNA pak umožňuje translaci bílkoviny nezbytné pro zajištění syntézy UTP.

Jiným mechanismem, kterým množství intracelulárního iNTP ovlivňuje transkripci je vliv na kinetiku formace iniciačního komplexu (Gourse, 1988). Sekvence promotoru neurčuje pouze účinnost, s jakou se na tento promotor váže RNAP, ale určuje také koncentraci NTP potřebnou pro iniciaci transkripce. Například promotory *rrn* P1 *E. coli* potřebují vysoké koncentrace iNTP (ATP nebo GTP v závislosti na promotoru) pro stabilizaci otevřeného komplexu (Gaal *et al.*, 1997). Koncentrace iNTP ovlivňuje transkripci z tohoto promotoru *in vitro* (Barker and Gourse, 2001; Schneider and Gourse, 2003) i *in vivo* (Barker and Gourse, 2001; Murray *et al.*, 2003b; Schneider and Gourse, 2004), tento jev platí jak pro G- *E. coli* tak i pro G+ *B. subtilis*. Dalším popsáním genem, který podléhá regulaci pomocí koncentrace iNTP je promotor genu pro faktor Fis z *E. coli*. (Haugen *et al.*, 2008).

4.3. Ribozomy

4.3.1. Operony rRNA obecně

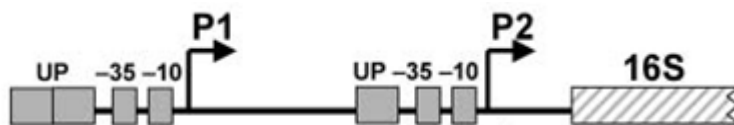
Geny pro rRNA jsou organizovány v operonech rRNA. Většina bakterií má geny pro všechny tři rRNA (16S, 23S, 5S) obsaženy v jednom operonu. Existují však i výjimky, kdy gen pro 16S rRNA má samostatný operon a geny pro 23S a 5S rRNA leží ve stejném operonu (např. u *Thermus thermophilus*), nebo geny pro každou rRNA mají samostatný operon (*Leptospira interrogans*). Tyto samostatné operony nemusí být vzájemně ve stejném početním zastoupení (*Borrelia burgdorferi*). V operonech rRNA jsou často obsaženy i geny pro tRNA (Schwartz *et al.*, 1992a; A. L. Sonenschein, 2002; Aiyar *et al.*, 2002b; Schneider *et al.*, 2003a).

V operonech se třemi geny pro rRNA jsou tyto geny odděleny dlouhými mezerníky s komplementárními repeticemi, které mohou být rozpoznávány endonukleázami (RNasa III u *E. coli*) (Evans *et al.*, 2006). Tyto mezerníky musí být v rámci posttranskripční modifikace odštěpeny za vzniku funkčních rRNA. Přítomnost všech genů pro rRNA v jednom operonu zajišťuje jejich ekvimolární zastoupení.

Počty operonů rRNA v bakteriálním chromozomu záleží na druhu organismu. V pomalu rostoucích organismech je počet operonů rRNA obecně nízký; naopak v organismech, které se množí rychle, je počet rRNA operonů vysoký. Například *Mycoplasma sp.* s generačním časem v řádu desítek hodin má pouze jeden operon, *Escherichia coli* s generačním časem 20 minut má operonů sedm, *Bacillus subtilis* se shodnou generační dobou jako *E. coli* má operonů deset, *Vibrio natriegens* s generační dobou kratší než 10 minut má těchto operonů nejspíše 14 (Schwartz *et al.*, 1992b; Aiyar *et al.*, 2002a; Schneider and Gourse, 2003).

4.3.2. Promotory P1 a P2

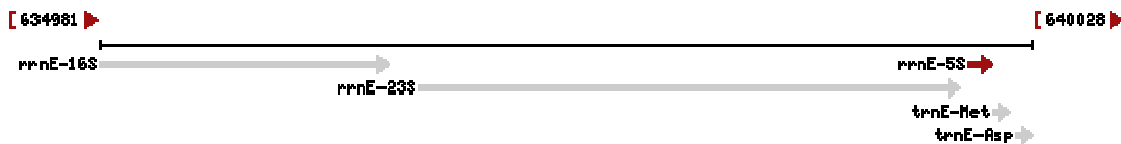
Bakterie v mnoha případech u svých genů využívají tandemové uspořádání promotorů (Mendoza-Vargas *et al.*, 2009), což umožňuje širší spektrum regulací daného genu. Příkladem takového uspořádání jsou geny pro rRNA. Ty využívají dva promotory - P1 a P2 (obrázek 3) (Murray and Gourse, 2004). Promotory *rrn* P1 jsou zodpovědné za většinu transkripce rRNA během rychlejších růstových rychlostí, jejich aktivita dramaticky roste se vzrůstající růstovou rychlostí („*growth – rate dependent control*“). P1 je inhibován během hladovění na aminokyseliny („*stringent control*“) a je homeostaticky regulován („*feedback control*“) (Keener and Nomura, 1993; Hernandez and Cashel, 1995; Bartlett *et al.*, 1998). Aktivita promotoru P2 s měnící se růstovou rychlostí se mění relativně málo. P2 je aktivnější než P1 během přechodových stavů a to zejména z exponenciální fáze růstu do stacionární fáze. Promotor P2 tvoří ve stacionární fázi malé množství transkriptu, kdežto promotor P1 netvoří transkript žádný (Murray *et al.*, 2003a). Oba promotory jsou senzitivní na regulaci pomocí [iNTP], ovšem promotor P2 vykazuje tuto senzitivitu menší (Murray and Gourse, 2004; Krasny and Gourse, 2004; Paul *et al.*, 2004a; Pul *et al.*, 2005).



Obrázek 3 – Schéma tandemového uspořádání promotorů P1 a P2 u *E. coli* (Murray and Gourse, 2004). -35, -10 jsou promotorové konsensus hexamery. UP – „upstream element“ – A/T bohatá sekvence, která zvyšuje afinitu RNAP k DNA, interakce probíhá pomocí podjednotek α .

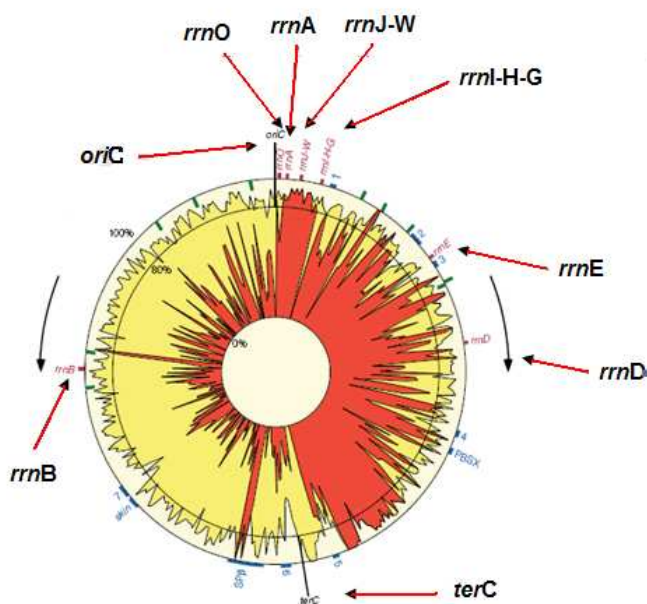
4.3.3. Operon rRNA *B. subtilis*

Operony rRNA jsou u *B. subtilis* označovány *rrn* a je jich celkem 10 (*rrnA*, *O*, *J*, *W*, *B*, *I*, *H*, *G*, *E*, *D*) (Jarvis *et al.*, 1988). Každý operon obsahuje geny 16S, 23S a 5S rRNA (obrázek 4) (Vold *et al.*, 1988a; Vold *et al.*, 1988b).



Obrázek 4 - Příklad organizace ribozomální RNA operonu u *B. subtilis*.

Většina operonů rRNA je lokalizována těsně za začátkem replikace, aby interval mezi replikací a transkpcí při dělení buňky byl co nejkratší (obrázek 5). Pokud jsou přítomny geny pro tRNA, jsou lokalizovány mezi geny pro 16S a 23S nebo až za genem pro 5S (Green and Vold, 1992). Šest rRNA operonů (*rrnB*, *J*, *A*, *I*, *D*, *O*) obsahuje tandem promotorů P1 a P2 (počátky transkripce), jeden (*rrnE*) má jen P1 a tři (*rrnH*, *W*, *G*) mají jen P2. Iniciační nukleosid trifosfát u promotorů P1 i P2 je ve všech případech iniciační nukleosid trifosfát GTP.



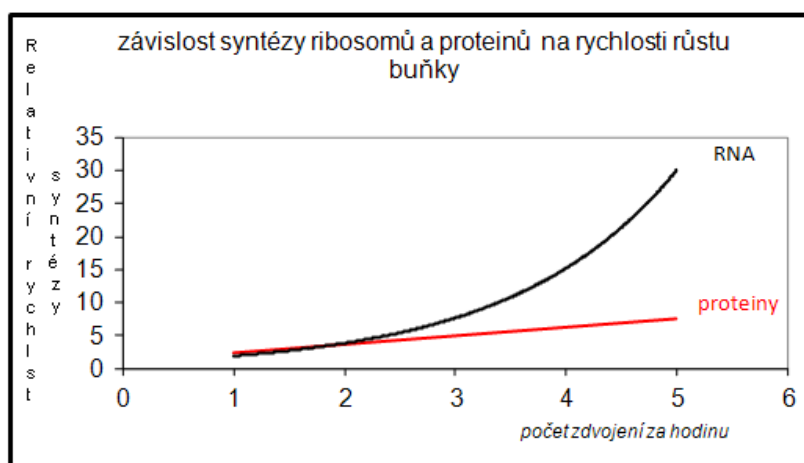
Obrázek 5 - Lokalizace operonů *rrn* na chromosomu *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997).

4.3.4. Syntéza ribozomů

Syntéza proteinů je hlavní aktivitou bakteriální buňky z hlediska výdaje energie a spotřeby živin (VanBogelen *et al.*, 1996). Ribozom je místem, na kterém probíhá translace a jako takový hraje v procesu exprese genetické informace nezastupitelnou roli.

Ribozomy tvoří až 40 % suché hmoty bakteriální buňky. V bakterii, která se rozdělí čtyřikrát za hodinu, se syntetizuje zhruba sedmdesát tisíc ribozomů. Tuto energetickou investici do ribozomů je nutné přesně regulovat, aby buňka zbytečně neplýtvala energií a živinami, ale aby si zároveň zachovala schopnost efektivně pokrývat své potřeby produkce nových proteinů (Condon *et al.*, 1995; Stevenson and Schmidt, 2004).

Množství proteinu v buňce se se změnou množství živin v prostředí příliš nemění (obrázek 6). Rovněž rychlost translace je konstantní bez ohledu na množství živin v prostředí. Mění se generační doba, tedy rychlost vzniku nových buněk. Buňka tedy nemění množství syntetizovaných proteinů na buňku, ani výkonnost ribozomů. Mění se doba, za kterou je dané množství proteinů syntetizované a to změnou v počtu ribozomů, které proteiny vyrábí (Nomura *et al.*, 1984; Schneider *et al.*, 2003b).



Obrázek 6 - Graf znázorňuje, že při vzrůstající rychlosti růstu obsah proteinů v buňce narůstá jen mírně (červená křivka), naopak počet ribozomů v buňce vzrůstá exponenciálně (černá křivka). Překresleno podle (Nomura *et al.*, 1984).

Když se rychle rostoucí bakterie dostane do prostředí chudého na živiny, musí množství ribozomů snížit, při přechodu do prostředí bohatšího na živiny počet ribozomů zvýší.

Ribozom je složen ze tří ribozomálních RNA (rRNA) a přibližně 52 ribozomálních proteinů (r - proteinů).

Při syntéze nového ribozomu jsou důležité dva momenty:

- a) Prvním momentem je koordinace syntézy rRNA s ekvimolárním množstvím ribozomálních proteinů. Tento problém je řešen tak, že produkce r - proteinů je zpětnovazebně závislá na množství (Nomura *et al.*, 1984; Zengel and Lindahl, 1994). Podílí se na ní mechanismy jako např. atenuace transkripce (Henkin and Yanofsky, 2002).

- b) Druhým momentem je regulace syntézy takového množství ribozomů, které odpovídá momentálním potřebám buňky na syntézu proteinů. Zde jsou rozhodující mechanismy regulace syntézy rRNA, protože toto je krok určující rychlost syntézy ribozomů (Hernandez *et al.*, 1996; Krasny and Gourse, 2004; Paul *et al.*, 2004b).

Regulační mechanismy exprese rRNA jsou intenzivně zkoumány více než 50 let a přesný molekulární mechanismus není do všech podrobností dosud znám (Kjelgaard *et al.*, 1958; Gourse *et al.*, 1996; Bartlett *et al.*, 1998; Schneider and Gourse, 2003). Je to homeostatický systém, kde ribozom spotřebou ATP / GTP či RelA závislou syntézou ppGpp ovlivňuje jejich koncentraci a tím zpětně aktivitu promotorů rRNA a syntézu nových ribozomů (Jinks-Robertson *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 1987; Yamagishi *et al.*, 1987; Keener and Nomura, 1993; Schneider *et al.*, 2003b).

Regulace syntézy rRNA probíhá hlavně na úrovni iniciace transkripce a důležitou roli tu hraje (vedle regulace proteinovými faktory) regulace pomocí malých efektorových molekul (Jensen

and Pedersen, 1990; Murray *et al.*, 2003b). Byly objeveny i mechanismy regulace exprese rRNA mimo úroveň iniciace transkripce (Squires and Zaporjets, 2000).

Historicky používané přístupy studia syntézy rRNA:

- 1) **Regulace rRNA závislá na ustálené rychlosti růstu** („*growth – rate dependent control*“). V exponenciální fázi růstu rychlost syntézy rRNA závisí na růstové rychlosti. Nižší růstová rychlost - méně ribozomů než při vyšší růstové rychlosti a obráceně. Jedná se o koordinaci počtu ribozomů s potřebami buňky na syntézu proteinů (Schaechter *et al.*, 1958; Gourse *et al.*, 1986). Regulace syntézy rRNA v závislosti na rychlosti růstu se pravděpodobně účastní malé efektorové molekuly a u *E. coli* i faktor Fis, nicméně přesný mechanismus odpovědný na tuto regulaci je stále neznámý (Gourse *et al.*, 1996; Gaal *et al.*, 1997).

- 2) **Regulace rRNA závislá na rychlé změně růstové rychlosti.** Buňka musí být schopna reagovat na rychlou změnu dostupnosti živin - ať už pozitivní nebo negativní.
 - a) **Změny v množství živin.** Příkladem je stringentní odpověď - hladovění na AMK, což se projeví poklesem produkce rRNA a tRNA. Dále například hladovění na zdroj uhlíku atd. (Sands and Roberts, 1952; Hernandez *et al.*, 1996). Podle uspořádání experimentu mluvíme o tzv. „*shiftech*“ - „*downshift*“ – přesun z bohatého do chudého prostředí (Neidhardt and Magasanik, 1960; Molin *et al.*, 1977), dále tzv. „*upshift*“ – přesun z chudého do bohatého prostředí (Friesen *et al.*, 1975; Olsson and Gausing, 1980).

 - b) **Přechody mezi jednotlivými fázemi růstové křivky** – z exponenciální do stacionární (Jacobson and Gillespie, 1968; Aviv *et al.*, 1996), ze stacionární do exponenciální (Jacobson and Gillespie, 1968; Sarmientos and Cashel, 1983; Lukacsovich *et al.*, 1987).

Je tedy patrné, že v buňce musí fungovat síť signálů zajišťujících přesnou regulaci syntézy rRNA. Ve všech uvedených případech se na této regulaci pravděpodobně podílejí malé efektorové molekuly (Barker and Gourse, 2001; Murray *et al.*, 2003b).

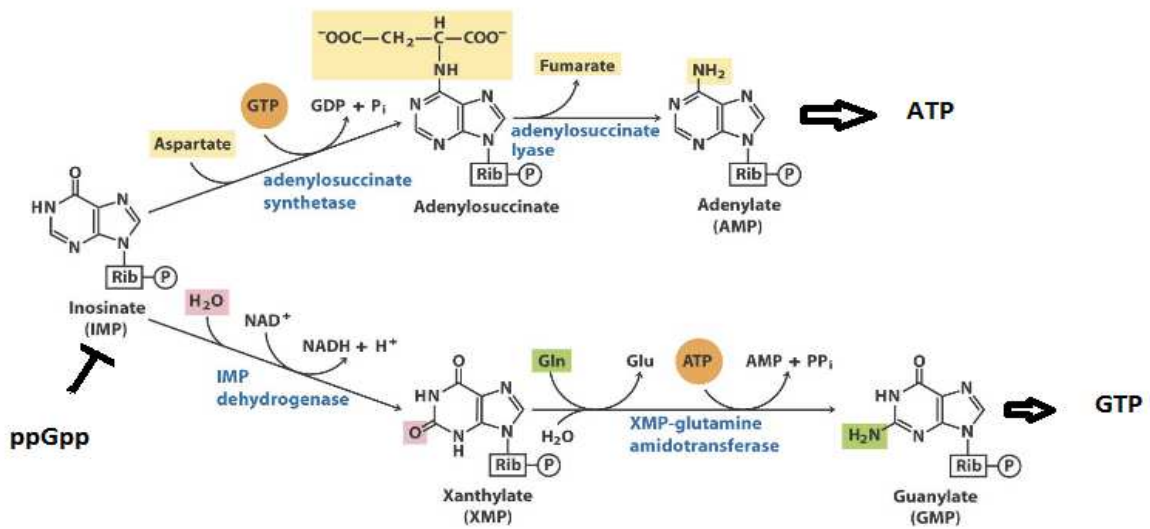
Shrnuto, na syntézu ribozomů připadá velká část buněčných energetických rezerv, samotné ribozomy hrají centrální úlohu v buněčných dějích. Proto pochopení mechanismu jejich regulace je zásadní pro pochopení buněčné fyziologie (Murray and Gourse, 2004).

4.3.4.1. Regulace iniciace transkripce *rrn* operonů pomocí ppGpp

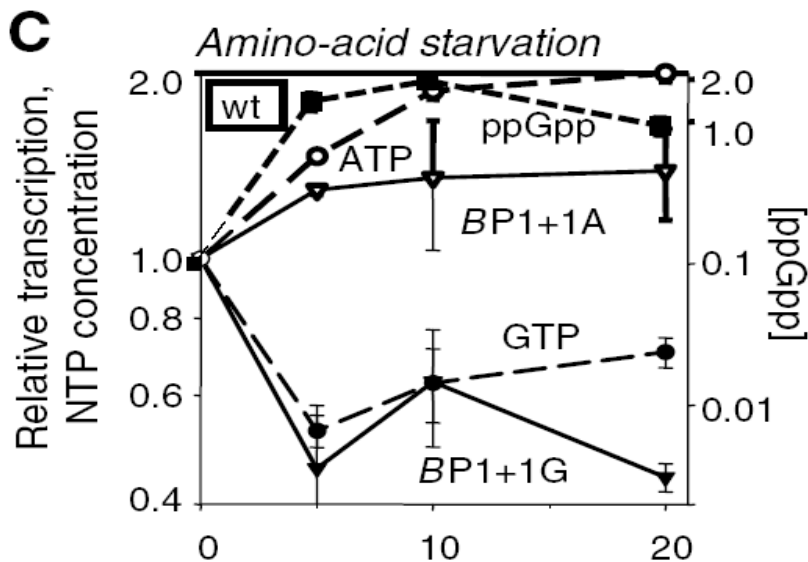
U *E. coli* se ppGpp váže přímo na RNAP, neznámo kam (Vrentas *et al.*, 2008), čímž urychluje rozpad otevřeného komplexu a urychluje izomerizační krok v iniciaci transkripce. U promotorů, kde je rychlost iniciace transkripce limitována rychlostí izomerizace (např.: promotory pro tvorbu AMK) zvýšení ppGpp urychluje izomerizaci a tím iniciaci transkripce. Ribozomální promotory mají poločas rozpadu otevřeného komplexu velmi krátký, ppGpp v tomto případě snižuje rychlost iniciace transkripce. Takto je u *E. coli* regulována stringentní odpověď, během níž ppGpp stoupá a působí přímo na RNAP (Paul *et al.*, 2005).

B. subtilis používá alternativní strategii pro regulaci pomocí ppGpp, které působí na RNAP nepřímo (Krasny and Gourse, 2004). Během stringentní odpovědi koncentrace ppGpp stoupá a reciprocally s tím klesá hladina GTP (iNTP pro promotory *rrn*) prostřednictvím inhibice IMP dehydrogenázy (inhibice syntézy GTP vede ke zvýšení hladiny ATP – viz obrázek 7), dále je GTP použit pro syntézu ppGpp. Změnou v hladinách NTP dochází k změnám v účinnosti iniciace transkripce genů, jejichž promotory jsou na tyto změny senzitivní. Promotory *rrn* jsou senzitivní ke změnám v koncentraci GTP (během stringentní odpovědi hladina GTP klesá, klesá i syntéza rRNA), geny pro enzymy syntézy aminokyselin jsou senzitivní ke změnám hladiny ATP (jeho koncentrace během stringentní odpovědi stoupá, stoupá i hladina transkripce těchto genů) (obrázek 8 a 9). Obecně, identita místa +1 je důležitá pro geny, které jsou regulovány během stringentní odpovědi. „*Upregulované*“ geny mají jako iNTP ATP, „*downregulované*“ geny mají jako iNTP GTP (Krasny *et al.*, 2008). U *B. subtilis* se ppGpp tedy neváže na RNAP a transkripci ovlivňuje nepřímo působením na

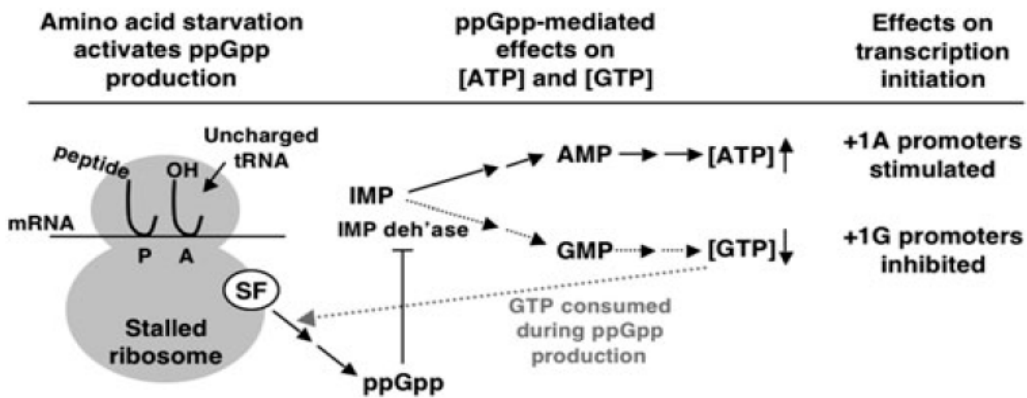
koncentrace ATP a GTP (Krasny and Gourse, 2004) (obrázek 10). Podobný mechanismus regulace transkripce byl pozorován i u *T. thermophilus* (Kasai *et al.*, 2006).



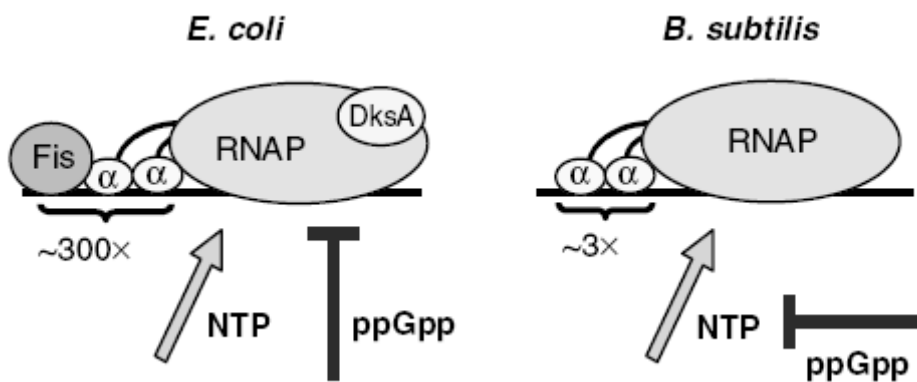
Obrázek 7 - Přeměna IMP na GMP a AMP. IMP je společný prekurzor pro GMP a AMP, inhibicí IMP dehydrogenázy pomocí ppGpp dochází k inhibici syntézy GMP a hromadění IMP, který je využíván na AMP. Převzato z www.wikipedia.com.



Obrázek 8 – Korelace in vivo mezi koncentrací GTP a aktivitou promotoru *rrnB* P1 z *B. subtilis* během stringentní odpovědi. BP1 +1G je wt promotor, který má iNTP GTP. BP1 +1A je konstrukt, kdy iNTP je ATP. Na ose X je čas v minutách, na ose y relativní transkripce a relativní koncentrace NTP, na vedlejší ose vidíme relativní koncentrace ppGpp (Krasny and Gourse, 2004).



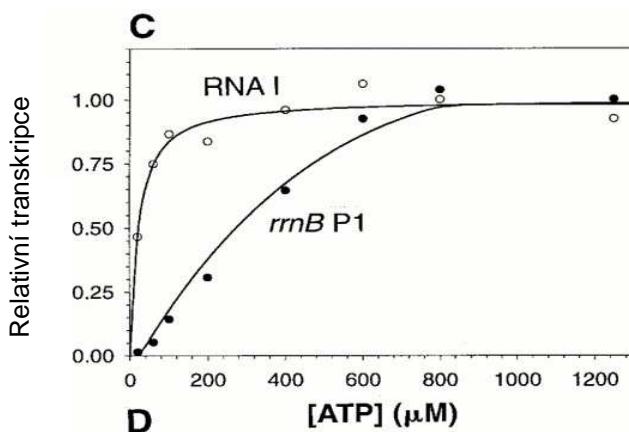
Obrázek 9 - Regulace transkripce u *B. subtilis* pomocí ppGpp a iNTP během stringentní odpovědi. (Turnbough, Jr., 2008).



Obrázek 10 - Schéma regulace promotorů rRNA u *E. coli* a *B. subtilis*. Schéma naznačuje rozdíly v regulaci pomocí malých efektorových molekul (Krasny and Gourse, 2004).

4.3.4.2. Regulace iniciace transkripce genů *rrn* pomocí [iNTP]

Otevřené komplexy promotorů rRNA jsou nestabilní, mají krátký poločas života. Stabilita otevřeného komplexu určuje, zda má iNTP čas do něj vstoupit a jestli bude RNAP schopna vytvořit první vazbu mezi iniciačním NTP a druhým NTP. Požadavek na relativně vysokou koncentraci NTP u promotorů *rrn* P1 je dán mimo jiné atypickou pozicí +1 (9 bp „downstream“ od Pribnowova boxu) (Haugen *et al.*, 2006). Promotory *rrn* jsou tedy „senzitivní“ k měnícím se hladinám iNTP; v případě *B. subtilis* a promotorů P1 je to výlučně GTP (Natori *et al.*, 2009). „Senzitivita“ znamená, že promotor potřebuje relativně vysoké [iNTP] pro maximální rychlost iniciace transkripce, kdy mechanismem je ovlivnění stability otevřeného komplexu (obrázek 11) (Schneider and Gourse, 2003; Turnbough, Jr., 2008).



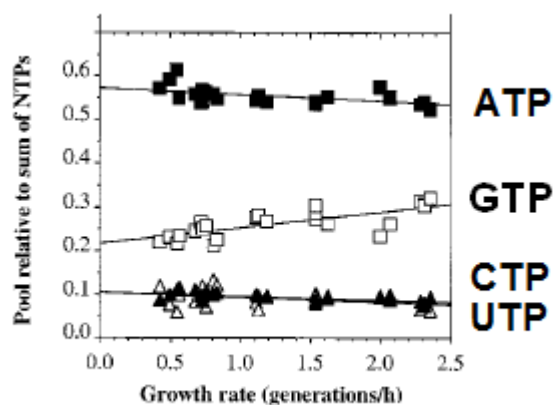
Obrázek 11 - Vliv koncentrace iNTP na účinnost transkripce. Závislost účinnosti (vzhledem k maximu) transkripce na koncentraci ATP z promotoru *rrnB* P1 (+1A) a [iNTP] neregulovaného promotoru RNA 1 (Gaal *et al.*, 1997).

Tato regulace je zvláště důležitá v přechodových stavech růstové křivky, kdy při přechodu z lag fáze do exponenciální fáze dochází ke zvýšení hladiny NTP, naopak ve stacionární fázi je hladina NTP nízká, což koreluje s potřebou proteosyntézy v daných stavech (Murray *et al.*, 2003b). U *B. subtilis* se tato regulace (na rozdíl od *E. coli*) uplatňuje i během stringentní odpovědi (Krasny and Gourse, 2004).

4.4. Změny v intracelulárních koncentracích NTP

4.4.1. Změny v intracelulárních koncentracích NTP v závislosti na rychlosti růstu

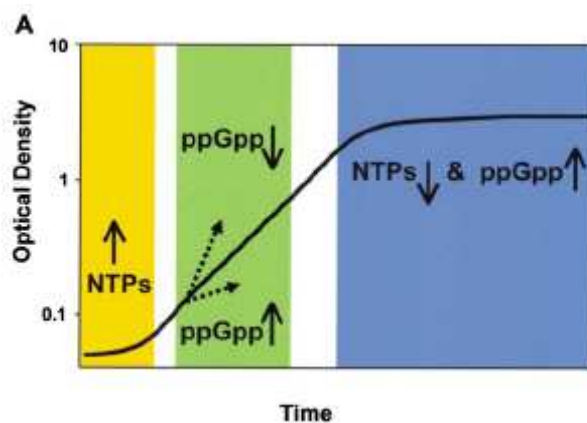
U *E. coli* koncentrace iNTP hraje důležitou roli při regulaci iniciace transkripce rRNA v závislosti na změnách v podmínkách růstu. Pokud *E. coli* roste na různých substrátech, liší se i ustálená růstová rychlost, rychlost syntézy rRNA je úměrná čtverci růstové rychlosti (tento fenomén označujeme jako „*growth-rate dependent control*“). Molekulární podstata zatím není plně objasněna. Spekulovalo se, že by mohlo jít o regulaci pomocí [iNTP] (Schneider and Gourse, 2004). To se u *E. coli* nepotvrdilo, jelikož koncentrace ATP a GTP zůstává s měnící se růstovou rychlostí stejná (Gaal *et al.*, 1997; Squires and Zaporojets, 2000; Petersen and Moller, 2000; Schneider and Gourse, 2004) (Obrázek 12). U *B. subtilis* dosud nebyl žádný experiment proveden.



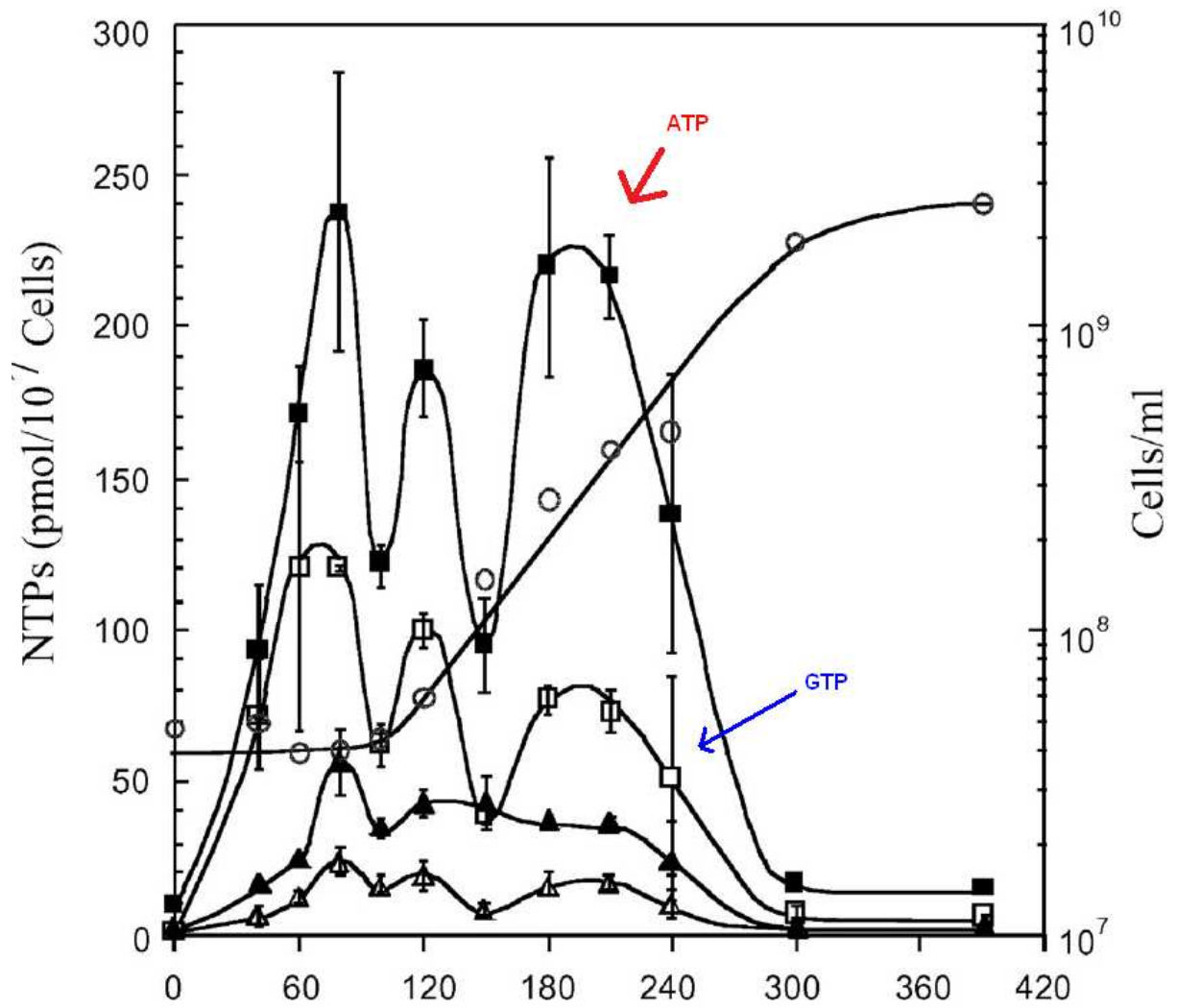
Obrázek 12 – Hladiny NTP u *E. coli* při různých růstových rychlostech. Na spodní ose je vynesena počet generací za hodinu, na svislé ose je relativní koncentrace NTP. Vidíme, že hladiny jednotlivých NTP se příliš nemění (Petersen and Moller, 2000).

4.4.2. Změny v intracelulárních koncentracích NTP v přechodových fázích růstové křivky

Při přechodech ze stacionární fáze dochází ke vzrůstu koncentrace ATP a GTP a tím k rychlému zvýšení syntézy rRNA, při přechodu do stacionární fáze je tomu naopak; zde hraje roli i ppGpp. ppGpp hraje roli v regulaci rRNA i při „shiftech“ během exponenciální fáze růstu (obrázek 13) (Murray *et al.*, 2003b). To platí pro *E. coli*; u *B. subtilis* je regulační molekulou iNTP. U *E. coli* se také ukázalo, že hladina NTP (hlavně ATP, GTP) během růstové křivky dramaticky fluktuuje (obrázek 14) (Walker *et al.*, 2004).



Obrázek 13 - Schéma regulace transkripce rRNA malými efektorovými molekulami u *E. coli* (černá linka je růstová křivka). Šipkami jsou naznačeny posuvy v hladinách NTP a ppGpp, přerušované šipky znázorňují změnu růstové rychlosti při „shiftech“ (Murray *et al.*, 2003b).



Obrázek 14 - Změny v koncentracích NTP během růstu *E. coli* •ATP, □GTP, ▲UTP, ▲CTP,

○ růstová křivka. Na spodní ose vidíme čas v minutách, na hlavní svislé ose je vynesena hladina NTP, na vedlejší svislé ose je počet buněk v médiu (Walker et al., 2004).

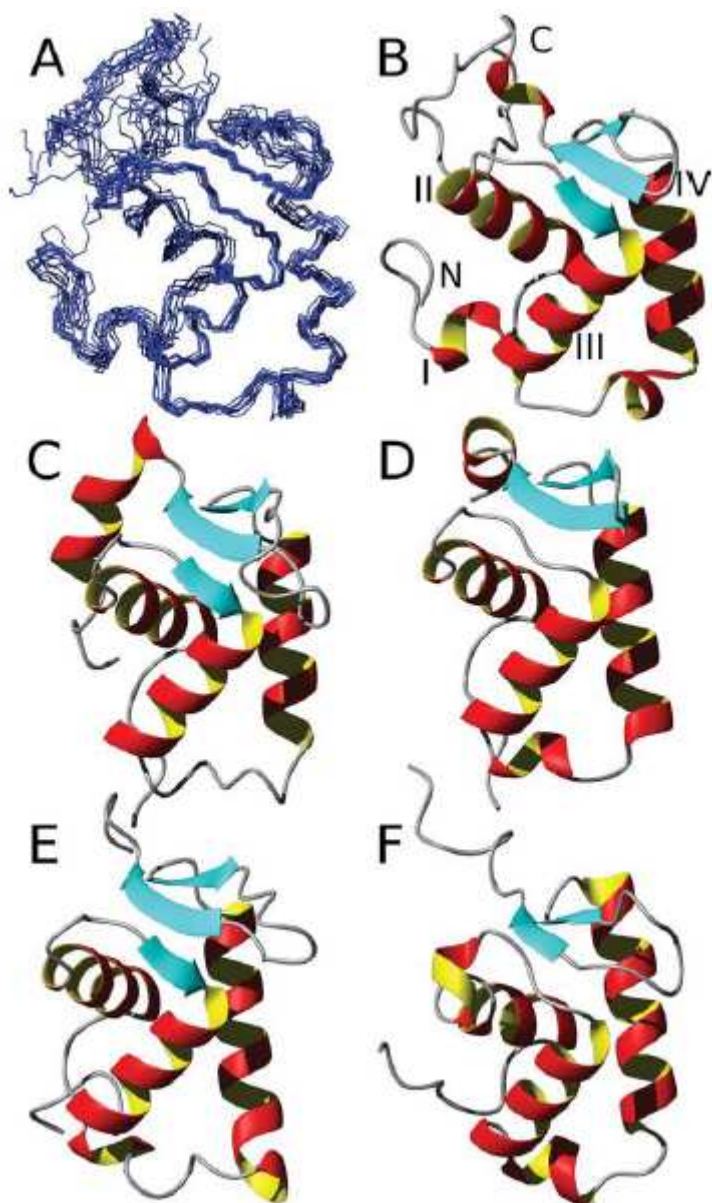
4.5. Podjednotka bakteriální RNAP - δ

RNAP se obecně skládá z pěti podjednotek (2x α , β , β' , ω 2). G+ bakterie mají navíc dvě podjednotky – ω 1 a δ .

Zde je krátké shrnutí poznatků o podjednotce δ ; obšírněji se touto podjednotkou zabývá moje bakalářská práce.

- 1) **Protein δ** se vyskytuje jen u G+ bakterií. Kódována je genem *rpoE*, transkribována je ze σ^A dependentního promotoru. Molekulární hmotnost je 20,4 kDa, skládá se ze 173 AMK (Lopez de Saro *et al.*, 1999).
- 2) **Protein δ** se skládá ze dvou domén (NTD a CTD) (Lopez de Saro *et al.*, 1999).
- 3) **NTD** je strukturovaná, má 4 α helixy, jeden antiparalelní β list (Motackova *et al.*, 2010) (obrázek 15), váže se na jádro RNAP. CTD je nestrukturovaná, je flexibilní, pravděpodobně kompetuje s NK.
- 4) **Protein δ** zvyšuje specifitu vazby RNAP k promotoru *in vitro* (snižuje afinitu RNAP k DNA, schopnost RNAP vázat se na „silné“ promotory zůstává zachována, schopnost asociovat se „slabými“ promotory klesá). Má vliv na procesivitu transkripce *in vitro* (zvyšuje rychlost recyklace jádra RNAP) (Juang and Helmann, 1994).
- 5) **Kmeny $\Delta rpoE$** mají prodloužený přechod z lag fáze a vykazují změny v morfologii (Juang and Helmann, 1994).
- 6) **Protein δ** je důležitý pro virulenci u *S. agalactiae* a *S. aureus* (Watson *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2003; Seepersaud *et al.*, 2006).

7) **Protein δ** má vliv na regulaci pomocí [iNTP] *in vitro* (A. Švenková, osobní sdělení, viz kapitola 7.2.)



Obrázek 15 - Struktura NTD podjednotky δ (A,B) a její strukturní homology (C-F) nalezené v databázi PDBI (Motackova et al., 2010).

4.6. Shrnutí

Transkripce je klíčovou součástí mašinerie exprese genů. Hlavním proteinem, který se podílí na transkripci je RNAP. G+ a G- bakterie se poněkud liší složením tohoto enzymu (Artsimovitch *et al.*, 2000). Jedním z těchto rozdílů je přítomnost podjednotky δ u G+ bakterií.

Důležitým mechanismem regulace transkripce je regulace koncentrací iNTP. V pozorováních *in vitro* má protein δ vliv na senzitivitu RNAP k [iNTP]. Není jasné, zda tato pozorování budou korelovat i s pozorováními prováděnými *in vivo*.

5. Materiál a metody

5.1. Materiál

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 eppendorfci

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 restričními endonukleázami
- ❖ Thermo 120 – termoblok s možností nastavení teploty
- ❖ Biological Termostat BT 120 – inkubace Petriho misek
- ❖ Incubator Shaker Model G 25, New Brunswick Scientific (USA) – inkubace kultur v tekutých médiích
- ❖ Elpan Water Bath Shaker type 357
- ❖ Rotační třepačka RT60

Další přístroje

- ❖ Denzitometry: Bio-Rad Molecular Imager FX (USA), Expoziční kazeta s expoziční fólií BAS-MS2040 Fuji (Japonsko)
- ❖ Spektrofotometr: Shimadzu UV - 1601
- ❖ PCR cyclery: PTC – 100 MJ Research, PTC – 200 MJ Research
- ❖ Geigerův – Mullerův počítač: mini - monitor Series 900
- ❖ Sušička gelů: Biometra D 62
- ❖ Vakuová pumpa KNFLAB Laboport
- ❖ Váhy analytické – Kern ABJ
- ❖ Předvážky – Kern EG
- ❖ Sonikátor – Hielschner UP200S
- ❖ TLC desky – Polygram
- ❖ Filtry pro RNA – Glass Microfibre Filters, 25mm (Whatman, USA)

Chemikálie, enzymy a další preparáty

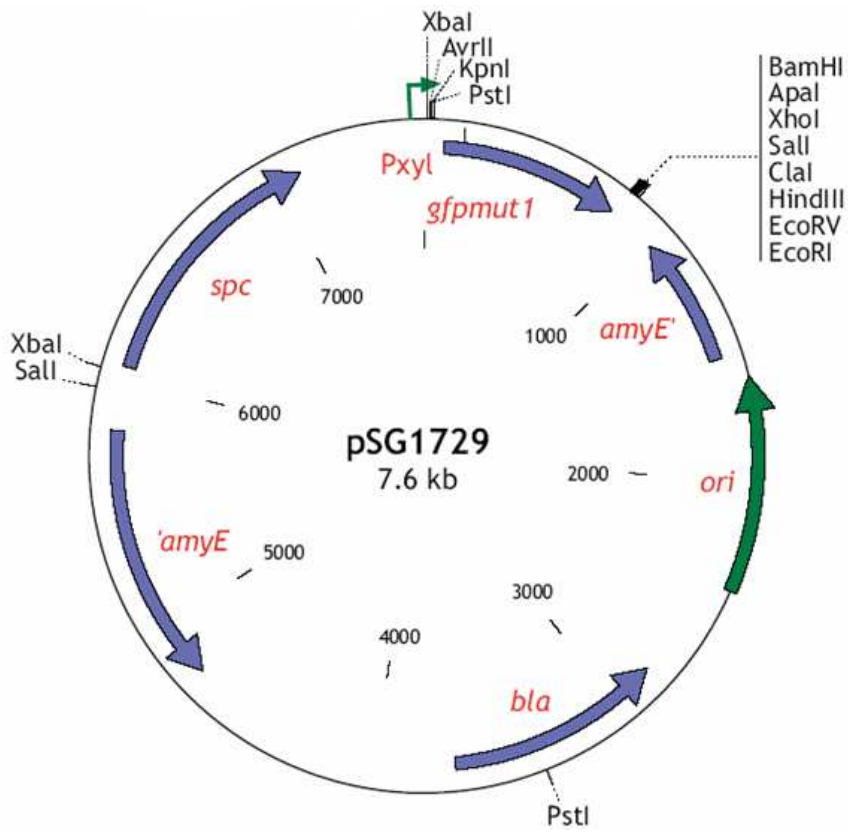
- ❖ Agar pro pevné půdy (Lachema, ČR)
- ❖ Agaróza pro molekulární biologii (Sigma, Německo; Lachema; ČR)
- ❖ Aqua pro injectione biotika (Biotika, SR)
- ❖ Akrylamid (Serva, USA)
- ❖ Amoniumpersulfát (Serva, USA)
- ❖ Antibiotika (Biotika, SR)
- ❖ Bromphenole blue (Serva, USA)
- ❖ EDTA (chelaton III, Lachema, ČR)
- ❖ GTP (Roche, USA)
- ❖ ATP (Roche, USA)
- ❖ CTP (Roche, USA)
- ❖ UTP (Roche, USA)
- ❖ [γ - ^{32}P] ATP (M.G.P., ČR)
- ❖ (3H) uridin (M.G.P., ČR)
- ❖ N, N, N', N'- tetramethylethyldiamine (TEMED), (LKB, Švédsko)
- ❖ N, N'- methylenbisakrylamid (Serva, USA)
- ❖ Restrikční endonukleázy – *EcoR* I, *Kpn* I (Takara, Japonsko), (Promega, USA)
- ❖ T4 DNA ligáza (Takara, Japonsko)
- ❖ T4 polynukleotidyl transferáza (Takara, Japonsko)
- ❖ MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (Roth, Německo)
- ❖ Zásobní roztoky aminokyselin (AppliChem, Německo) – 2g na 100 ml, ddH₂O
- ❖ Xylóza (Roth, Německo)

Používaná kultivační média

- ❖ **Komplexní médium LB** – složení 1 litru: Tryptone 10 g, kvasinkový extrakt 5g, NaCl 10 g, zbytek ddH₂O
 - ❖ **Definované médium MOPS** – na 100 ml je potřeba: 10 ml 0,5 M MOPS, 1 ml 1 M NH₄SO₄, 0,2 ml 0,5 M KH₂PO₄, 0,1 ml 2 M MgCl₂, 0,2 ml 1 M CaCl₂, 0,005 ml MnCl₂, 0,01 ml 0,05 M FeCl₃, 2 ml 20% roztoku glukosy
- a) „chudé médium MOPS“ – k stávajícímu roztoku přidám ze zásobního roztoku 0,5 ml fenylalaninu a 0,5 ml tryptofanu, doplnit vodou na 100ml
- b) „bohaté médium MOPS“ – ke stávajícímu roztoku přidám ze zásobních roztoků 0,5 ml všech aminokyselin, doplnit vodou na 100ml

5.2. Seznam používaných bakteriálních kmenů a plazmidů

Kmen / plazmid	Genotyp	Reference
<i>B. subtilis</i>		
MO1099	<i>pheA1AmyE::mIs</i>	(Guerout-Fleury <i>et al.</i> , 1996)
#642 („mutantní kmen“, „ $\Delta rpoE$ “)	MO1099, $\Delta rpoE$ – Kan, <i>amyE::Cm rrnB P1 (-39/+1)-lacZ</i>	Laboratoř
#7554 („wt“)	MO1099, <i>amyE::Cm rrnB P1 (-39/+1)-lacZ</i>	Laboratoř
RLG6943	MO1099 <i>amyE::Cm rrnO P2 (-77/+50)-lacZ</i>	(Krasny and Gourse, 2004)
#866	MO1099 <i>amyE::Pxyl-rpoE-his</i>	Laboratoř
#556	MO1099 <i>amyE::Pxyl-rpoE</i>	Tato práce
<i>E. coli</i>		
Dh5 α	<i>supE44, $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ\Delta M15$) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel-A1</i>	
LK22	pCD2 (<i>B. subtilis sigA</i>)	(Aiyar <i>et al.</i> , 1994)
Plazmid		
pSG1729 (obrázek 16)	<i>bla amyE3' spc Pxyl – gfpmut1' amyE5'</i>	(Lewis and Marston, 1999)
pSG1729- <i>rpoE</i> (obrázek 26)	<i>Bla amyE3' spc Pxyl –rpoE amyE5'</i>	Tato práce



Obrázek 16 - Schéma plazmidu pSG1729 (Lewis and Marston, 1999).

5.3. Metody

5.3.a. Ověření přítomnosti neobvyklých nukleotidů vázaných na protein δ u *B. subtilis*

5.3.1. Měření optické denzity (OD)

Principem je měření množství světla, které projde vzorkem ku světlu, které na vzorek dopadá. Zjednodušeně řečeno, čím je vzorek hustší, tím méně světla jím projde (tím má větší absorbanci). Měření probíhají na spektrofotometru Shimadzu UV – 1601, který umožňuje nastavit vlnovou délku světla, jímž se vzorek ozařuje.

- ❖ Měření koncentrace buněk probíhá při vlnové délce 600 nm (OD_{600}).
- ❖ Měření koncentrace NK probíhá při vlnové délce 260 nm (OD_{260}).
- ❖ Měření koncentrace proteinů probíhá při vlnové délce 280 nm (OD_{280}).

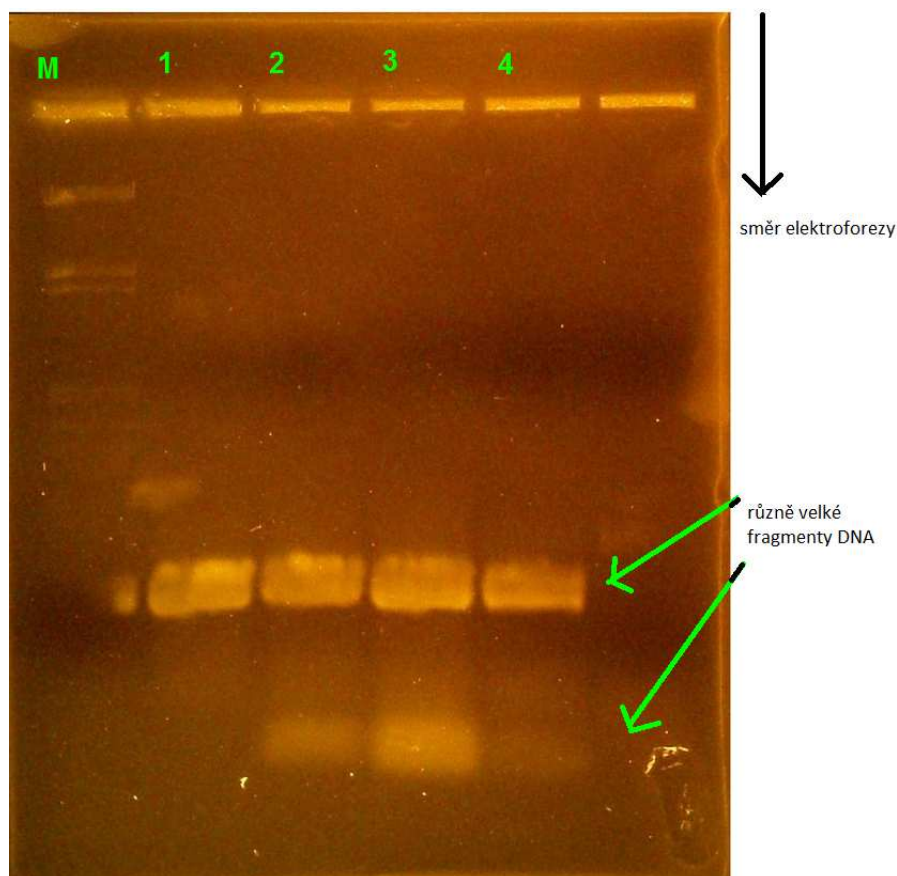
- ❖ Pro zjištění čistoty vzorku NK se používá poměr absorbancí 260 / 280. Poměr menší než 1,75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin. V případě vyššího obsahu nečistot se provede přečištění vzorku.

5.3.2. Elektroforetická analýza DNA

Principem této metody je skutečnost, že DNA má záporných elektrický náboj a v elektrickém poli putuje k anodě (obrázek 17).

- ❖ Pufry:
 - TAE- 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, pH 8,0.

- ❖ Nejprve byla sestavena elektroforéza.
- ❖ Požadované množství agarózy (hmotnostní jednotky odpovídají objemovým) bylo v mikrovlnné troubě rozvařeno v 1x TAE na 1 % agarózu.
- ❖ Agaróza byla ochlazená na teplotu asi 50 °C, byl do ní přidán ethidium bromid na výslednou koncentraci 0,5 µg/ml.
- ❖ Na připravený gel byly nanášeny vzorky DNA a hmotnostní marker. Jako marker byla použita λ DNA štěpená *EcoRI*, *HindIII* (rozsah velikosti 500 bp – 20 kbp).
- ❖ Po nanesení vzorků byla DNA dělena za stálého napětí 5 V.cm⁻¹. Ke vzorečku se přidává směs bromfenolové modři (putuje přibližně stejně rychle jako fragment DNA velký 250 bp) a xylen cyanolu (putuje přibližně stejně rychle jako fragment DNA velký 2,5 kbp) dále je v této barvičce obsažen glycerol a EDTA.
- ❖ Vizualizace probíhala na UV transiluminátoru při vlnové délce 320 nm.



Obrázek 17 - Příklad elektroforetické analýzy DNA. Čísla 1 – 4 označují nanášky různých vzorečků, M je marker. Různě velké fragmenty DNA jsou rozděleny na základě velikosti.

5.3.3. Štěpení plazmidu

- ❖ Do eppendorfek byla napipetována reakční směs o následujícím složení:
 - 12 µl injekční vody
 - 4 µl plazmidu (0,25µg / µl)
 - 2 µl multicore pufr (Promega)
 - 1 µl + 1 µl enzymu *EcoRI* + *KpnI* (Promega)

- ❖ Poté byla směs řádně promíchána, stočena krátce na centrifuze a vložena do cycleru, inkubace na 2 hodiny při 37 °C.
- ❖ Poté byly enzymy inaktivovány inkubací 20 minut při 65 °C.
- ❖ Výsledek byl zkontrolován pomocí agarózové elektroforézy, kdy byly očekávány proužky odpovídající relaxované formě plazmidu a vyštěpenému genu *ymxC*.

5.3.4. Izolace DNA z gelu

- ❖ Na standardní agarózovou elektroforézu byl puštěn linearizovaný plazmid (3,5 µg) a PCR produkt (amplifikace genu *rpoE*), jak byly připraveny v předchozích krocích.
- ❖ Po vizualizaci na UV lampě byly skalpelem vyříznuty příslušné proužky a vloženy do předem připravených eppendorfek a zváženy na předvážkách.

- ❖ Na samotnou izolaci se používá QIAquick Gel Extraction Kit od firmy QIAGEN. Preparace je založena na afinitní chromatografii, kdy se DNA váže na silikagelové kuličky v prostředí chaotropních solí.

- ❖ Do eppendorfky 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).
- ❖ Ke směsi byl přidán izopropanol 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 nanášeno 0,5 ml pufru QG, který byl centrifugován 1 minutu při 12 500 x g.
- ❖ Na kolonku bylo nanášeno 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 eppendorfky.
- ❖ DNA byla z membrány eluována 30 µl pufru EB, který byl centrifugován do připravené eppendorfky.

- ❖ Úspěšnost izolace byla opět prověřena standardní agarózovou elektroforézou.

5.3.5. Defosforylace plazmidu

Defosforylace plazmidu byla provedena z důvodu, aby se po přidání ligázy nespojovaly konce plazmidu.

- ❖ Reakční směs obsahovala:
 - 1µl enzymu SAP – „*shrimp alkaline phosphatase*“ (Promega)
 - 1µl 10 x SAP pufr (Promega)
 - 6µl plazmidové DNA
 - 2µl injekční vody
- ❖ Reakce probíhá 6 hodin při 37 °C. Zastavení reakce probíhá při 65 °C, 20 minut.

5.3.6. Štěpení PCR produktu

Pro přípravu adhezních konců fragmentu DNA s genem *rpoE* bylo provedeno štěpení pomocí restričních enzymů.

❖ Reakční směs obsahovala:

- 0,5μl *EcoRI* (Takara) a 0,5 μl *KpnI* (Amersham)
- 1μl 10 x multicore pufr (Promega)
- 6μl DNA
- 2μl injekční vody

❖ Reakce probíhá 6 hodin při 37 °C. Zastavení reakce probíhá při 65 °C, 20 minut.

5.3.7. Ligace

Ligace připravených PCR produktů s defosforylovaným plazminem.

❖ Reakční směs obsahovala:

- 2 μl defosforylovaného plazmidu
- 1 μl PCR produktu štěpeného *EcoRI* a *KpnI* (Takara)
- 1 μl 10x ligační pufr (Takara) – obsahuje ATP
- 1 μl ligázy T4 (Takara)
- 5 μl injekční vody

❖ Reakce probíhá 12 hodin při 16 °C.

5.3.8. Transformace buněk *E. coli* DH5 α

Tento krok slouží k amplifikaci plazmidu s úspěšně vloženým genem *rpoE*. Transformace byla prováděna metodou tepelného šoku.

- ❖ Kompetentní buňky uchovávané v - 80 °C byly roztáty v ledové lázni .
- ❖ Ligační směs byla rozpipetována do vychlazených (0 °) eppendorfk. Jako kontrola účinnosti selekčního antibiotika byla použita reakce bez přídavku plazmidu a jako kontrola úspěšnosti ligace byla do jedné eppendorfky přidán jen defosforylovaný plazmid. Do každé eppendorfky bylo připipetováno vždy 200 μ l kompetentních buněk. Směsi byly inkubovány 30 minut v ledové lázni.
- ❖ Poté byly eppendorfky přemístěny na 90 vteřin do 42 °C, poté na 5 minut do ledové lázně.
- ❖ Do každé eppendorfky bylo přidáno 1 ml média LB, směs byla třepána 1 hodinu v 37 °C.
- ❖ Buňky byly krátce centrifugovány, supernatant vylit a sediment resuspendován ve zbytku média, který stekl zpět ze stěn eppendorfky.
- ❖ Buňky byly rozetřeny na misky se selekčním antibiotikem (ampicilin) a inkubovány 12 hodin ve 37 °C.

5.3.9. Izolace plazmidové DNA z *E. coli* DH5 α

Minipreparace

Touto metodou získaná plazmidová DNA slouží pro ověření sekvencí transformovaných konstruktů. K izolaci byl použit QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy QIAGEN. Principem metody je adsorpce DNA na silikagel při vysoké koncentraci solí. Plazmidová DNA je z kolonky eluována při nízké koncentraci solí.

- ❖ Jednou kolonií vyrostlou na misce s ampicilinem (úspěšná transformace plazmidem se zaligovaným genem *rpoE*) bylo inokulováno 7 ml média LB s ampicilinem (konečná koncentrace 100 µg/ml). Následovala inkubace 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 (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, 100 µg / ml RNÁza A) a převeden do eppendorfky.
- ❖ Bylo přidáno 250 µl pufru P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS), směs byla promíchána a inkubována 2 minuty na ledu.
- ❖ Lyze byla zastavena přidáním 350 µl pufru N3, směs byla 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, následovala centrifugace (12 000 x g, 1 minutu, 4 °C).
- ❖ Prošlý roztok byl přepipetován na kolonku a znovu centrifugován.
- ❖ Kolonka s navázanou plazmidovou DNA byla přečištěna 1 x 0,5 ml pufru PB a 2 x 1 ml pufru PE.
- ❖ Zbytky roztoků byly z kolonky odstraněny pomocí centrifugace (1 min).
- ❖ Plazmidová DNA byla z kolonky eluována nanesením 30 µl pufru EB.
- ❖ Následovala sekvenační reakce.
- ❖ Úspěšnost izolace byla kontrolována restričním štěpením.

Midipreparace

Touto metodou byla získávána plazmidová DNA pro další pokusy, na rozdíl od Minipreparace je výsledný vzorek plazmidové DNA čistější a je ho více. Midipreparace byla prováděna pomocí soupravy QIAfilter Plasmid Midi Kit od firmy QIAGEN. Principem této metody je iontová chromatografie. Plazmidová DNA je na kolonce vychytávána na resinové částice při nízké koncentraci solí a je z kolonky eluována vysokou koncentrací solí.

- ❖ Buňkami z glycerínové konzervy (sekvenční reakcí ověřené klony) bylo inokulováno 7 ml média LB s ampicilinem (konečná koncentrace 100 µg/ml). Následovala inkubace 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 ve 4 ml pufru P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNáza).
- ❖ Byly přidány 4 ml pufru P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) a roztok byl promíchán.
- ❖ Byly přidány 4 ml pufru P3 (3 M octan draselný, pH 5,5).
- ❖ 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 pufru QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % izopropanol), 0,15 % Triton X-100).
- ❖ Kolonka byla samospádem promyta 2 x 10 ml pufru GC.
- ❖ Plazmidová DNA byla z kolonky eluována 5 ml pufru QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 8,5, 15 % izopropanol) do falkonky.
- ❖ K eluátu bylo přidáno 3,5 ml izopropanolu.
- ❖ Roztok byl centrifugován při 9 000 x g, 40 min, 4 °C.
- ❖ Supernatant byl slit, pelet plazmidové DNA opláchnut vychlazeným 70% ethanolem a usušen ve vakuu.
- ❖ Pelet byl rozpuštěn v 600 µl injekční vody a výsledný roztok byl přečištěn precipitací etanolem.
- ❖ Úspěšnost izolace byla prokázána metodou restrikčního štěpení.

5.3.10. Precipitace plazmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného

Tento krok slouží k přečištění izolované DNA

- ❖ 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. Směs byla inkubována 10 minut v – 80 °C.
- ❖ Plazmidová DNA byla centrifugována 15 minut při 14000 x g, při 4 °C.
- ❖ Sediment byl opláchnut vychlazeným 70 % ethanolem, usušen v exikátoru a rozpuštěn v injekční vodě.

5.3.11. Analýza plazmidové DNA restrikčním štěpením

Princip této metody je ten, že u úspěšně zkonstruovaného plazmidu po jeho štěpení pomocí specifických restrikčních enzymů budou na agarózové elektroforéze patrné proužky očekávané velikosti.

- ❖ Reakční směs obsahuje:
 - 13 µl injekční vody
 - 3 µl plazmidu
 - 2 µl 10 x multicore pufr (Promega)
 - 1 µl + 1ul enzymu *EcoRI* + *KpnI* (Promega)

- ❖ Reakce probíhala 2 hodiny v 37 °C, byla ukončena inkubací 20 minut v 65 °C.

5.3.12. 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 v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). K sekvenaci byly použity tyto primery: Primery s označením 194, 195.

- ❖ Reakční směs:
 - 2 µl premixu BigDye Terminátor
 - 1 µl forward nebo reverse primeru (3 -10 pmol)
 - 7 µl plazmidové DNA z minipreparace vybraných kolonií

- ❖ Směs byla vložena do cycleru a reakce probíhala v cyklu:
 - 96 °C 10 sec. - tání DNA
 - 45 °C 5 sec. - nasedání primerů
 - 60 °C 4 min – polymerace
 - celkově proběhlo 35 cyklů

- ❖ Poté bylo do reakce přidáno 10 µl 3 M octanu sodného, 80 µl vody, 5 µg glykogenu. Následně bylo přidáno 300 µl 96 % etanolu.

- ❖ Vzorek byl centrifugován 20 minut při 17000 x g a 4 °C.

- ❖ Pelet byl opláchnut 250 µl 70 % ethanolu a centrifugován.

- ❖ Pelet byl vysušen v exikátoru 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 a uschovány při – 80 °C.

5.3.13. Glycerínová konzerva

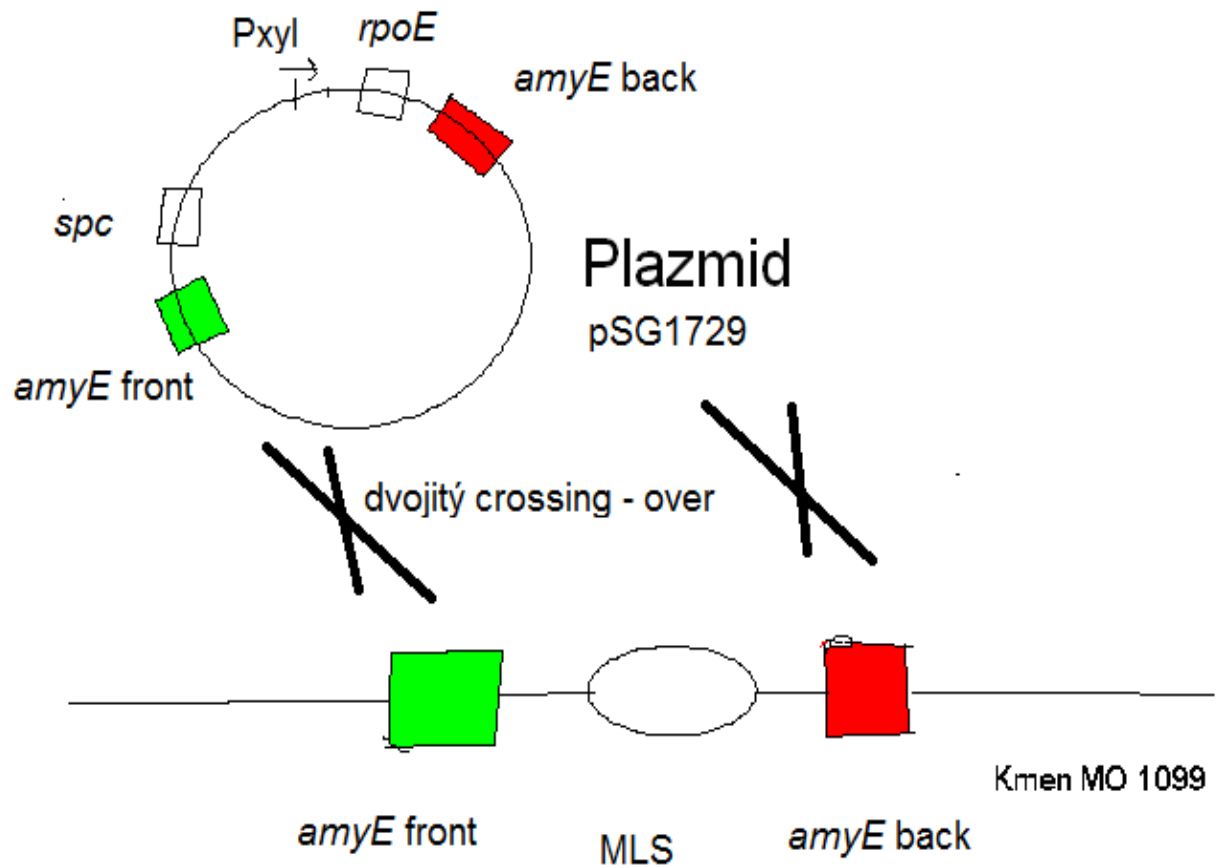
Slouží pro dlouhodobé uchovávání bakterií v – 80 °C .

- ❖ Získá se tak, že se 850 µl buněčné kultury narostlé v médiu LB přidá k 150 µl glycerolu.

5.3.14. Transformace *B. subtilis* MO1099

Schéma integrace konstruktů do chromosomu viz obrázek 18.

- ❖ 5 µl plazmidové DNA byly přidány k 100 µl buněk z glycerínové konzervy, které byly nechány roztát při 37 °C. Směs byla poté inkubována 30 minut ve 37 °C a poté vyseta na misku s médiem LB a selekčním antibiotikem (viz dále).
- ❖ Ověření transformace: Pokud došlo k úspěšné transformaci a integraci konstruktů do místa *amyE* chromosomu *B. subtilis*, lze tyto buňky selektovat na spektinomycin (100 µg / ml), buňky obsahující integrační kazetu jsou rezistentní. Integraci do místa *amyE* lze ověřit pomocí techniky „*replica plating*“, kdy kolonie narostlé na médiu se spektinomycinem budou přetisknuty na médium obsahujícím erythromycin (0,5 µg / ml), linkomycin (25 µg / ml). Zde by kolonie vyrůst neměly, jelikož by při úspěšné transformaci genu *rpoE* do místa *amyE* měly být tímto konstruktem nahrazeny geny pro MLS rezistenci (obrázek 18).
- ❖ Z úspěšných transformantů byly udělány glycerínové konzervy.
- ❖ Úspěšnost integrace do místa *amyE* byla ověřena sekvenací.



Obrázek 18 - Schéma integrace konstruktů do místa $amyE$. Úspěšnou integrací bakterie ztratí MLS rezistenci a získá rezistenci na spektinomycin (spc).

5.3.15. Izolace chromozomální DNA z *B. subtilis*

Izolace proběhla pomocí kitu s názvem Purification of total DNA from animal blood or cells s úpravou pro G+ bakterie (QIAGENE).

- ❖ Noční kultura rostoucí v 20 ml média LB se spektinomycinem byla centrifugována 10 minut při 5000 x g. Supernatant byl slit.
- ❖ Pelet byl resuspendován v 180 µl lyzačního pufru (obsahuje lysozym – 20 mg / ml).
- ❖ Inkubováno 45 minut při 37 °C.
- ❖ Přidáno bylo 25 µl proteinasy K a 200 µl pufru AL, inkubováno při 56 °C po 30 minut. Poté bylo přidáno 200 µl 96% ethanolu.
- ❖ Směs byla nanášena na speciální kolonku. Centrifugováno při 6000 x g 1 minutu, protečená frakce byla slita.
- ❖ Na kolonku bylo poté nanášeno 500 µl pufru AW1 a opět centrifugováno 1 minutu a protečená frakce slita.
- ❖ Na kolonku bylo nanášeno 500 µl pufru AW2 a opět centrifugováno 1 minutu a protečená frakce byla slita.
- ❖ Poté byla kolonka umístěna do čisté eppendorfky, připipetováno bylo 200 µl AE elučního pufru. Inkubace směsi probíhala 1 minutu a poté byla směs 1 minutu centrifugována.
- ❖ Jako kontrolu úspěšnosti izolace bylo puštěno 5 µl směsi na agarózovou elektroforézu.

5.3.16. PCR chromozomální DNA

Pro amplifikaci genu *rpoE* byly použity primery uvedené v kapitole 7.1.2.a. Pro ověření úspěšnosti integrace *rpoE* genu do místa *amyE* chromosomu *B. subtilis* byly použity primery specifické pro úsek DNA ležící na plazmidu mezi místy rekombinace.

❖ Reakční směs:

- DNA – 5 µl
- Primery – á 1 µl
- Voda – 14 µl
- enzym Tth polymeráza (Biotools) – 1 µl
- pufr 10 x – 2,5 µl
- dNTP – á 0,5 µl

❖ Poté byla směs přemístěna do cycleru:

- 96 °C 10 sec. - tání DNA,
- 45 °C 5 sec. - nasedání primer ů,
- 60 °C 4 min – polymerace,
- celkově proběhlo 35 cyklů.

❖ Pro ověření integrace genu *rpoE* do místa *amyE* následovalo puštění reakční směsi na agarózovou elektroforézu, následovala extrakce DNA z gelu a sekvenační reakce.

❖ Z amplifikovaného genu *rpoE* jsem pustil alikvót na standardní agarózovou elektroforézu pro kontrolu úspěšnosti amplifikační reakce.

5.3.17. Nadprodukce proteinu δ

- ❖ Noční kulturou bylo zaočkováno 5 litrů média LB. Kultura se nechala rozrůst (do optické denzity $OD_{600} = 0,5$) a poté byla exprese proteinu δ indukována přidávkem xylózy do výsledné koncentrace 0,4%. Kultura se nechala růst do optické denzity $OD_{600} = 0,1$.

- ❖ Poté byla kultura centrifugována při 10000 x g, 1 hodinu, 4 °C, supernatant byl slit.

5.3.18. Izolace proteinu δ metodou afinitní chromatografie

Pro nadprodukci proteinu δ byl použit kmen *B. subtilis* #866. Principem této metody je interakce chelatačního nosiče (Ni^{2+}) s histidinovou kotvou.

- ❖ Pufry:
 - Pufř P: 1 litr obsahuje 60 ml NaCl, 50 ml Na_2HPO_4 , 50 ml glycerolu, 340 ml vody

- ❖ Pelet byl resuspendován v 80 ml 2 x koncentrovaného pufřu P.

- ❖ Proběhlo stočení na centrifuze při 10000 x g, 20 minut, 4 °C, supernatant byl slit.

- ❖ Pelet opět resuspendován, tentokrát v 60 ml pufřu P.

- ❖ Sonikace proběhla v deseti 10 – vteřin trvajících cyklech vždy s minutovou pauzou a to na ledu.

- ❖ Poté je směs stočena na centrifuze při 12000 x g, 4 °C, 15 minut.

- ❖ Promytí nikl – agarózových kuliček (Ni – NTA). Ni - NTA o objemu 5 ml byly centrifugovány 2,5 minuty při 15000 x g, supernatant slit, bylo přidáno 5 ml pufřu P a znovu centrifugováno, supernatant slit, opět bylo přidáno 5 ml pufřu P.

- ❖ K supernatantu po sonikaci přidáme 2,5 ml promytých Ni – NTA.

- ❖ Směs se míchá 60 minut při 4 °C.
- ❖ Poté je směs centrifugována - 2 minuty při 5000x g. Většina supernatantu se odstraní, ve zbytku se pelet resuspenduje.
- ❖ Připravíme PolyPrep kolonu (nanesu 5 ml pufru P a nechám protéct)
- ❖ Naneseme směs na PolyPrep kolonku.
- ❖ Promývání na kolonce 2 x 30 ml pufru P, poté 2 x 30 ml pufru P s přidavkem 30 mM imidazolu.
- ❖ Eluci provádíme 2 x 10 ml pufru P s přidavkem 400 mM imidazolu. Jímáme frakce vždy po 1 ml.
- ❖ Následuje dialýza do fosfátového pufru.
- ❖ Koncentraci proteinu v jednotlivých frakcích určíme pomocí metody Bradfordové.

5.3.19. Izolace proteinu δ metodou ionexu a izoelektrické precipitace.

Principem metody je vysrážení bílkoviny o daném izoelektrickém bodu (pI) z roztoku tím, že přidáme roztok o stejném pH jako má daná bílkovina.

- ❖ Pufry:
 - Lyzační pufr: 100mM bis-tris pH 6,0, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 1mM mercaptoethanol, 1mM PMSF
 - Pufr A: 100mM bis-tris pH 6,0, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 1mM merkaptoethanol, 1mM PMSF
 - Eluční pufr: pufr A + 0,1M – 1M NaCl, koncentrace stoupá po 0,1M
 - DB-0 pufr: 50 mM Tris – Cl, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT

- ❖ Pelet byl resuspendován v 10 ml lyzačního pufru.
- ❖ Poté byla směs centrifugována 20 minut při 16000 x g, 4 °C, supernatant byl slit, k peletu se přidalo 20 ml lyzačního pufru.
- ❖ Sonikace 13 x 10 vteřin na ledu, mezi jednotlivými sonikacemi byla vždy 1 minutu pauza. Centrifugace 16000 x g, 4 °C, 15 minut.
- ❖ Mezitím se ekvilibrovala vazebná matrix (gel) – 1 g prášku DE52 (Whatman) a 10 ml pufru A. Promícháno a necháno ekvilibrovat 10 minut.
- ❖ Supernatant byl přidán k 190 ml pufru A a k tomu byla přidána připravená ekvilibrovaná matrix.
- ❖ Roztok byl pomalu promícháván po 5 hodin ve 4 °C. Poté byla směs ve falkonce ponechána stát 12 hodin při 4 °C, gel s navázaným proteinem mezitím sedimentoval.
- ❖ Pipetmanem byla odstraněna většina tekutiny nad sedimentovaným gelem.
- ❖ Směs byla dána na PolyPrep kolonku, propláchnutou pufrům A.
- ❖ Nanesená směs byla promývána 70 ml pufru A.
- ❖ Eluce probíhala pomocí 10 x 5ml elučního pufru o koncentraci NaCl 0,1M – 1M, koncentrace stoupá po 0,1M. Frakce jímány po 1 ml.
- ❖ Množství proteinu je stanoveno podle metody Bradfordové.
- ❖ K vybraným frakcím (obsahující daný protein) je přidáno 50 mM acetátu sodného (pH 3,6), centrifugováno 5 minut při 17000 x g, 4 °C.
- ❖ Opatrně je slit supernatant, pelety jsou rozpuštěny v 10 ml DB-0 pufru.
- ❖ Nechá se pomalu rozpustit 12 hodin na ledě.

5.3.20. Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Principem této metody je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu.

- ❖ K 1 µl vzorku přidám 1 ml činidla Bradfordové.
- ❖ Vytvořím si kalibrační křivku pomocí známých koncentrací BSA s přídatkem činidla Bradfordové.
- ❖ Srovnám s hodnotami získanými z jednotlivých frakcí a určím koncentraci proteinu v roztoku. Měření provádím na fotospektrometru při A_{595} .
- ❖ Získané hodnoty porovnám pomocí programu Microsoft Excel.

5.3.21. Dialýza – přečištění proteinového izolátu

Smyslem této procedury je výměna pufru (hlavně imidazolu). Principem je selekční velikost pórů dialyzačního střeva – malé molekuly mohou volně procházet, velké nikoli.

- ❖ Dialyzační střevo je navlhčeno v dialyzačním pufru (20mM fosfátový pufr, pH 6,6 + 10 mM NaCl).
- ❖ Injekční stříkačkou je do něj napuštěna příslušná frakce a střevo je uzavřeno svorkou.
- ❖ Dialýza probíhá 2 x 6 hodin při 4 °C v dialyzačním pufru.
- ❖ Vzoreček je poté vysát injekční stříkačkou a umístěn do eppendorfky.

5.3.22. Polyakrylamidová elektroforéza proteinů v prostředí SDS (SDS-PAGE)

K elektroforetické analýze proteinů byla zvolena metoda vertikální polyakrylamidové elektroforézy v prostředí SDS (SDS-PAGE) za použití zaostřovacího a separačního gelu. Proteiny byly děleny podle své molekulové hmotnosti.

❖ Pufry:

- Vzorkový pufr: složení pro objem 8 ml: 1 ml 0,5 M Tris-HCl, 0,8 ml glycerol, 1,6 ml 10% SDS, 0,2 ml 0,05% Bromfenolová modř, 1,2 ml 2-merkaptoethanolu, 3,2 ml dH₂O

❖ 5 µl vzorku bylo smícháno s 5 µl vzorkového pufru a inkubováno 5 minut při 95 °C.

❖ 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

❖ Do směsi bylo přidáno 35 µl 10 % APS a 4,5 µl TEMED. Směs byla injekční stříkačkou s jehlou nalita mezi skla, a to 1,5 cm pod hranici menšího skla. Nalité gely byly převrstveny dH₂O a nechány ztuhnout.

❖ 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.
- ❖ Elektroforéza proběhala při napětí 180 V. Průběh elektroforézy byl sledován podle putování bromfenolové modři.
- ❖ Gely byly dány do roztoku Coomassie Brilliant Blue (25 % methanol; 10 % kyselina octová) a za stálého míchání barveny alespoň 1 hodinu.
- ❖ Gely byly odbarvovány v odbarvovacím roztoku.
- ❖ Následně byly převedeny do digitální podoby.

5.3.b. Vliv proteinu δ na regulaci iniciace transkripce *rrnB* P1 pomocí [iNTP]

5.3.23. Zjištění intracelulární hladiny GTP

Substrátem pro tvorbu GTP je mimo jiné i H_3PO_4 . Pokud je radioaktivně značená (pomocí ^{32}P , poločas rozpadu 14,3 dne) a přidána jako substrát do média (s aktivitou 100 μCi / ml) a inkorporuje se do GTP, lze jej poté vizualizovat pomocí zachycení emitovaného β^- záření absorpční fólií. Z intenzity jednotlivých bodů lze určit i kvantitu GTP.

- ❖ Noční kultura je přeočkována do 2 ml příslušného média na výchozí optickou densitu ($\text{OD}_{600} = 0,03$). Růsty se provádí ve dvou paralelách, v jednom je vždy dané médium MOPS a daný kmen bez přídavku radioaktivního H_3PO_4 . V tomto médiu provádím odběry pro měření optické denzity.

- ❖ Kultura roste za třepání při 37 °C do dosažení OD_{600} rovnu 0,3. Při dosažení této optické denzity je proveden odběr 50 μl kultury.

- ❖ 50 μl kultury je přidáno rychle k 50 μl 11,5 M vychlazené kyseliny octové. Krátce zvortexováno. Nechá se stát 20 minut na ledu a poté vzorek zmražen na - 20 °C.

- ❖ Vzorky dále zpracovávám metodou TLC.

5.3.24. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Principem této metody je dělení látek na základě rozdílného unášení pomocí mobilní fáze.

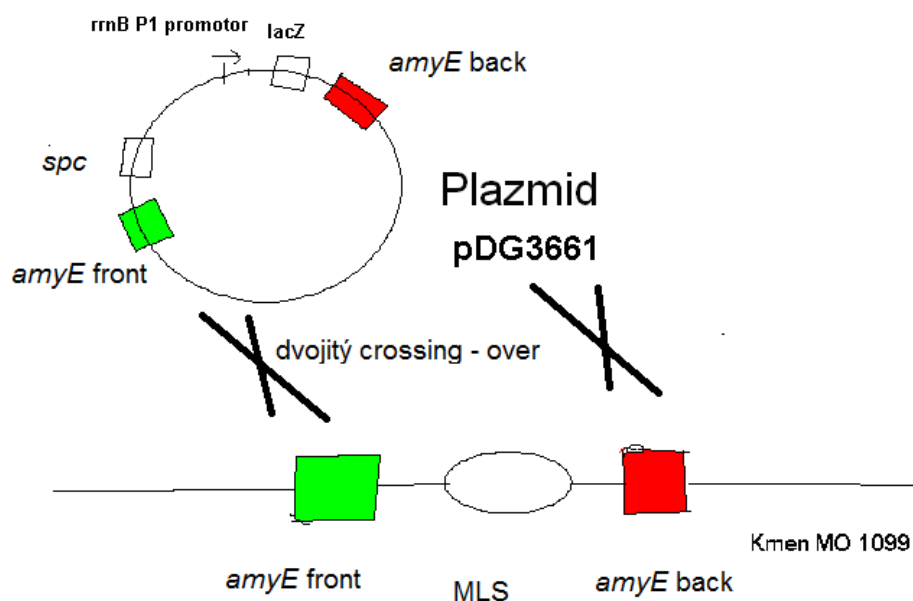
- ❖ TLC desky nejdříve opláchnu v destilované vodě a nechám uschnout.
- ❖ Na TLC desky nanesu pipetmanem 4 μ l příslušného vzorečku, alespoň 1 cm od okraje (vzoreček předtím krátce centrifuguji). Jako marker nanesu 4 μ l neradioaktivního GTP. Nechám zaschnout.
- ❖ Do kádinky naliju do výšky 0,8 cm 1,5 M nebo 0,85 M roztok KH_2PO_4 (mobilní fáze). Vložím suché TLC desky, zadělám neprodyšně vršek kádinky. Nechám vzlínat přibližně 1 hodinu.
- ❖ TLC desky vyjmu, nechám usušit. Zabalím do potravinářské folie a vložím do expoziční kazety, nechám exponovat 12 hodin.
- ❖ Vyhodnocení provádím měřeními intenzit jednotlivých bodů na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikuji pomocí softwaru Bio-Rad Quantity One.

5.3.25. Zjišťování intracelulární aktivity promotoru *rrnB* P1

Promotor *rrnB* P1 zřúzovaný s genem *lacZ* byl zintegrován pomocí vektoru pDG3661 do chromosomu *B. subtilis* a to do místa *amyE* u kmenů #642 ($\Delta rpoE$) a #7554 (wt) (obrázek 19).

Aktivita je sledována pomocí detekce genu *lacZ* metodou „*primer extension*“, kdy je reverzní transkripce namnožen specifický úsek genu *lacZ*. Porovnávají se kvantita cDNA z jednotlivých vzorků. Pro přesnější vyhodnocení se přidává ke vzorku tzv. recovery marker (RM). Jedná se o RNA získanou z kmene *B. subtilis* RLG6943. Transkripce této RNA probíhá z templátu, který obsahuje stejnou sekvenci jako primer použitý pro reverzní transkripce, ale daný templát má na 5' konci přídavnou sekvenci – je tedy delší, na elektroforéze putuje pomaleji. RM se přidává o známé koncentraci a postihuje odchylky při individuálních měřeních, dané například degradací RNA. Sekvence primeru (BgaIR) použitého při reverzní transkripce je následující:

5'-CAGTAACTTCCACAGTAGTTCACCAC-3'



Obrázek 19 - Schéma integrace pDG3661 do místa *amyE* *B. subtilis*.

5.3.26. Příprava radioaktivně značeného primeru

Radioaktivně značený primer slouží pro vizualizaci cDNA vzniklé metodou primer extension. Pomocí enzymu T4 polynukleotid kinázy dojde k nahrazení terminálního fosfátu primeru fosfátem, který obsahuje ^{32}P (s aktivitou 100 μCi / ml).

- ❖ Reakční směs:
 - 8 μl injekční vody
 - 2 μl 10 x T4 polynukleotid kinázového pufru (Takara)
 - 2 μl B – gal R primer (10 pmol / μl)
 - 6 μl ATP, jehož γ fosfát obsahuje ^{32}P (s aktivitou 100 μCi / ml)
 - 2 μl enzymu T4 deoxynukleotid kinázy (Takara)

- ❖ Směs se inkubuje 1 hodinu při 37 $^{\circ}\text{C}$.

- ❖ Nezainkorporované radioaktivně značené ATP je odstraněno pomocí QIA Quick nucleotide removal kit (QIAGEN).

- ❖ 20 μl směsi s radioaktivně značeným primerem bylo přidáno k 200 μl pufru PN.
- ❖ Směs byla přenesena na kolonku, centrifugace 1 minutu. Proteklá kapalina slita.
- ❖ Bylo přidáno 500 μl pufru PE, 1 minutu centrifugováno, proteklá kapalina slita. Tento krok se ještě jednou zopakoval.
- ❖ Kolonka byla přemístěna do eppendrofky, na ni bylo nanášeno 20 μl EB pufru pro eluci. Ponecháno 1 minutu odstát, poté 1 minuta centrifugace.

5.3.27. Extrakce RNA fenolem a chloroformem

Růsty bakteriálních kultur *B. subtilis*:

- ❖ Divoký kmen (#7554) z glycerínové konzervy je rozetřen na LB misky s chloramfenikolem (5 µg / ml), *ΔrpoE* (kmen #642) ještě s kanamycinem (5 µg / ml). Nechá se růst 12 hodin při 37 °C.
- ❖ Kultury jsou přeočkovány z misek LB na misky s chudým médiem MOPS, nechá se růst 24 hodin při 37 °C. Zároveň jsou kultury přeočkovány z předchozích misek LB na misky s médiem LB jako v předchozím případě a nechány růst 12 hodin při 37 °C (důvodem je zamezení sporulace). Tyto kultury jsou poté přeočkovány na bohaté médium MOPS a nové LB médium a nechány růst 12 hodin při 37 °C.
- ❖ Poté byla provedena inokulace noční kultury obou kmenů do chudého a bohatého média MOPS a do média LB o objemech 7,5 ml na výchozí optickou denzitu OD₆₀₀ rovnu 0,03. Růst probíhal do optické denzity OD₆₀₀ = 0,3, kdy byly provedeny odběry 2 ml kultury pro fenol – chloroformovou extrakci.

Samotná fenol chloroformová extrakce:

- ❖ Pufry:
 - Sonikační pufr: 50 mM Tris–HCl pH 8,0, 500 mM LiCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 5% SDS
- ❖ 2 ml kultury byly přidány ke směsi 3 ml fenolu a 3 ml chloroformu a 0,5 ml sonikačního pufru. Bylo přidáno 100 µl Recovery markeru (RM). Protřepáno.

- ❖ Poté proběhla 1 minutu sonikace. Bylo přidáno 5 ml TK vody, směs byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě odstát. Centrifugace 10000 x g, pokojová teplota, 10 minut.
- ❖ Vodná fáze byla odpipetována do nové falkonky s 3 ml chloroformu a 3 ml fenolu, protřepáno, směs byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě, poté proběhla centrifugace. Tento krok jsem opakoval ještě jednou.
- ❖ 4 ml vodné fáze bylo odpipetováno k 9,68 ml 96% etanolu s 400 μ l 3M kyseliny octové, pH 5,2, protřepáno a poté zamraženo do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 1 hodinu.
- ❖ Směs centrifugována při 10000 x g, 30 minut. Odstranění supernatantu. Na ledu přidáno do falkonky 400 μ l injekční vody, protřepáno. Směs nepipetována do eppendorfky a přidáno 40 μ l kyseliny octové (3M, pH 5,2), dále 968 μ l 96% etanolu, směs promíchána. Poté byla směs přemístěna na 10 minut do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ❖ Centrifugace 20 minut, 12000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, dekantace supernatantu.
- ❖ Opláchnutí 70% etanolem.
- ❖ Centrifugace 5 minut, supernatant slit.
- ❖ Usušení v exsikátoru.
- ❖ Suchý pelet rozpuštěn v 30 μ l injekční vody, ponecháno stát 3 minuty a ledu.

5.3.28. Primer extension

❖ Reakční směs:

- 4 μ l injekční vody
- 2 μ l 5 x pufru pro reverzní transkriptázu (Promega)
- 1 μ l radioaktivně značeného primeru (BgalR)
- 3 μ l RNA

❖ Puštěno 1 hodinu na cycleru:

- 80 $^{\circ}$ C po 5 minut
- 79 $^{\circ}$ C po 1 minutu
- každý další krok klesá teplota o 1 $^{\circ}$ C, doba kroku vždy 1 minuta

❖ Poté k reakci přidána tato směs:

- 3 μ l injekční vody
- 3 μ l 5 x pufru 2 μ l 5 x pufru pro reverzní transkriptázu (Promega)
- 6 μ l dNTP (každý 2,5 mM)
- 2 μ l DTT (0,1 M)
- 1 μ l M-MLL reverzní transkriptázy (Promega)

❖ Reakci nechána proběhnout v cycleru: 42 $^{\circ}$ C po 30 minut.

- ❖ Pro zastavení reakce přidám do směsi 25 μ l STOP roztoku (formamid). Směs promíchám, uchovávám v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.29. Polyakrylamidová elektroforéza cDNA

Je použita metoda vertikální polyakrylamidové elektroforézy. cDNA je dělena podle své velikosti.

- ❖ Pufry:
 - TBE – (Tris/Borate/EDTA), na 1 litr 5 x pufry je třeba - 53 g Tris, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)
- ❖ Byla sestavena aparatura na elektroforézu.
- ❖ Namíchán roztok pro separační gel – 35 ml 7% AA, bis AA (v objemu 1 l je 100ml pufry TBE, 420,42 g urey), přidám 300 μ l 10% APS, 24 μ l TEMED. Směs byla promíchána a pipetmanem nanášena mezi skla. Poté byl vsunut hřeben.
- ❖ Po zatuhnutí gelu byl hřeben vytáhnout, nanášeny vzorky (obvykle 5 μ l s 1 μ l nanášecí barvičky – ta obsahuje bromfenolovou modř, xylen cyanol a glycerol). Elektroforéza probíhá při 180 V.

Vyhodnocení:

- ❖ Po skončení elektroforetické separace byl gel usušen a uzavřen do expoziční kazety, kde se na citlivou folii absorbuje radioaktivní záření z transkriptů.
- ❖ Primárním výsledkem byl obraz gelu v elektronické podobě, kde ozářené pásy odpovídaly jednotlivým transkriptům. Jejich intenzity byly měřeny na přístroji Bio – Rad Molecular Imager FX. Kvantifikace proběhla pomocí programu Bio – Rad

Quantity One. Množství transkriptu bylo určeno jako intenzita příslušného proužku zmenšená o intenzitu záření pozadí. Dané intenzity byly korelovány na recovery marker, který byl do reakce přidán ve známé koncentraci a postihoval případné degradační procesy při zpracování vzorku, čímž se minimalizuje chyba experimentu.

5.3.30. Rychlost syntézy celkové buněčné RNA

V tomto experimentu je sledována rychlost, kterou buňka inkorporuje tritiem (^3H) značený uridin do RNA. Tritium má poločas rozpadu je 12,32 let a je to β zářič. RNA je zachycena speciálním filtrem (Whatman), neinkorporovaný radioaktivní uridin filtrem proteče. Množství RNA je kvantifikováno pomocí scintilace. Scintilátor je látka v níž dochází ke vzniku Čerenkova záření, například zachycením β záření pocházejícího z tritia. Toto záření lze detekovat scintilačním počítačem.

- ❖ Růsty probíhaly v bohatém médiu MOPS (s přidavkem neradioaktivního uridinu na výslednou koncentraci 0,1 mM), v objemu 4 ml. Noční kultura byla inokulována na výslednou $\text{OD}_{600} = 0,03$. Růst za třepání v 37 °C.
- ❖ Při dosažení $\text{OD}_{600} = 0,3$ byl přidán ke kultuře ^3H značený uridin (aktivita 1 mCi / ml). Kultura stále za třepání rostla v 37 °C.
- ❖ Odběry kultury následně probíhaly po 250 μl každých 5 minut.
- ❖ Odebraný vzorek jsem přidal rychle k 1 ml 10% kyselině trichloroctové (TCA) na ledu. Promíchal jsem.
- ❖ Sestavil jsem si aparaturu pro filtraci za sníženého tlaku, na ni jsem umístil filtr, na něj jsem nanesl celý objem vzorku s TCA. Propláchnul jsem 2 x 1 ml 10% TCA a 3 ml 96% etanolu.
- ❖ Filtry jsem usušil, a suché přemístil do scintilačních lahvíček s 2 ml scintilačního roztoku rothiscint (Merck) a následně byla změřena scintilace (Čerenkovo záření) v scintilačním počítači. Vyhodnocení na základě získaných dat proběhlo v programu microsoft excel.

6. Cíle diplomové práce

- 1) **Přítomnost neobvyklých nukleotidů na proteinu δ .** V předchozím projektu řešeném v laboratoři, kde jsem vypracovával svoji diplomovou práci, byla vyřešena 3D struktura proteinu δ pomocí NMR. Během těchto studií byla pozorována přítomnost neobvyklých nukleotidů (pravděpodobně cNTP) ve vzorku. Protože tento protein byl připraven nadprodukcí z *E. coli*, byla první část mé diplomové práce zaměřena na nadprodukcí proteinu δ z originálního hostitele – *B. subtilis* pro účely NMR, které mělo prokázat, zda jsou na povrchu proteinu δ přítomny neobvyklé nukleotidy i v případě je připraven z původního organismu.
- 2) **Vliv podjednotky δ na iniciaci transkripce *in vivo*.** Druhá část se věnuje zkoumání, zda se u *B. subtilis* mění hladina NTP při různých růstových rychlostech a jestli protein δ ovlivňuje regulaci iniciace transkripce z promotoru *rnnB* P1, který je senzitivní na [iNTP].

7. Výsledky a diskuse

Většina biochemických studií proteinu δ byla dosud prováděna v podmínkách *in vitro*. Tyto studie ukazují, že tento protein ovlivňuje iniciaci a terminaci transkripce a má vliv na senzitivitu RNAP k [iNTP].

Protein δ je potřeba pro správnou a přesnou práci molekulárního aparátu buňky, ale jeho přesná fyziologická role dosud není uspokojivě objasněna. Studie prováděné v systému *in vivo*, které jsou součástí této práce, mají za cíl přispět k objasnění tohoto problému.

7.1. Ověření přítomnosti neobvyklých nukleotidů vázaných na protein δ u *B. subtilis*

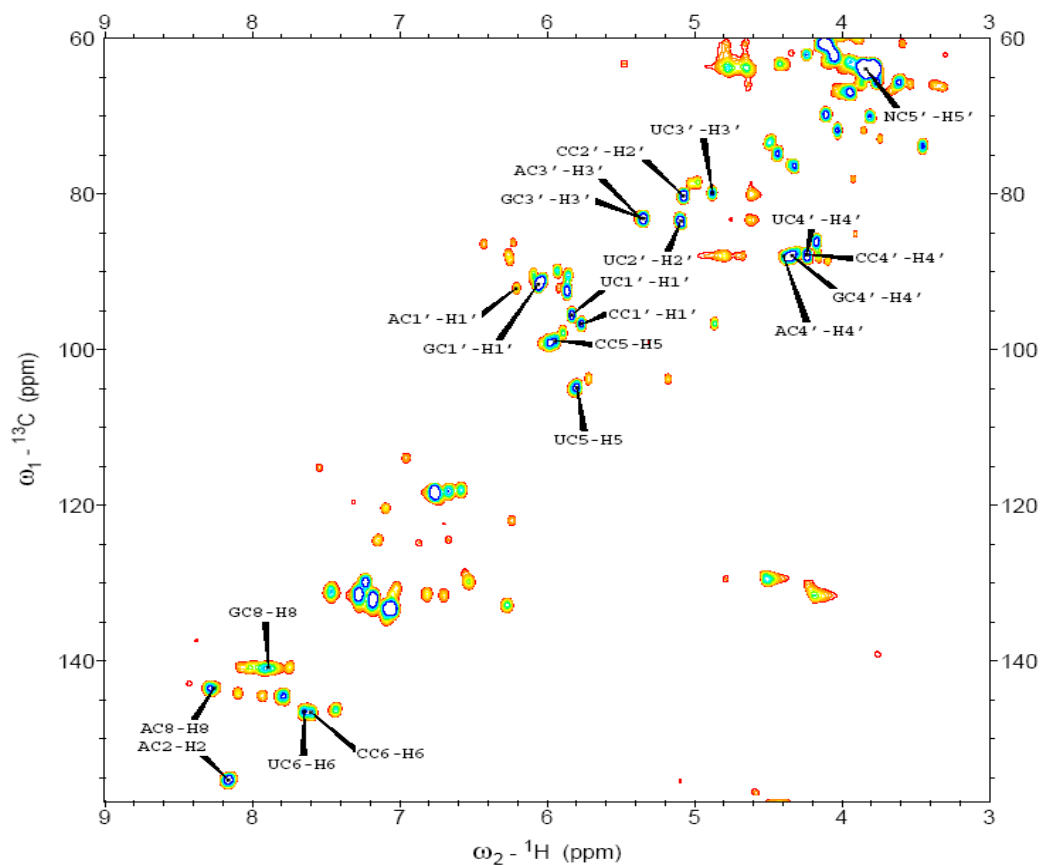
Originálním hostitelským organismem proteinu δ jsou G+ bakterie. Pro potřeby strukturních studií tohoto proteinu byla provedena nadprodukce proteinu v expresním systému *E. coli* (kmen LK22, expresní vektor - plazmid pCD2). Protein byl následně izolován metodami ionexu a izoelektrické precipitace. Takto izolovaný protein byl poslán na NMR spektroskopii (metoda HMQC- „heteronuclear multi - quantum coherence spectrum“).

Výsledky této NMR spektroskopické studie ukázaly, že k proteinu δ byly vázány určité nukleotidy, jejichž přesnou identitu nebylo možno ze stávajících dat určit (obrázek 20). Přítomnost těchto nukleotidů by mohla naznačovat případný vliv na funkci proteinu δ . Pro rozhodnutí, zda se pouštět do bližšího zkoumání této hypotézy, bylo potřeba určit, zda se tyto nukleotidy nacházejí i na povrchu podjednotky δ izolované z originálního hostitele - *B. subtilis*.

7.1.a. Experimentální strategie 1:

- 1) Nejdříve jsem provedl izolaci proteinu δ s histidinovou kotvou z již připraveného kmene *B. subtilis* metodou afinitní chromatografie.
- 2) Poté jsem provedl izolaci proteinu δ bez histidinové kotvy z mnou připraveného expresního kmene *B. subtilis* a to metodou ionexu a afinitní chromatografie.

Metody viz kapitola 5.3.a.



Obrázek 20 - Studie zaměřená na identifikaci neobvyklých nukleotidů vázajících se na protein δ izolovaný z *E. coli*. Jedná se o 2D korelace vodíku a uhlíku ve spektru ^1H , ^{13}C - HMQC. Ve spektru jsou standardně označeny atomy nukleotidů (např.: UC3'-H3' je korelace mezi atomu C3' a H3' nukleotidu, jehož bází je uracil). Jedná se o ribonukleotidy, pravděpodobně v cyklické formě (L. Žídek, osobní sdělení).

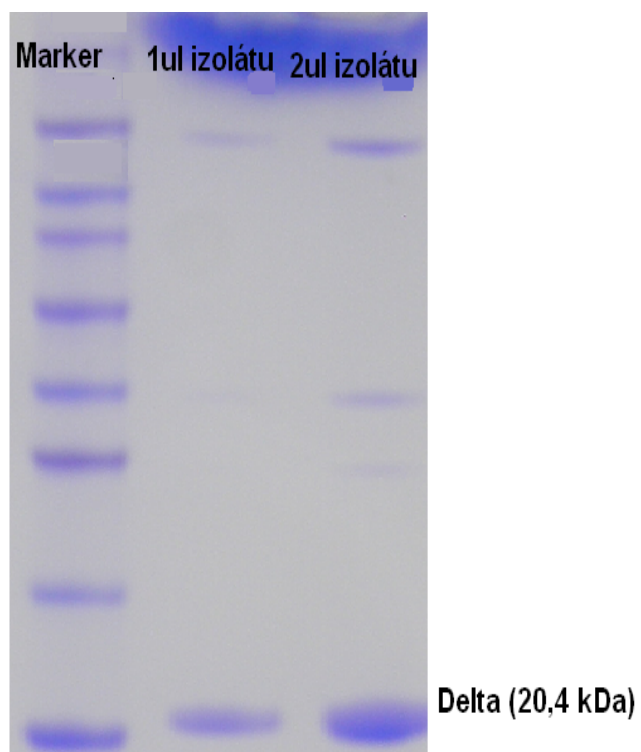
7.1.1. Příprava proteinu δ s histidinovou kotvou

Než jsem začal pracovat na tomto projektu, byl v laboratoři, kde jsem pracoval na diplomové práci vytvořen kmen *B. subtilis* (#866), který obsahoval extra kopii genu *rpoE* s histidinovou kotvou za promotorem indukovatelným xylózou. Mým prvním projektem bylo v tomto kmeni nadprodukovat protein δ a izolovat jej pomocí His – tag afinitní chromatografie.

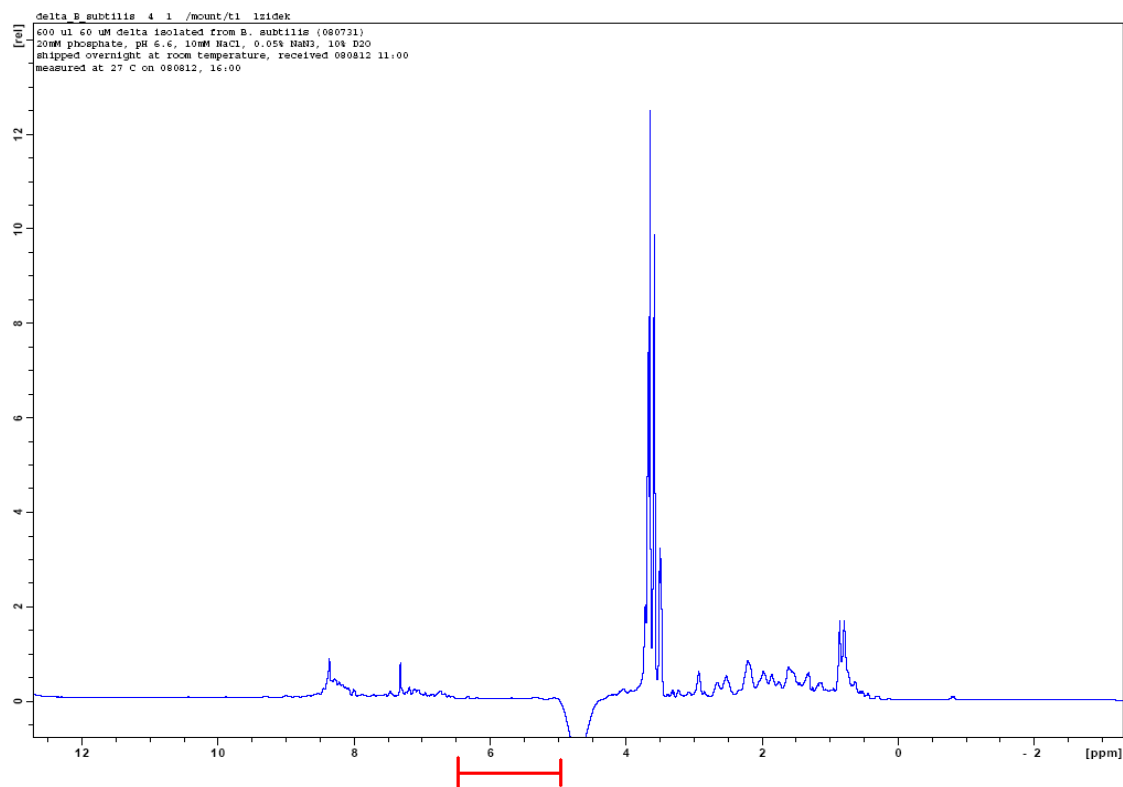
Výsledky:

Protein δ jsem připravil pomocí afinitní chromatografie s využitím kotvy His-tag (viz kapitola 5.3.18.). Dále jsem protein dialyzoval do fosfátového pufru vhodného pro měření NMR vzorku. Koncentraci proteinu jsem určil metodou podle Bradfordové (kapitola 5.3.20.). Získaná koncentrace 60 μM a množství 0,5 ml byly dostatečné pro NMR spektroskopickou analýzu (obrázek 21). Analýza NMR však neprokázala přítomnost nukleotidů v tomto vzorku. (obrázky 22 a 23). Nepřítomnost cNTP na povrchu proteinu δ izolovaného pomocí His – tag afinitní chromatografie může být způsobena touto izolační technikou.

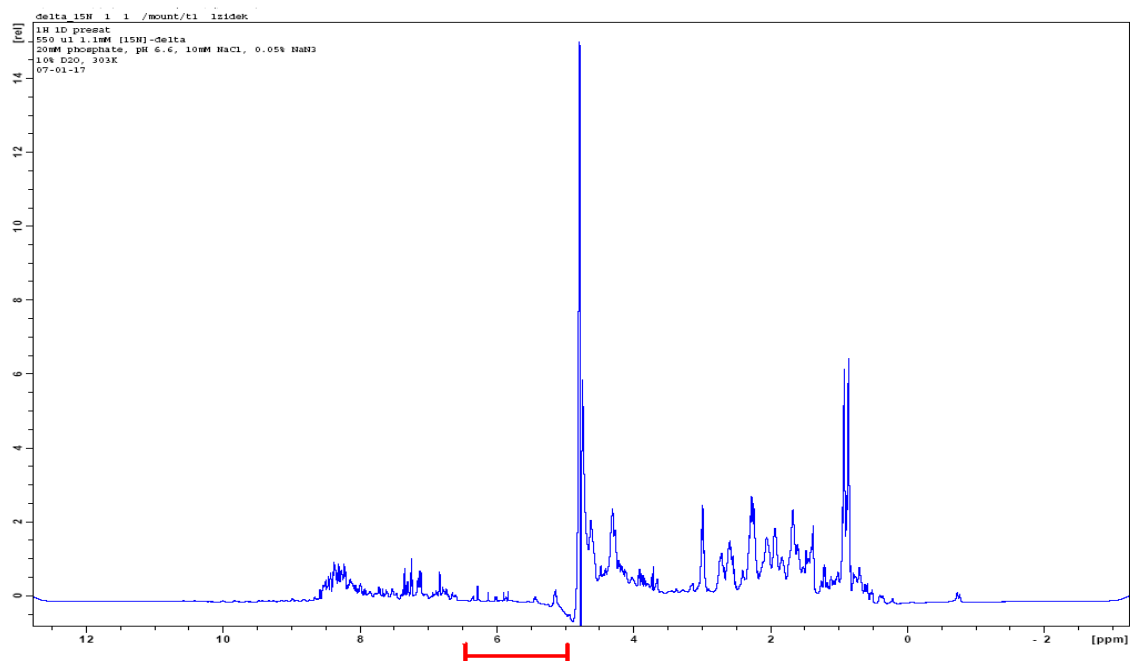
Tuto teorii podporuje i paralelně prováděný experiment (H. Šanderová, osobní sdělení), kdy byl pro strukturní účely touto metodou izolován zkrácený (celková velikost 3/4) protein δ z heterologního hostitelského organismu *E. coli*. Při NMR studii takto izolovaného proteinu opět nebyla přítomnost cNTP pozorována. Že by za tento jev byla zodpovědná chybějící 1/4 proteinu se jeví jako málo pravděpodobné. Chybějící 1/4 proteinu byla lokalizována v nestrukturované části proteinu (CTD), zde je výskyt vazebného místa pro cNTP méně pravděpodobný. Z těchto důvodů jsem se rozhodl použít jinou izolační strategii založenou na ionexu a izoelektrické precipitaci.



Obrázek 21 - Kontrolní gel. Izolát proteinu δ získaný pomocí afinitní chromatografie z *B. subtilis*. Vidíme proužek v oblasti 20,4 kDa – izolace byla úspěšná.



Obrázek 22 - 1D NMR spektrum proteinu δ izolovaného z *B. subtilis*. V oblasti 5 - 6.5 ppm (červeně) chybí píky charakteristické pro cNTP. Srovnej s obrázkem 23 (L. Žídek, osobní sdělení).



Obrázek 23 - 1D NMR spektrum proteinu δ izolovaného z *E. coli*. V oblasti 5 - 6.5 ppm (červeně) vidíme píky charakteristické pro cNTP. Srovnej s obrázkem 22. (L. Žídek, osobní sdělení).

7.1.2 Příprava proteinu δ bez histidinové kotvy

Pro tyto účely jsem připravil expresní kmen *B. subtilis*, kde byla vložena jedna extra kopie genu *rpoE* za inducibilní promotor *P_{xyl}* pomocí sestrojeného vektoru s integrační kazetou. Kopie genu *rpoE* byla vložena do místa *amyE* chromosomu, spolu s rezistencí na spektinomycin. Tato rezistence posloužila jako selekční marker při identifikaci kmene s integrovanou kazetou. Jako izolační techniky pro následnou přípravu proteinu byly zvoleny ionex po kterém následovala izoelektrická precipitace, stejně jako v případě izolace z expresního systému *E. coli*.

7.1.2.a. Příprava vektoru pro expresi proteinu δ bez histidinové kotvy

Amplifikace genu *rpoE* proběhla standardně (viz kapitola 5.3.16.) s použitím Expand high fidelity PCR systému (Roche). Tento systém jako enzym používá směs polymeráz Tag a Tgo. Pro amplifikaci *rpoE* byly navrženy následující primery:

Navržení primerů - s ohledem na sekvenci genu *rpoE* (obrázek 24) a restrikční místa pSG1729 (obrázek 25) byly zvoleny tyto dva primery:

- ❖ Primer s označením 194

5' cgggtacc^{aaacaatattcacaggaagag} 3' Primer pro 5' konec genu („Forward“) obsahující restrikční místo *KpnI* – vyznačeno žlutě.

Leucin na pozici 1 (ttg) byl nahrazen plazmidovým methioninem (ggt); izoleucin na pozici 3 (atc) byl nahrazen treoninem (acc); nahrazena byla i wt sekvence Shine - Dalgarno za plazmidovou (obrázek 24).

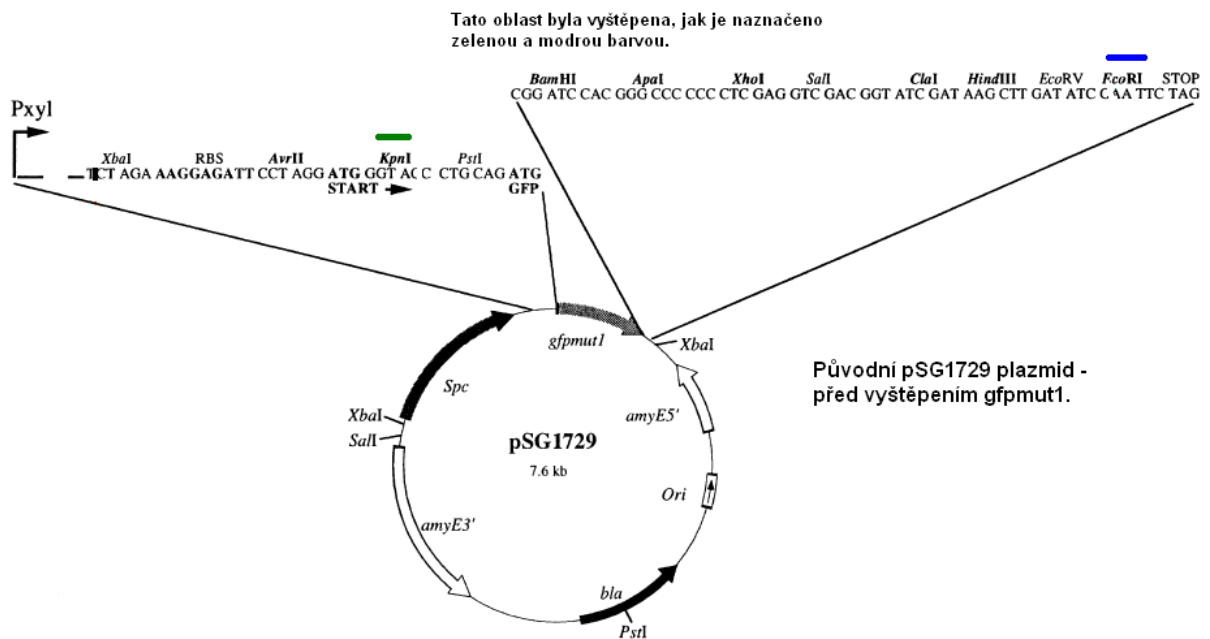
- ❖ Primer s označením 195

5' cgg^{gaattc}ctgatactatttaatttcctc 3' Primer pro 3' konec genu („Reverse“) obsahující restrikční místo *EcoRI* – vyznačeno žlutě. Konec exprese je kódován STOP kodonem tag (obrázek 24).

1 - ttg ggt atc aaa caa tat tca cag gaa gag
 31 - cta aag gaa atg gct tta gtt gaa atc gct

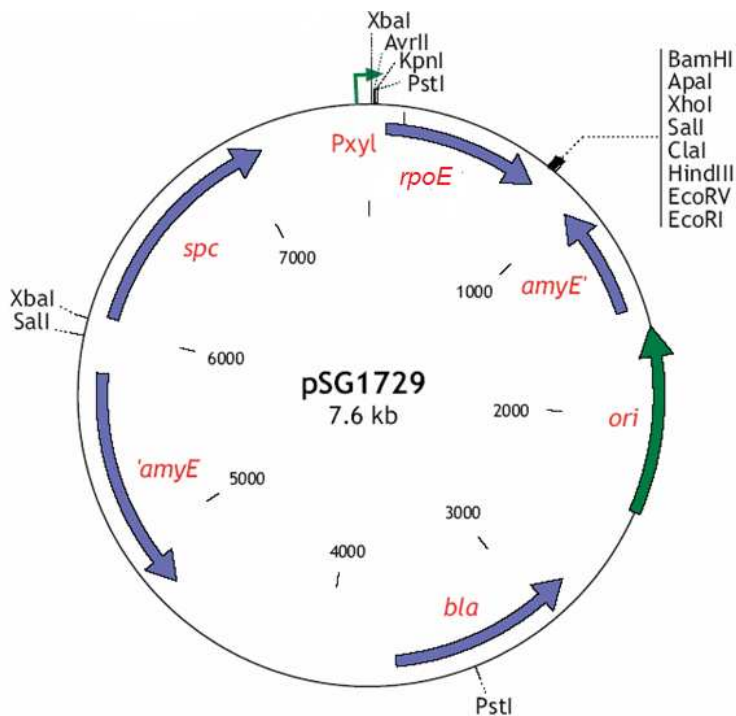
 451 - ctt gag atc gaa gaa gat att att gat gaa
 481 - gat gat gaa gac tat gat gat gaa gaa gag
 511 - gaa att aaa
tagtatcagatttcattcttcaaaacgatcttgactttcatagtcgaa

Obrázek 24 – Sekvence genu *rpoE* a jeho okolí v oblasti 3'. Zeleně je vyznačena oblast komplementární pro primer 194, modře pro primer 195. Červenou čarou je vyznačen triplet pro leucin, který byl nahrazen plazmidovým methioninem. Modrou čarou je vyznačen triplet pro izoleucin, který byl nahrazen threoninem. Fialovou čarou je označen STOP kodon.

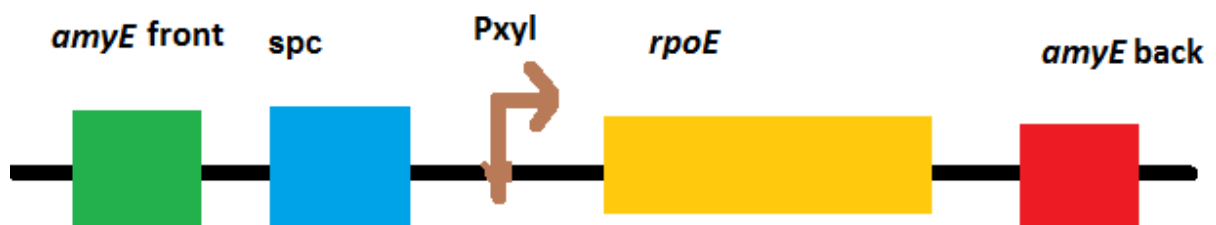


Obrázek 25 - Výchozí plazmid pSG1729. Zeleně a modře je naznačeno, mezi kterými místy byl gen *gfpmut1* vyměněn za gen *rpoE* za použití restričních míst *KpnI* (zeleně) a *EcoRI* (modře).

Výsledný plazmid s označením **pSG1729-rpoE** je na obrázku 26 a schéma místa *amyE* po rekombinaci inzerční kazety je na obrázku 27.



Obrázek 26 – Schéma výsledného vektoru pSG1729-rpoE zkonstruovaného pro následné vnesení jedné extra kopie *rpoE* do místa *amyE* na chromosomu *B. subtilis*.



Obrázek 27 - Schéma místa *amyE* chromosomu *B. subtilis* po rekombinaci integrační kazety z plazmidu pSG1729-rpoE. Černá čára znázorňuje chromosom *B. subtilis*, barevně jsou označeny geny. Hnědá šipka označuje promotor, který lze indukovat xylózou.

Výsledky:

Vytvořil jsem expresní kmen *B. subtilis* (#556) umožňující nadprodukcí proteinu δ bez histidinové kotvy. V prvním izolačním experimentu se nepodařilo získat dostatečné množství proteinu pro spektroskopickou analýzu NMR. Vytvořený expresní kmen bude v budoucnu použit v laboratoři k dalším purifikacím, kdy lepší výsledky může poskytnout například zvýšení objemu výchozí kultury.

7.1.3. Diskuse 1

Mým úkolem bylo prokázat přítomnost neobvyklých nukleotidů vázajících se k podjednotce δ .

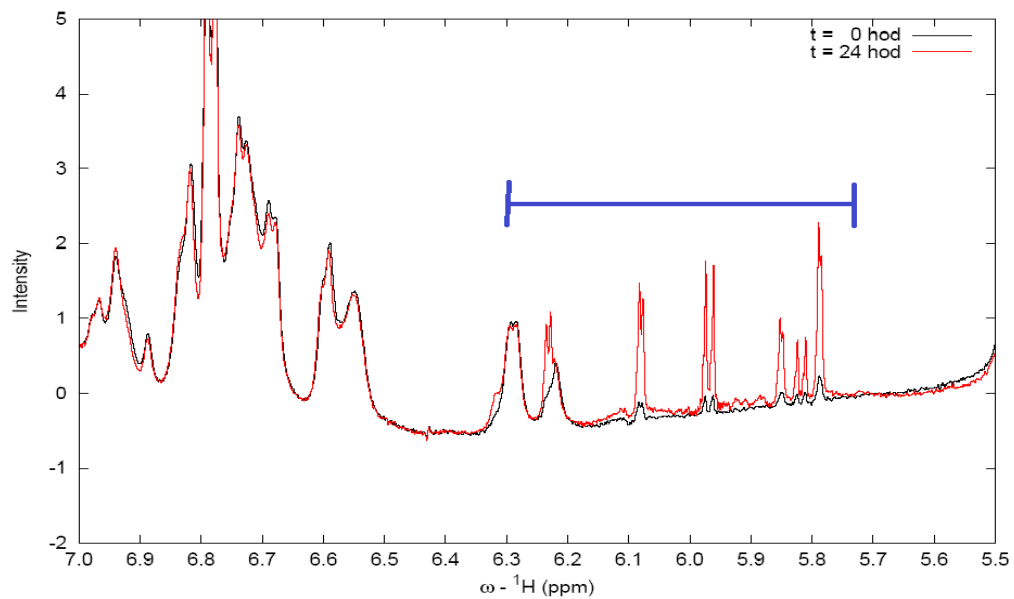
Mělo se jednat o ribonukleotidy s fosfátem v poloze 2', což pravděpodobně ukazuje na jejich cyklickou formu. Detekovány byly pomocí studie NMR, kdy původním záměrem bylo zjistit prostorovou strukturu proteinu δ . Podjednotka byla získána z expresního systému *E. coli* metodou ionexu a izoelektrické precipitace.

Přítomnost těchto cNTP, nebo jiných „nečistot“ není při NMR měřeních běžným jevem, cNTP byly na povrch proteinu δ vázány poměrně silně (obrázek 28), proto se nejspíše nejedná o artefakt daný izolační technikou. Mohlo by se však jednat o možný artefakt daný nadprodukcí v heterologním organismu.

Pro potvrzení či vyvrácení této domněnky jsem pro NMR studie připravil protein δ s histidinovou kotvou (produkovaný *B. subtilis*). Metodou izolace byla His – tag afinitní chromatografie. cNTP nebyly u tohoto izolátu detekovány. Mohlo by se jednat o jev daný izolační technikou či přítomností histidinové kotvy.

Proto jsem připravil nový expresní kmen *B. subtilis* (#556), kde byla vložena extra kopie *rpoE* za inducibilní promotor. Z něho jsem se rozhodl získat protein δ pro studie NMR. Metodou izolace byl ionex a izoelektrická precipitace. V prvním experimentu se však nepodařilo získat dostatečné množství proteinu.

Přítomnost či nepřítomnost hledaných nukleotidů se nepodařilo uspokojivě potvrdit či vyvrátit. Mnou vytvořený kmen #556 bude v budoucnu použit pro zodpovězení této otázky.

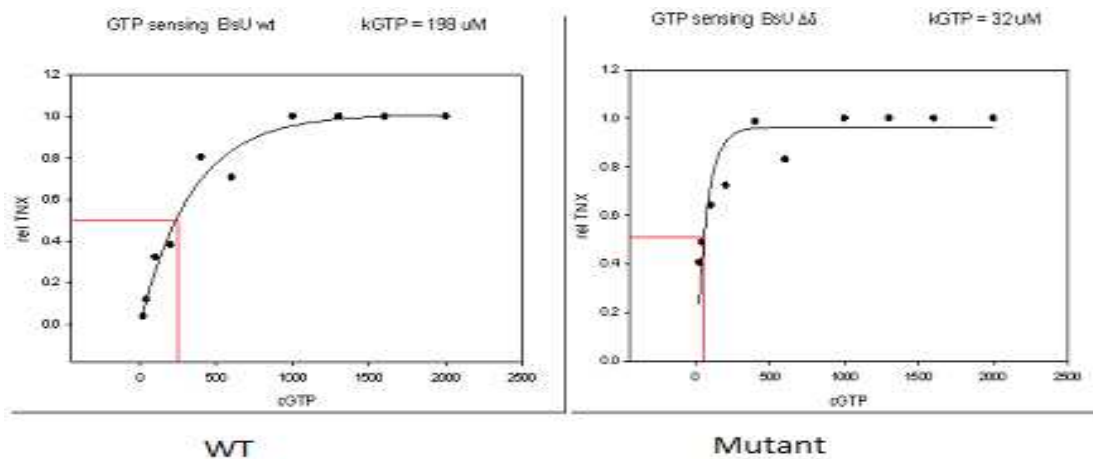


Obrázek 28 - ^1D NMR spektrum ukazuje, jak roste koncentrace volných nukleotidů během měření při 30°C , což dokazuje zvýšení intenzity píků mezi 5.7 a 6.3 ppm (modře označená oblast) po 24h (L. Žídek, osobní sdělení).

7.2. Vliv proteinu δ na regulaci iniciace transkripce *rrnB* P1 pomocí [iNTP]

Z teoretického úvodu je patrné, že regulace iniciace transkripce pomocí malých efektorových molekul, zvláště pak pomocí [iNTP], je pro buňku velmi důležitá.

V laboratoři, kde jsem zpracovával svoji diplomovou práci, bylo prokázáno pomocí experimentů *in vitro*, že podjednotka δ má vliv na aktivitu RNAP v závislosti na [iNTP] u senzitivních promotorů (obrázek 29) (A. Švenková, osobní sdělení).



Obrázek 29 - Studie *in vitro* vlivu proteinu δ na regulaci iniciace transkripce promotoru *rrnB* P1 (+1G) pomocí [iNTP]. RNAP s podjednotkou δ potřebuje relativně vysokou koncentraci GTP pro maximální transkripci (WT). V případě, kdy v reakci není podjednotka δ přítomna (Mutant), stačí pro maximální transkripci koncentrace GTP nižší (A. Švenková, osobní sdělení).

Otázkou je, zda se *in vitro* pozorovaný posun v „senzitivě RNAP k [iNTP]“ (daný přítomností či nepřítomností podjednotky δ) projeví i v podmínkách *in vivo*. Zda není například přítomen nějaký dosud neznámý mechanismus, který by nepřítomnost podjednotky δ nahrazoval.

Cílem mé práce s divokým kmenem (wt) a kmenem s „knock – outovaným“ genem *rpoE* ($\Delta rpoE$) modelového organismu *B. subtilis in vivo* bylo nalézt a definovat podmínky, při nichž se mění hladina GTP, výlučného iNTP pro promotory rRNA, popřípadě za těchto podmínek sledovat transkripční aktivitu.

7.2.a. Experimentální strategie 2:

- a) 7.2.1. Ověření, zda kolísá hladina GTP během růstové křivky podobně, jak bylo popsáno pro ATP a GTP u *E. coli* (obrázek 14, strana 31).

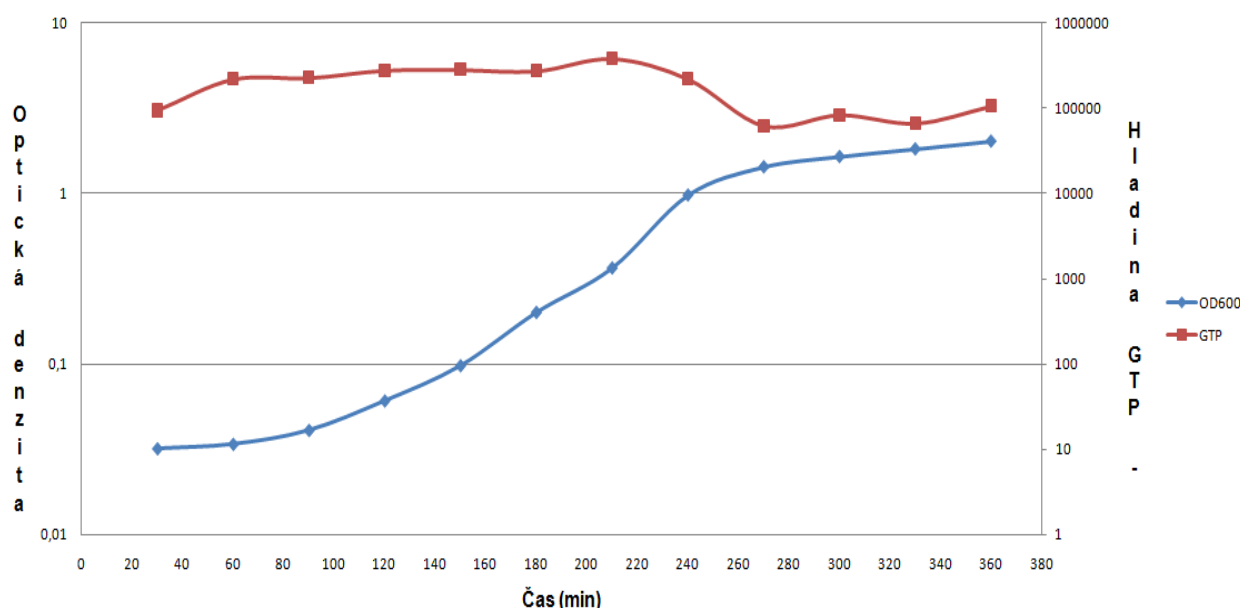
- b) 7.2.2. Ověření, zda při různých růstových rychlostech zůstává hladina GTP konstantní podobně jako u *E. coli* (obrázek 12, strana 29). Srovnat kmeny wt a $\Delta rpoE$.

- c) 7.2.3. Po nalezení podmínek, kdy se liší hladina GTP provést experimenty srovnávající aktivitu *rrnB P1* ve wt a $\Delta rpoE$.

Metody viz kapitola 5.3.b.

7.2.1. Kolísání hladiny GTP během růstové křivky

Jako první experiment jsem se rozhodl ověřit, zda se hladina GTP mění během růstu. Provedl jsem růstové experimenty s kmenem wt v definovaném médiu MOPS+20AMK (složení média viz kapitola 5.1.). Buňky jsem odebíral po půl hodinách a v každém tomto časovém okamžiku jsem měřil hodnotu optické denzity a relativní hladinu GTP, viz kapitola 5.3.23. (obrázek 30). Data jsou ze dvou nezávislých experimentů. GTP bylo izolováno extrakcí kyselinou mravenčí (Petersen, 1999), která byla prokázána jako nejlépe zachycující vnitrobuněčné koncentrace NTP (Schneider and Gourse, 2004).



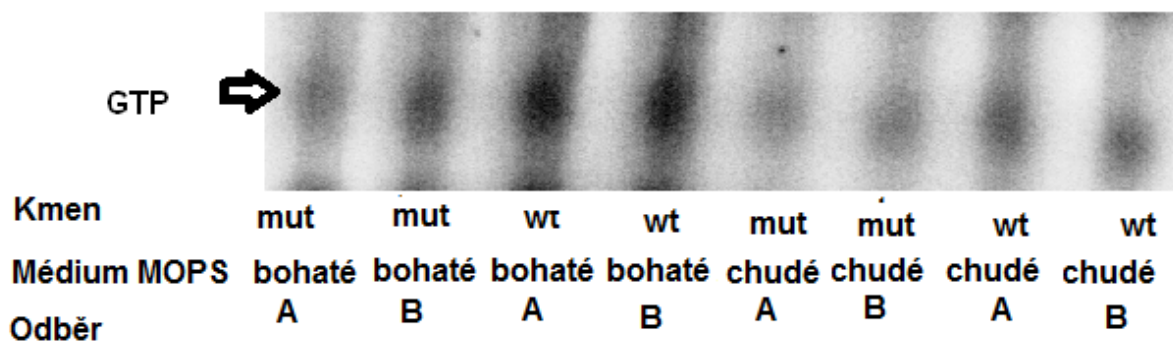
Obrázek 30 - Graf závislosti optické denzity na čase (modře), na vedlejší ose vidíme kolísání hladiny GTP (červeně).

Výsledky:

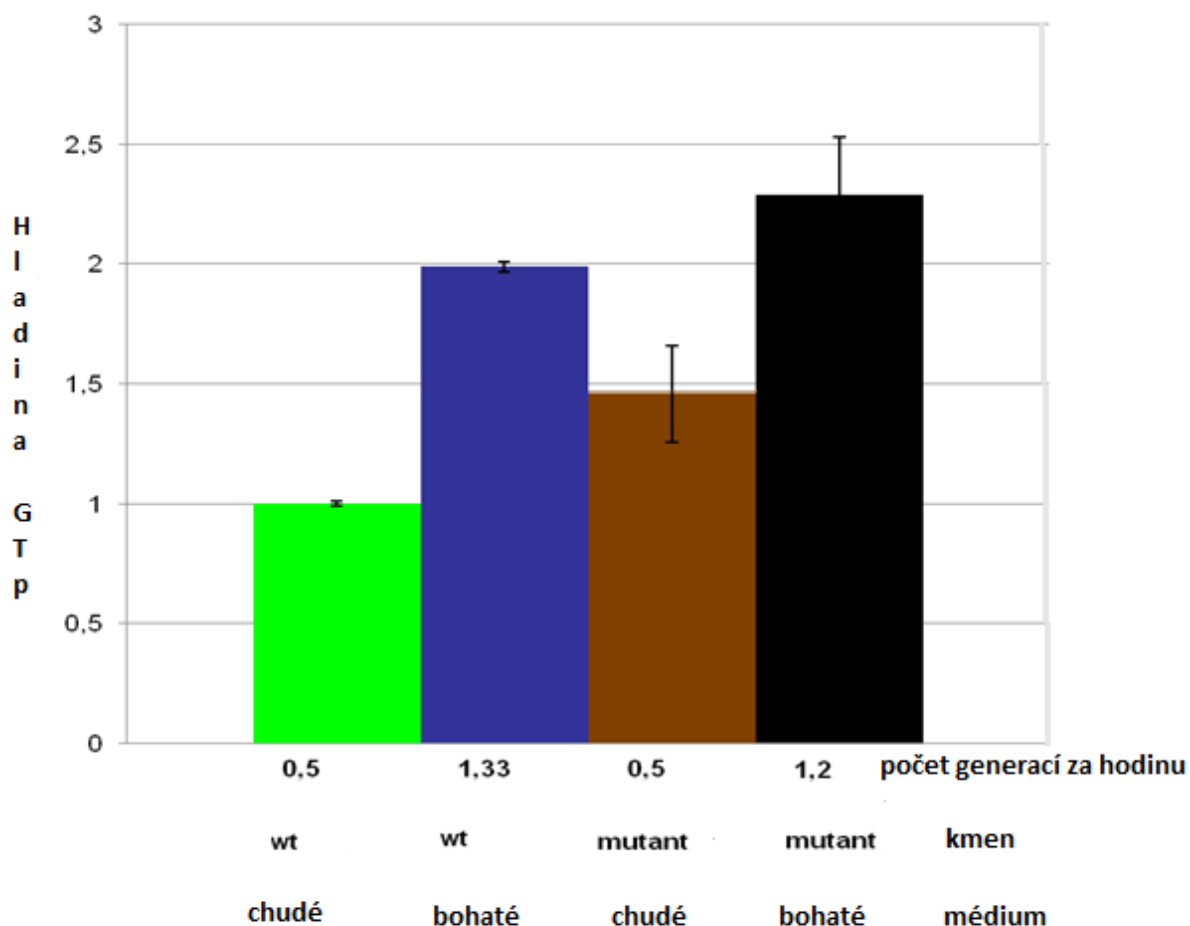
K výrazným změnám hladiny GTP dochází pouze při přechodu do stacionární fáze. Během exponenciální fáze nedochází k výrazným změnám hladiny GTP, tak jak to bylo popsáno pro ATP či GTP u *E. coli* (Walker *et al.*, 2004). Je možné, že popsané výsledky u *E. coli* byly závislé na podmínkách experimentu a za jiných podmínek by fluktuace nebyla pozorována. Protože experimenty s přechodem do stacionární fáze jsou značně časově náročné, rozhodl jsem se hledat další podmínky, kdy by se lišila hladina GTP v buňce.

7.2.2. Intracelulární hladina GTP při různých růstových rychlostech

Protože jsem nedetekoval rozdíly v hladině GTP během exponenciálního růstu, navrhl jsem experiment, kdy jsem měřil hladiny GTP v exponenciální fázi při různých růstových rychlostech. Růstová rychlost byla určena složením média. Kultury rostly v definovaném médiu MOPS. Definované médium označované jako **bohaté MOPS** obsahovalo všech 20 AMK, médium označované jako **chudé MOPS** obsahovalo 2 AMK (fenylalanin, tyrozin) z důvodu auxotrofie používaného kmene #642. Pro zjištění, zda protein δ neovlivňuje hladinu intracelulárního GTP jsem experimenty provedl v kmenech wt (#7554) a $\Delta rpoE$ (#642). GTP bylo izolováno metodou extrakce kyselinou mravenčí. Odběry probíhaly během ustáleného růstu v exponenciální fázi ($OD_{600} = 0,3$). Data jsou ze dvou nezávislých experimentů (obrázek 31 a 32).



Obrázek 31- Ukázka experimentu TLC – naskenovaná oblast obsahuje radioaktivně značené GTP. Vzorky pochází z kultivace v bohatém a chudém médiu MOPS. Růst probíhaly ve dvou paralelách (A, B) u mutantního kmene $\Delta rpoE$ (mut) a divokého kmene (wt). Intenzita skvrny GTP je úměrná jeho množství. Tato intenzita byla normalizována k pozadí a výchozímu množství buněk.



Obrázek 32 - Relativní množství GTP v buňce při různých dobách zdvojení. Média jsou bohaté MOPS (bohaté) a chudé MOPS (chudé). Divoký kmen (wt) a kmen $\Delta rpoE$ (mutant).

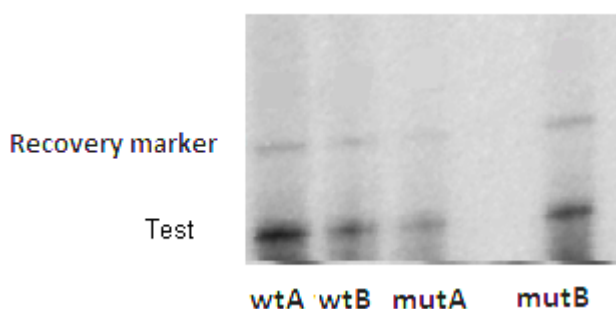
Výsledky:

Na rozdíl od *E. coli* (Petersen and Moller, 2000), u *B. subtilis* se hladina GTP mění v závislosti na růstové rychlosti. Zjištěné rozdíly v hladinách intracelulárního GTP jsou mírně výraznější u wt, kdy je hladina GTP v buňkách rostoucích v bohatém médiu MOPS přibližně dvojnásobná, oproti buňkám rostoucím v chudém médiu MOPS. U mutantního kmene ($\Delta rpoE$) nejsou tyto rozdíly tak výrazné. Vzhledem k experimentální chybě se však rozdíl mezi wt a $\Delta rpoE$ nezdá zásadní. Pozorované rozdíly v [GTP] jsou dostatečné pro experimenty porovnávající aktivity iNTP - závislých promotorů v kmenech wt a $\Delta rpoE$.

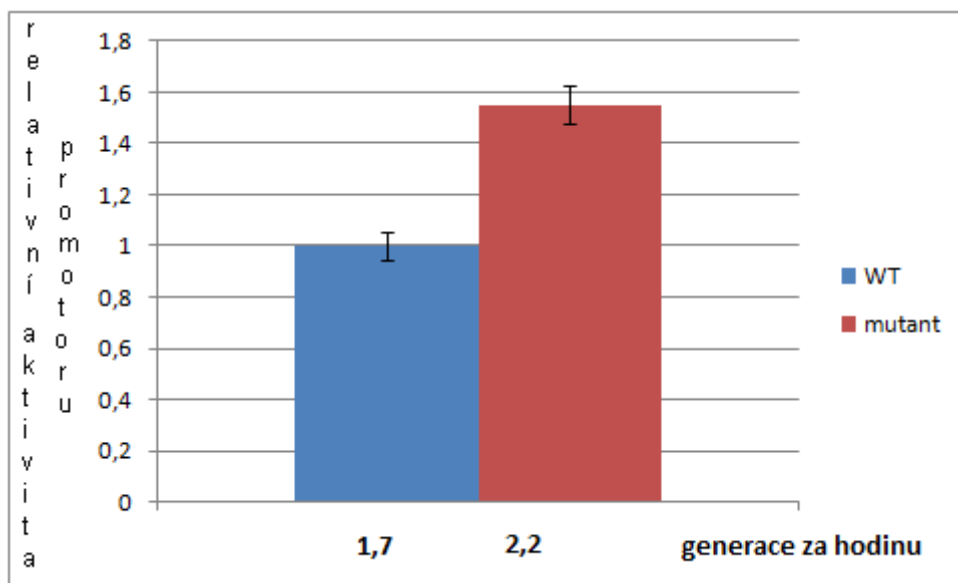
7.2.3.1. Hladina transkriptu *rrnB* P1 při různých růstových rychlostech

RNAP s proteinem δ a RNAP bez proteinu δ potřebují *in vitro* rozdílné hladiny GTP pro maximální aktivitu daného promotoru (*rrnB* P1). Následující série experimentů měla za cíl zjistit, zda *in vitro* pozorovaný vliv podjednotky δ na „senzitivitu RNAP k [iGTP]“ bude pozorován i *in vivo*. Předchozími experimenty bylo ověřeno, že u *B. subtilis* dochází ke změnám intracelulární [GTP] při různých růstových rychlostech.

Jako vstupní experiment jsem změnil aktivitu promotoru *rrnB* P1 u kmenů wt a $\Delta rpoE$ kultivovaných v bohatém médiu LB. Odběry alikvótů pro měření probíhaly v časně exponenciální fázi ($OD_{600} = 0,3$). Metoda je založena na měření hladiny nestabilní markerové mRNA (*lacZ*), která je přepisována ze studovaného promotoru (viz kapitola 5.3.25.). Výsledek je ze dvou na sobě nezávislých experimentů (obrázek 33 a 34).



Obrázek 33 – Primární data zachycující aktivitu *rrnB* P1 pomocí metody primer extension. Vzorky pochází z kultivace v médiu LB. Růst probíhal ve dvou paralelách (A, B) u mutantního kmene $\Delta rpoE$ (*mut*) a divokého kmene (*wt*). Množství cDNA (Test) vzniklé přepisem transkriptu iniciovaném na *rrnB* P1 bylo normalizováno vůči recovery markeru, signálu pozadí a množství buněk.



Obrázek 34 - Relativní aktivita promotoru *rrnB P1* při růstech *wt* a mutantního kmene $\Delta rpoE$ v médiu LB.

Následovaly experimenty v bohatém a chudém médiu MOPS (viz kapitola 5.1.), které neposkytly dostatek signálu pro věrohodnou analýzu.

Výsledky:

V živinami velmi bohatém médiu LB nebyl detekován významný rozdíl v aktivitě promotoru *rrnB P1* v kmenech *wt* a $\Delta rpoE$. Pozorovaná vyšší aktivita promotoru *rrnB P1* v kmeni $\Delta rpoE$ odpovídá vyšší růstové rychlosti tohoto kmene. Růstové rychlosti *wt* a $\Delta rpoE$ jsou většinou podobné, pozorovaný rozdíl v růstových rychlostech mohl být způsoben technikou odběru buněk pro extrakce RNA.

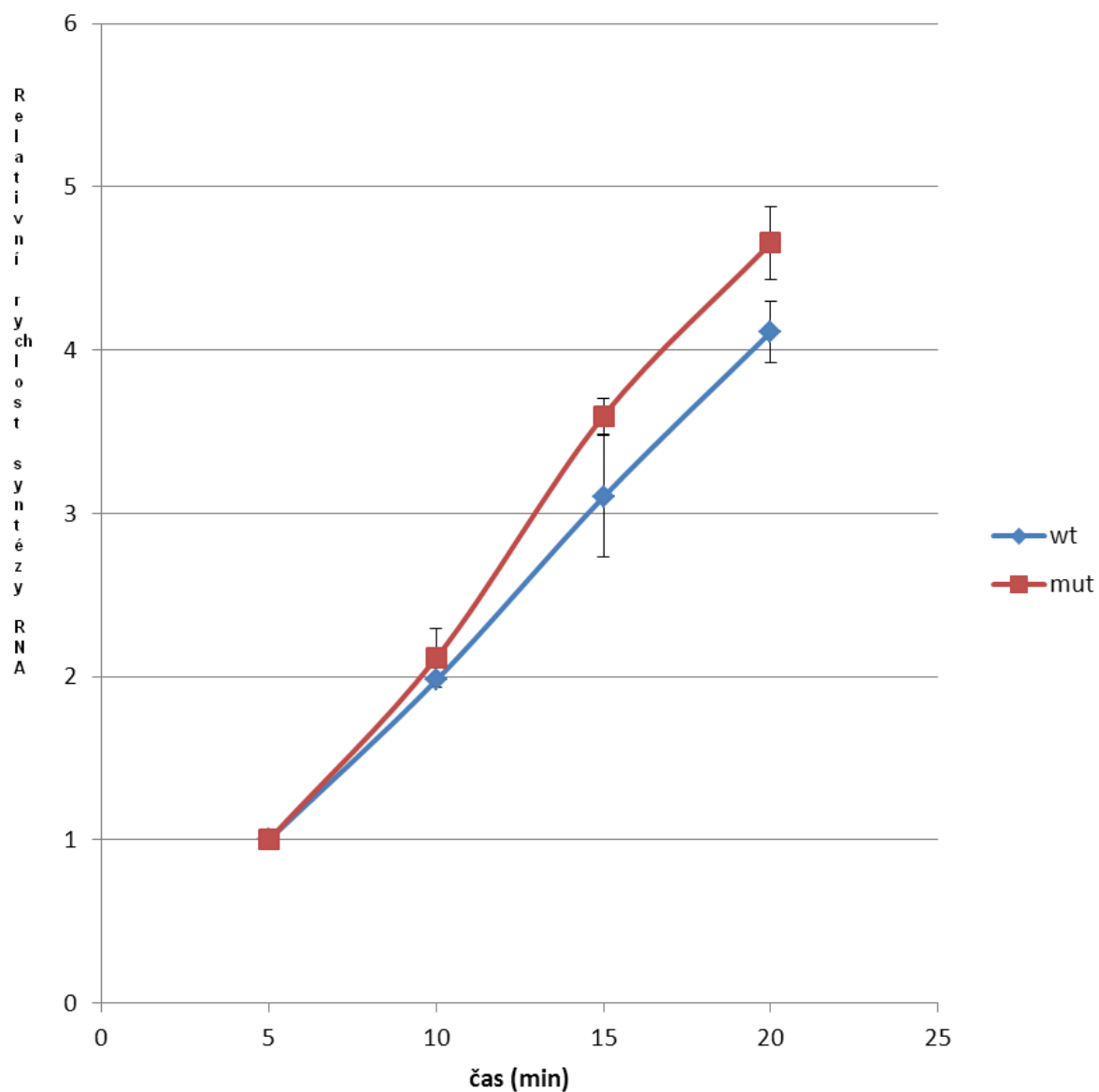
Experimenty v definovaných médiích MOPS neposkytly spolehlivě interpretovatelné výsledky.

7.2.3.2. Rozdíl v celkové syntéze RNA u mutantního kmene $\Delta rpoE$ a kmene wt *B. subtilis*

Tento experiment byl navrhnout jako alternativa k experimentu 7.2.3.1. (aktivita *rrnB* P1 při různých růstových rychlostech) pro zodpovězení otázky, zda protein δ ovlivňuje syntézu celkové RNA, která je dána aktivitou rRNA promotorů. Oba kmeny (wt, $\Delta rpoE$) rostly v bohatém médiu MOPS (s přidavkem všech dvaceti aminokyselin) (viz kapitola 5.1.). Při dané optické denzitně kultury ($OD_{600} = 0,3$ – kultura je spolehlivě v exponenciální fázi) byl přidán uridin s inkorporovaným 3H . Z kultury byly odebrány alikvóty v pětiminutových intervalech. Sledoval jsem množství inkorporovaného 3H uridinu v RNA v daném čase metodou srážení trichloroctovou kyselinou. Provedeny byly dva na sobě nezávislé experimenty.

Výsledky:

Ze získaných dat lze usuzovat, že protein δ nemá vliv na syntézu celkové RNA během exponenciální fáze růstu v použitém médiu a tudíž na aktivitu promotorů rRNA (obrázek 35). V laboratoři bude ještě proveden experiment v chudém médiu MOPS, který doplní mnou získaná data.



Obrázek 35 - Relativní přírůstek celkové RNA během exponenciální fáze při růstu v bohatém médiu MOPS u wt a mutantního kmene Δ rp0E. Doby zdvojení jsou v obou případech prakticky totožné - 1,7 generace za hodinu. Rychlost syntézy RNA se u obou kmenů prakticky neliší.

7.2.4. Diskuse 2

Mým úkolem bylo definovat takové podmínky, při nichž se mění intracelulární hladina GTP a za těchto podmínek sledovat transkripční aktivitu u kmenů wt a $\Delta rpoE$ modelového organismu *B. subtilis*.

Nejprve jsem zkoumal možné kolísání hladiny GTP během exponenciální fáze u *B. subtilis*. Experimenty ukázaly, že hladina GTP je relativně stabilní během této fáze a nedochází k větším výkyvům.

Moje další experimenty pak odhalily rozdíl v hladinách GTP během ustáleného exponenciálního růstu v závislosti na rychlosti růstu kultury. Nalezl jsem tak podmínky, kdy se liší vnitrobuněčná koncentrace GTP u *B. subtilis*.

Rozdíly v [GTP] při různých růstových rychlostech u *B. subtilis* mohou být důležité pro regulaci syntézy ribozomů. Rychlost jejich syntézy je závislá na rychlosti růstu („*growth-rate dependent control*“). U *E. coli* není přesný mechanismus „*growth-rate dependent control*“ dosud znám (Klumpp *et al.*, 2009). U *B. subtilis* by mohla probíhat regulace syntézy ribozomů při různých růstových rychlostech alespoň z části pomocí rozdílných koncentrací GTP, což jsou iNTP pro geny *rrn*.

Provedl jsem experimenty, kdy jsem studoval buď aktivitu promotoru *rrnB* P1 nebo rychlost syntézy celkové RNA (která představuje hlavně syntézu rRNA a tudíž odráží její regulaci na úrovni iniciace transkripce). V bohatém médiu LB a definovaném bohatém médiu MOPS jsem nedetekoval významný rozdíl. Experiment v chudém médiu MOPS bude ještě v laboratoři dokončen.

Nezaznamenal jsem tedy výrazný vliv proteinu δ na aktivitu *rrnB* P1 či syntézu rRNA. Je možné, že jeho přítomnost se projeví pouze při rychlých změnách živin v prostředí. Při sledování růstu při ustálené rychlosti má pak molekulární aparát dostatek času zoptimalizovat expresi rRNA i bez přítomnosti proteinu δ .

8. Souhrn

- 1) Pro zodpovězení otázky, zda jsou na povrchu proteinu δ v *B. subtilis* přítomny neobvyklé NTP byl tento izolován v dostatečném množství pomocí metody afinitní chromatografie z již připraveného expresního kmene. Přítomnost těchto nukleotidů se nepodařilo potvrdit. Následně byl připraven nový expresní systém bez histidinové kotvy, který bude použit pro izolaci proteinu δ z *B. subtilis* ke konečnému zodpovězení této otázky.
- 2) Byly hledány podmínky, kdy se mění hladina GTP v *B. subtilis*. Bylo provedeno měření hladiny GTP v *B. subtilis* během růstové křivky (se zaměřením na exponenciální fázi) a při různých růstových rychlostech v závislosti na složení média. Ukázalo se, že během exponenciální fáze růstové křivky hladina GTP významně nekolísá. Při různých růstových rychlostech byl v hladině GTP pozorován rozdíl. Tím se *B. subtilis* liší od *E. coli*. Byly nalezeny podmínky pro test vlivu podjednotky δ na regulaci transkripční aktivity promotorů pomocí koncentrace GTP.
- 3) Byly provedeny experimenty, kdy jsem srovnával aktivitu promotoru *rrnB* P1 u wt a $\Delta rpoE$ v různých médiích. Při pokusech s růsty v bohatém médiu LB nebyl pozorován žádný rozdíl mezi wt a $\Delta rpoE$ v aktivitách promotorů *rrnB* P1. Experimenty v definovaných médiích neposkytly data, která by bylo možné spolehlivě interpretovat.
- 4) Bylo provedeno srovnání syntézy celkové RNA u wt a $\Delta rpoE$ v exponenciální fázi růstu v bohatém médiu MOPS, které odráží aktivity promotorů *rrn*. Ukázalo se, že podjednotka δ nemá vliv na syntézu celkové RNA v těchto podmínkách.
- 5) Některé experimenty zahrnující růsty v definovaných médiích MOPS čekají na provedení, nicméně dosažené výsledky naznačují, že při ustálené růstové rychlosti nemá podjednotka δ vliv na aktivitu na koncentraci iGTP závislých promotorů.

Moje práce přispěla k pochopení vybraných aspektů fyziologie *B. subtilis* a vlivu podjednotky δ na regulaci transkripce. Nejvýznamnějším výsledkem je prokázání změny koncentrace GTP v závislosti na ustálené rychlosti růstu u *B. subtilis*, což kontrastuje s dosud známou situací u *E. coli*, kde se tato koncentrace příliš nemění.

9. Seznam literatury

1. A.L.Sonenschein. *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives:from Gens to Cells.* 1-1-2002. Washington, D.C., ASM Press.
Ref Type: Generic
2. Abranches,J., Martinez,A.R., Kajfasz,J.K., Chavez,V., Garsin,D.A., and Lemos,J.A. (2009) . The molecular alarmone (p) ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* *191*, 2248-2256.
3. Aiyar,S.E., Gaal,T., and Gourse,R.L. (2002a) . rRNA promoter activity in the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens*. *J. Bacteriol.* *184*, 1349-1358.
4. Aiyar,S.E., Gaal,T., and Gourse,R.L. (2002b) . rRNA promoter activity in the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens*. *J. Bacteriol.* *184*, 1349-1358.
5. Aiyar,S.E., Juang,Y.L., Helmann,J.D., and deHaseth,P.L. (1994) . Mutations in sigma factor that affect the temperature dependence of transcription from a promoter, but not from a mismatch bubble in double-stranded DNA. *Biochemistry* *33*, 11501-11506.
6. Arnvig,K.B., Zeng,S., Quan,S., Papageorge,A., Zhang,N., Villapakkam,A.C., and Squires,C.L. (2008) . Evolutionary comparison of ribosomal operon antitermination function. *J. Bacteriol.* *190*, 7251-7257.
7. Artsimovitch,I., Svetlov,V., Anthony,L., Burgess,R.R., and Landick,R. (2000) . RNA polymerases from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* differ in recognition of regulatory signals in vitro. *J. Bacteriol.* *182*, 6027-6035.
8. Aviv,M., Giladi,H., Oppenheim,A.B., and Glaser,G. (1996) . Analysis of the shut-off of ribosomal RNA promoters in *Escherichia coli* upon entering the stationary phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* *140*, 71-76.
9. Barker,M.M., Gaal,T., and Gourse,R.L. (2001) . Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J. Mol. Biol.* *305*, 689-702.

10. Barker, M.M. and Gourse, R.L. (2001) . Regulation of rRNA transcription correlates with nucleoside triphosphate sensing. *J. Bacteriol.* *183*, 6315-6323.
11. Bartlett, M.S., Gaal, T., Ross, W., and Gourse, R.L. (1998) . RNA polymerase mutants that destabilize RNA polymerase-promoter complexes alter NTP-sensing by *rrn* P1 promoters. *J. Mol. Biol.* *279*, 331-345.
12. Browning, D.F. and Busby, S.J. (2004) . The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 57-65.
13. Canals, A., Uson, I., and Coll, M. (2010) . The structure of RNA-free Rho termination factor indicates a dynamic mechanism of transcript capture. *J. Mol. Biol.* *400*, 16-23.
14. Cole, J.R., Olsson, C.L., Hershey, J.W., Grunberg-Manago, M., and Nomura, M. (1987) . Feedback regulation of rRNA synthesis in *Escherichia coli*. Requirement for initiation factor IF2. *J. Mol. Biol.* *198*, 383-392.
15. Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., and Squires, C.L. (1995) . rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J. Bacteriol.* *177*, 4152-4156.
16. Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A., and Moore, P.B. (1994) . The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.* *13*, 3661-3668.
17. Deutscher, M.P. (2006) . Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res.* *34*, 659-666.
18. Evans, D., Marquez, S.M., and Pace, N.R. (2006) . RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 333-341.
19. Friesen, J.D., Fiil, N.P., and von, M.K. (1975) . Synthesis and turnover of basal level guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *250*, 304-309.
20. Gaal, T., Bartlett, M.S., Ross, W., Turnbough, C.L., Jr., and Gourse, R.L. (1997) . Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science* *278*, 2092-2097.

21. Gourse,R.L. (1988) . Visualization and quantitative analysis of complex formation between E. coli RNA polymerase and an rRNA promoter in vitro. *Nucleic Acids Res.* *16*, 9789-9809.
22. Gourse,R.L., de Boer,H.A., and Nomura,M. (1986) . DNA determinants of rRNA synthesis in E. coli: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell* *44*, 197-205.
23. Gourse,R.L., Gaal,T., Bartlett,M.S., Appleman,J.A., and Ross,W. (1996) . rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 645-677.
24. Green,C.J. and Vold,B.S. (1992) . A cluster of nine tRNA genes between ribosomal gene operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *174*, 3147-3151.
25. Guerout-Fleury,A.M., Frandsen,N., and Stragier,P. (1996) . Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* *180*, 57-61.
26. Haugen,S.P., Berkmen,M.B., Ross,W., Gaal,T., Ward,C., and Gourse,R.L. (2006) . rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* *125*, 1069-1082.
27. Haugen,S.P., Ross,W., and Gourse,R.L. (2008) . Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 507-519.
28. Henkin,T.M. and Yanofsky,C. (2002) . Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* *24*, 700-707.
29. Hernandez,V.J. and Cashel,M. (1995) . Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 mediate ppGpp-dependent functions in vivo. *J. Mol. Biol.* *252*, 536-549.
30. Hernandez,V.J., Hsu,L.M., and Cashel,M. (1996) . Conserved region 3 of *Escherichia coli* final sigma70 is implicated in the process of abortive transcription. *J. Biol. Chem.* *271*, 18775-18779.
31. Ibba,M. and Soll,D. (1999) . Quality control mechanisms during translation. *Science* *286*, 1893-1897.

32. Jacobson,A. and Gillespie,D. (1968) . Metabolic events occurring during recovery from prolonged glucose starvation in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* *95*, 1030-1039.
33. Jarvis,E.D., Widom,R.L., LaFauci,G., Setoguchi,Y., Richter,I.R., and Rudner,R. (1988) . Chromosomal organization of rRNA operons in *Bacillus subtilis*. *Genetics* *120*, 625-635.
34. Jensen,K.F. and Pedersen,S. (1990) . Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components. *Microbiol. Rev.* *54*, 89-100.
35. Jinks-Robertson,S., Gourse,R.L., and Nomura,M. (1983) . Expression of rRNA and tRNA genes in *Escherichia coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. *Cell* *33*, 865-876.
36. Jones,A.L., Needham,R.H., and Rubens,C.E. (2003) . The Delta subunit of RNA polymerase is required for virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* *71*, 4011-4017.
37. Juang,Y.L. and Helmann,J.D. (1994) . The delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. An allosteric effector of the initiation and core-recycling phases of transcription. *J. Mol. Biol.* *239*, 1-14.
38. Kasai,K., Nishizawa,T., Takahashi,K., Hosaka,T., Aoki,H., and Ochi,K. (2006) . Physiological analysis of the stringent response elicited in an extreme thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.* *188*, 7111-7122.
39. Keener,J. and Nomura,M. (1993) . Dominant lethal phenotype of a mutation in the -35 recognition region of *Escherichia coli* sigma 70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 1751-1755.
40. KJELDGAARD,N.O., MAALOE,O., and SCHAECHTER,M. (1958) . The transition between different physiological states during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* *19*, 607-616.
41. Klumpp,S., Zhang,Z., and Hwa,T. (2009) . Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell* *139*, 1366-1375.
42. Krasny,L. and Gourse,R.L. (2004) . An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J.* *23*, 4473-4483.

43. Krasny,L., Tiserova,H., Jonak,J., Rejman,D., and Sanderova,H. (2008) . The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *69*, 42-54.
44. Kunst,F. *et al.* (1997) . The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* *390*, 249-256.
45. Landick,R., Wang,D., and Chan,C.L. (1996) . Quantitative analysis of transcriptional pausing by *Escherichia coli* RNA polymerase: his leader pause site as paradigm. *Methods Enzymol.* *274*, 334-353.
46. Lewis,P.J., Doherty,G.P., and Clarke,J. (2008) . Transcription factor dynamics. *Microbiology* *154*, 1837-1844.
47. Lewis,P.J. and Marston,A.L. (1999) . GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* *227*, 101-110.
48. Liu,J. and Turnbough,C.L., Jr. (1994) . Effects of transcriptional start site sequence and position on nucleotide-sensitive selection of alternative start sites at the *pyrC* promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *176*, 2938-2945.
49. Lopez de Saro,F.J., Yoshikawa,N., and Helmann,J.D. (1999) . Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* *274*, 15953-15958.
50. Lopez,J.M., Dromerick,A., and Freese,E. (1981) . Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *J. Bacteriol.* *146*, 605-613.
51. Lukacsovich,T., Boros,I., and Venetianer,P. (1987) . New regulatory features of the promoters of an *Escherichia coli* rRNA gene. *J. Bacteriol.* *169*, 272-277.
52. Lund,E. and Dahlberg,J.E. (1979) . Initiation of *Escherichia coli* ribosomal RNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 5480-5484.
53. Mallik,P., Paul,B.J., Rutherford,S.T., Gourse,R.L., and Osuna,R. (2006) . DksA is required for growth phase-dependent regulation, growth rate-dependent control, and stringent control of *fis* expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *188*, 5775-5782.

54. Mendoza-Vargas,A. *et al.* (2009) . Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in E. coli. PLoS. One. 4, e7526.
55. Molin,S., von,M.K., MAALOE,O., Hansen,M.T., and Pato,M.L. (1977) . Control of ribosome synthesis in Escherichia coli: analysis of an energy source shift-down. J. Bacteriol. 131, 7-17.
56. Motackova,V., Sanderova,H., Zidek,L., Novacek,J., Padrta,P., Svenkova,A., Korelusova,J., Jonak,J., Krasny,L., and Sklenar,V. (2010) . Solution structure of the N-terminal domain of Bacillus subtilis delta subunit of RNA polymerase and its classification based on structural homologs. Proteins 78, 1807-1810.
57. Murray,H.D., Appleman,J.A., and Gourse,R.L. (2003a) . Regulation of the Escherichia coli rrnB P2 promoter. J. Bacteriol. 185, 28-34.
58. Murray,H.D. and Gourse,R.L. (2004) . Unique roles of the rrn P2 rRNA promoters in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 52, 1375-1387.
59. Murray,H.D., Schneider,D.A., and Gourse,R.L. (2003b) . Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. Mol. Cell 12, 125-134.
60. Nanamiya,H., Kasai,K., Nozawa,A., Yun,C.S., Narisawa,T., Murakami,K., Natori,Y., Kawamura,F., and Tozawa,Y. (2008) . Identification and functional analysis of novel (ρ) ppGpp synthetase genes in Bacillus subtilis. Mol. Microbiol. 67, 291-304.
61. Natori,Y. *et al.* (2009) . Transcription activity of individual rrn operons in Bacillus subtilis mutants deficient in (ρ) ppGpp synthetase genes, relA, yjbM, and ywaC. J. Bacteriol. 191, 4555-4561.
62. Neidhardt,F.C. and MAGASANIK,B. (1960) . Studies on the role of ribonucleic acid in the growth of bacteria. Biochim. Biophys. Acta 42, 99-116.
63. Nomura,M., Gourse,R., and Baughman,G. (1984) . Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. Annu. Rev. Biochem. 53, 75-117.
64. Olsson,M.O. and Gausing,K. (1980) . Post-transcriptional control of coordinated ribosomal protein synthesis in Escherichia coli. Nature 283, 599-600.
65. Paul,B.J., Barker,M.M., Ross,W., Schneider,D.A., Webb,C., Foster,J.W., and Gourse,R.L. (2004a) . DksA: a critical component of the transcription initiation

machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* *118*, 311-322.

66. Paul,B.J., Berkmen,M.B., and Gourse,R.L. (2005) . DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 7823-7828.
67. Paul,B.J., Ross,W., Gaal,T., and Gourse,R.L. (2004b) . rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* *38*, 749-770.
68. Petersen,C. and Moller,L.B. (2000) . Invariance of the nucleoside triphosphate pools of *Escherichia coli* with growth rate. *J. Biol. Chem.* *275*, 3931-3935.
69. Pul,U., Wurm,R., Lux,B., Meltzer,M., Menzel,A., and Wagner,R. (2005) . LRP and H-NS--cooperative partners for transcription regulation at *Escherichia coli* rRNA promoters. *Mol. Microbiol.* *58*, 864-876.
70. Ross,W. and Gourse,R.L. (2009) . Analysis of RNA polymerase-promoter complex formation. *Methods* *47*, 13-24.
71. SANDS,M.K. and ROBERTS,R.B. (1952) . The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *63*, 505-511.
72. Sarmientos,P. and Cashel,M. (1983) . Carbon starvation and growth rate-dependent regulation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters: differential control of dual promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 7010-7013.
73. SCHAECHTER,M., MAALOE,O., and KJELDGAARD,N.O. (1958) . Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* *19*, 592-606.
74. Schneider,D.A. and Gourse,R.L. (2003) . Changes in *Escherichia coli* rRNA promoter activity correlate with changes in initiating nucleoside triphosphate and guanosine 5' diphosphate 3'-diphosphate concentrations after induction of feedback control of ribosome synthesis. *J. Bacteriol.* *185*, 6185-6191.
75. Schneider,D.A. and Gourse,R.L. (2004) . Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: a bioassay for available cellular ATP. *J. Biol. Chem.* *279*, 8262-8268.

76. Schneider,D.A., Ross,W., and Gourse,R.L. (2003b) . Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 151-156.
77. Schneider,D.A., Ross,W., and Gourse,R.L. (2003a) . Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 151-156.
78. Schwartz,J.J., Gazumyan,A., and Schwartz,I. (1992b) . rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* *174*, 3757-3765.
79. Schwartz,J.J., Gazumyan,A., and Schwartz,I. (1992a) . rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* *174*, 3757-3765.
80. Schwartz,M. and Neuhard,J. (1975) . Control of expression of the *pyr* genes in *Salmonella typhimurium*: effects of variations in uridine and cytidine nucleotide pools. *J. Bacteriol.* *121*, 814-822.
81. Seepersaud,R., Needham,R.H., Kim,C.S., and Jones,A.L. (2006) . Abundance of the delta subunit of RNA polymerase is linked to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.* *188*, 2096-2105.
82. Sorensen,K.I., Baker,K.E., Kelln,R.A., and Neuhard,J. (1993) . Nucleotide pool-sensitive selection of the transcriptional start site in vivo at the *Salmonella typhimurium pyrC* and *pyrD* promoters. *J. Bacteriol.* *175*, 4137-4144.
83. Squires,C.L. and Zaporjets,D. (2000) . Proteins shared by the transcription and translation machines. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 775-798.
84. Srivatsan,A. and Wang,J.D. (2008) . Control of bacterial transcription, translation and replication by ρ ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 100-105.
85. Stevenson,B.S. and Schmidt,T.M. (2004) . Life history implications of rRNA gene copy number in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 6670-6677.
86. Turnbough,C.L., Jr. (2008) . Regulation of bacterial gene expression by the NTP substrates of transcription initiation. *Mol. Microbiol.* *69*, 10-14.
87. Turnbough,C.L., Jr. and Switzer,R.L. (2008) . Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *72*, 266-300, table.

88. VanBogelen,R.A., Olson,E.R., Wanner,B.L., and Neidhardt,F.C. (1996) . Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* *178*, 4344-4366.
89. Vassilyev,D.G. (2009) . Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 691-700.
90. Vold,B.S., Green,C.J., Narasimhan,N., Strem,M., and Hansen,J.N. (1988a) . 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*, 14485-14490.
91. Vold,B.S., Okamoto,K., Murphy,B.J., and Green,C.J. (1988b) . Transcriptional analysis of Bacillus subtilis rRNA-tRNA operons. I. The tRNA gene cluster of rrnB has an internal promoter. *J. Biol. Chem.* *263*, 14480-14484.
92. Vrentas,C.E., Gaal,T., Berkmen,M.B., Rutherford,S.T., Haugen,S.P., Vassilyev,D.G., Ross,W., and Gourse,R.L. (2008) . 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*, 551-564.
93. Vrentas,C.E., Gaal,T., Ross,W., Ebright,R.H., and Gourse,R.L. (2005) . Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev.* *19*, 2378-2387.
94. Walker,K.A., Mallik,P., Pratt,T.S., and Osuna,R. (2004) . The Escherichia coli Fis promoter is regulated by changes in the levels of its transcription initiation nucleotide CTP. *J. Biol. Chem.* *279*, 50818-50828.
95. Watson,S.P., Antonio,M., and Foster,S.J. (1998) . Isolation and characterization of Staphylococcus aureus starvation-induced, stationary-phase mutants defective in survival or recovery. *Microbiology* *144* (Pt 11) , 3159-3169.
96. Winkler,W.C. and Breaker,R.R. (2005) . Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.* *59*, 487-517.
97. Yamagishi,M., de Boer,H.A., and Nomura,M. (1987) . Feedback regulation of rRNA synthesis. A mutational alteration in the anti-Shine-Dalgarno region of the 16 S rRNA gene abolishes regulation. *J. Mol. Biol.* *198*, 547-550.

98. Yang,X.J. and Gregoire,S. (2007) . Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nepsilon - and O-acetylation. *EMBO Rep.* *8*, 556-562.
99. Zengel,J.M. and Lindahl,L. (1994) . Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *47*, 331-370.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
------------------	-----------	----------	-----------------	----------