

# Abstrakt

## Interakce vybraných bílkovin s RNA polymerázou z *Bacillus subtilis*

Bakterie jsou schopny se přizpůsobit měnícím se vnějším podmínkám díky regulaci genové exprese. Nejvýznamnější úrovní regulace genové exprese je fáze transkripce, kterou realizuje vícepodjednotkový enzym – RNA polymeráza (RNAP). Klíčovým momentem transkripce je iniciace transkripce, kdy se rozhoduje o budoucnosti buňky. Tuto fázi výrazně ovlivňuje podjednotka  $\delta$  RNAP vyskytující se u gram-pozitivních bakterií. Fyziologická role tohoto proteinu není doposud dostatečně objasněna. Strukturně se podjednotka  $\delta$  rozčleňuje na strukturovanou, vysoce konzervovanou N-koncovou doménu a flexibilní, záporně nabitou C-koncovou doménu.

Tato práce se zabývá charakterizací podjednotky  $\delta$  RNAP z *Bacillus subtilis*.

U *Streptococcus pneumoniae* byla nalezena interakce podjednotky  $\delta$  RNAP s proteinem SP\_2234 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému. Identifikovali jsme homologní proteiny u *B. subtilis* – YxbF a YwcC jako možné interakční partnery  $\delta$ . Geny *yxbF* a *ywcC* byly zaklonovány, exprimovány v *E. coli* a izolovány pomocí afinitní chromatografie. Protein YxbF se podařilo připravit v rozpustné formě a dostatečné koncentraci. Protein YwcC se připravit nepodařilo; další experimenty byly provedeny s YxbF. Radioaktivně naznačená podjednotka  $\delta$  byla použita při studiu interakce mezi  $\delta$  a YxbF pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy. Bylo zjištěno, že se YxbF neváže na podjednotku  $\delta$  RNAP. Zároveň YxbF nepomáhá podjednotce  $\delta$  při vazbě na RNAP. Dále byl studován vliv proteinu YxbF na transkripci a transkripční experimenty *in vitro* ukázaly absenci tohoto vlivu. Na rozdíl od nalezené interakce podjednotky  $\delta$  RNAP s proteinem SP22\_34 ve *S. pneumoniae*, nebyla tedy prokázána interakce mezi podjednotkou  $\delta$  RNAP a proteinem YxbF u *B. subtilis*. Nicméně interakce proteinu SP22\_34 s  $\delta$  ve *S. pneumoniae* může mít fyziologický význam.

Pro objasnění funkce jednotlivých domén podjednotky  $\delta$  RNAP byly zaklonovány zkrácené varianty genu pro  $\delta$  a byly vytvořeny expresní kmeny *E. coli*. Fragmenty proteinu  $\delta$  byly připraveny metodou afinitní chromatografie k dalším experimentům.

Posledním studovaným aspektem byla bioinformatická analýza aminokyselinové sekvence proteinu  $\delta$ . U řady eukaryotických proteinů, jako např. transkripčních faktorů, byly nalezeny rozsáhlé záporně nabitě oblasti podobné C-koncové doméně proteinu  $\delta$ . Tato doména u  $\delta$  napodobuje nukleové kyseliny a zvyšuje specifitu RNAP vůči promotorové DNA. Tyto negativně nabitě oblasti by mohly hrát podobnou roli i v eukaryotických proteinech. Jednalo by se o nový, obecně se vyskytující typ proteinové domény.