

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Jitka Jirát Matějčková

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

**Interaction of selected proteins with RNA
polymerase from *Bacillus subtilis***

Diplomová práce

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

Praha 2012

Tato práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Laboratoři molekulární genetiky bakterií pod odborným vedením **Mgr. Libora Krásného, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Libora Krásného, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26. dubna 2012

Jitka Jirát Matějčková

Diplomová práce vznikla v letech 2009 - 2012 v rámci grantového projektu P302/11/0855 za podpory Grantové agentury České republiky.

Děkuji svému školiteli Mgr. Liboru Krásnému, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále děkuji Ing. Alžbetě Rabatinové za uvedení do metodiky, cenné rady a spolupráci na projektu. Děkuji i všem svým kolegům za vytvoření příjemného pracovního prostředí a všestrannou pomoc.

V neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost a všeobecnou podporu.

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 δ RNAP vyskytující se u gram-pozitivních bakterií. Fyziologická role tohoto proteinu není doposud dostatečně objasněna. Strukturně se podjednotka δ rozčleňuje na strukturovanou, vysoce konzervovanou N-koncovou doménu a flexibilní, záporně nabitou C-koncovou doménu.

Tato práce se zabývá charakterizací podjednotky δ RNAP z *Bacillus subtilis*.

U *Streptococcus pneumoniae* byla nalezena interakce podjednotky δ RNAP s proteinem SP_2234 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému. Identifikovali jsme homologní proteiny u *B. subtilis* – YxbF a YwcC jako možné interakční partnery δ . 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 δ byla použita při studiu interakce mezi δ a YxbF pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy. Bylo zjištěno, že se YxbF neváže na podjednotku δ RNAP. Zároveň YxbF nepomáhá podjednotce δ 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 δ RNAP s proteinem SP22_34 ve *S. pneumoniae*, nebyla tedy prokázána interakce mezi podjednotkou δ RNAP a proteinem YxbF u *B. subtilis*. Nicméně interakce proteinu SP22_34 s δ ve *S. pneumoniae* může mít fyziologický význam.

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

Posledním studovaným aspektem byla bioinformatická analýza aminokyselinové sekvence proteinu δ . U řady eukaryotických proteinů, jako např. transkripčních faktorů, byly nalezeny rozsáhlé záporně nabitě oblasti podobné C-koncové doméně proteinu δ . Tato doména u δ 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.

klíčová slova: genová exprese, transkripce, regulace iniciace transkripce, RNA polymeráza, podjednotka delta, protein YxbF a YwcC, *B. subtilis*, doména napodobující nukleovou kyselinu

Abstrakt

Interaction of selected proteins with RNA polymerase from *Bacillus subtilis*

Bacteria are able to adapt to changing environmental conditions through the regulation of gene expression. Transcription is the most important level of regulation of gene expression, which carries out the multisubunit enzyme RNA polymerase (RNAP). Transcription initiation is a key step of transcription when decisions are made about the future of the cell. This phase is affected by the δ subunit of RNAP in gram-positive bacteria. The physiological role of this protein is not well understood yet. The δ subunit consists of a structured highly conserved N-terminal domain and a flexible and negatively charged C-terminal domain.

This work focuses on the characterization of the δ subunit of RNAP from *Bacillus subtilis*.

In *Streptococcus pneumoniae*, an interaction between δ and protein SP_2234 was found using yeast two-hybrid system. We identified homologs of SP22_34 in *B. subtilis* – YxbF and YwcC as interaction partners of δ . The genes *ywcC* and *yxbF* were cloned and expressed in *E. coli*. The proteins were purified via affinity chromatography. Protein YxbF was purified in a soluble form. We have not succeeded in preparation of YwcC; further experiments were performed with YxbF. Radioactively labeled protein δ was used to study interactions between δ and YxbF using polyacrylamide electrophoresis. It was found, that YxbF did not bind to the δ subunit of RNAP. YxbF also did not help δ interact with RNAP. Further we studied effects of YxbF on transcription and no effects were detected. Contrary to the interaction of SP22-34 with δ in *S. pneumoniae* no interactions between YxbF and δ of *B. subtilis* were detected. However, the interaction between δ subunit of RNAP and the protein SP22_34 in *S. pneumoniae* may be physiologically significant.

To clarify the function of each domain of the δ subunit of RNAP, truncated versions of the gene were cloned and expressed in *E. coli*. Protein fragments of δ were prepared by affinity chromatography for further experiments.

Finally, we performed a bioinformatical analysis of the amino acid sequence of δ . In a number of eukaryotic proteins, such as transcription factors, we found extended negatively charged regions reminiscent of the C-terminal domain of delta. This domain mimics nucleic acids and increases the specificity of RNAP for promoter DNA. These negatively charged regions could play a similar role in eukaryotic proteins. It would represent a novel general type of a protein domain.

keywords: gene expression, transcription, regulation of transcription initiation, RNA polymerase, delta subunit, protein YxbF and YwcC, *B. subtilis*, nucleic acid mimic domain

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	8
Úvod	10
1 Adaptace bakterie	11
1.1 Bakterie <i>Bacillus subtilis</i>	11
2 Genová exprese	12
2.1 Transkripce	12
2.2 Posttranskripční modifikace	13
2.3 Translace	13
2.4 Posttranslační modifikace	14
3 Transkripce	15
3.1 Obecné uspořádání promotoru	15
3.2 Bakteriální RNAP	16
3.3 Podjednotky bakteriální RNAP (<i>E. coli</i>)	17
3.3.1 Srovnání RNAP <i>B. subtilis</i> a <i>E. coli</i>	20
3.3.2 Mechanismus iniciace transkripce	20
3.3.3 Molekulární mechanismus syntézy RNA	23
4 Regulace transkripce	24
5 Regulace iniciace transkripce	27
5.1 Regulace pomocí malých molekul	28
5.2 CarD (YdeB)	32
5.3 Podjednotka δ RNAP	34
5.3.1 Efekty podjednotky δ pozorované <i>in vitro</i>	34
5.3.2 Efekty podjednotky δ pozorované <i>in vivo</i>	36
5.3.3 Pozice δ na RNAP	39
5.4 Proteiny YxbF a YwcC	40
5.4.1 YxbF	40
5.4.2 YwcC	41
6 Materiál a metody	43
6.1 Přístroje	43
6.2 Chemikálie, enzymy a další preparáty	44
6.3 Používané bakteriální kmeny a plasmidové konstrukty	46
6.4 Práce s DNA	48
6.4.1 Izolace plasmidové DNA z <i>Escherichia coli</i> DH5 α	48
6.4.2 Purifikace plasmidové DNA fenolem, chloroformem	51
6.4.3 Precipitace plasmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného	51
6.4.4 Měření optické denzity (OD)	52

6.4.5	Analýza plasmidové DNA restrikčním štěpením	52
6.4.6	Elektroforetická analýza DNA	53
6.4.7	Izolace DNA z gelu	54
6.4.8	Klonování DNA	55
6.5	Metody práce s proteiny	59
6.5.1	Exprese a izolace podjednotky δ RNAP z <i>B. subtilis</i>	59
6.5.2	Exprese a izolace RNAP z <i>B. subtilis</i>	60
6.5.3	Exprese a izolace proteinů YxbF a YwcC	61
6.5.4	Dialýza - pročištění proteinového izolátu	62
6.5.5	Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové	62
6.5.6	Polyakrylamidová elektroforéza proteinů v prostředí SDS (SDS-PAGE)	63
6.5.7	Nativní polyakrylamidová elektroforéza proteinů	63
6.5.8	Značení proteinů pomocí $[\gamma -^{32}\text{P}]$ ATP pomocí Protein kinázy A	64
6.6	Transkripční experimenty	66
7	Cíle diplomové práce	68
8	Výsledky	69
8.1	Hledání vazebných partnerů podjednotky δ RNAP z <i>B. subtilis</i>	69
8.1.1	Experimentální strategie	69
8.1.2	Příprava vektoru pro expresi proteinu YxbF a YwcC	70
8.1.3	Exprese a purifikace proteinů YxbF a YwcC	72
8.1.4	Radioaktivní označení podjednotky δ	72
8.1.5	Studium interakce mezi δ a YxbF	73
8.1.6	Může YxbF pomáhat δ při interakci s RNAP?	74
8.1.7	Efekt YxbF na transkripci <i>in vitro</i>	76
8.2	Příprava zkrácených variant podjednotky δ RNAP z <i>B. subtilis</i>	82
8.2.1	Příprava vektoru pro expresi fragmentů δ	82
8.2.2	Exprese a purifikace proteinů $1/2 N\delta$ a $3/4 N\delta$	84
8.3	Hledání homologů/analogů proteinu δ v jiných organismech	85
9	Diskuze	87
9.1	Hledání vazebných partnerů podjednotky δ RNAP	87
9.2	Příprava zkrácených variant podjednotky δ RNAP	89
9.3	Hledání homologů/analogů proteinu δ v jiných organismech	91
10	Shrnutí	93
	Seznam citované literatury	95

Seznam zkratek a symbolů

AA	akrylamid
AK	aminokyselina
ATP	adenosin-5'-trifosfát
bp	páry bazí (base pairs)
BSA	hovězí sérum albumin
CarN ^{Ter}	N-koncová doména proteinu CarD
CTD	C-koncová doména
Da	jednotka molekulové hmotnosti
$\Delta\delta$ RNAP	RNA polymeráza bez podjednotky delta
ddH ₂ O	deionizovaná voda
dH ₂ O	destilovaná voda
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
dsDNA	dvouvláknová DNA (double strand)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
E σ	jádro RNAP s navázanou podjednotkou σ , RNAP holoenzym
FBP	fruktóza-1,6-bisfosfát
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HPr	histidin obsahující protein
iH ₂ O	injekční voda
I	intermediát komplexu RNAP a promotorové DNA
IMP dehydrogenasa	inosin monofosfát dehydrogenáza
iNTP	iniciační nukleosid trifosfát
IPTG	isopropyl-B-D-1-thiogalaktopyranosid
kb	kilobáze (tzn. tisíc bazí)
LD	spojovací doména u podjednotky σ
mRNA	messenger RNA
N δ	N-koncová doména podjednotky δ

NK	nukleová kyselina
NTD	N-koncová doména
nt	nukleotid
NTP	nukleosid trifosfát
OD	optická denzita
pI	isoelektrický bod
ppGpp	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
pppGpp	guanosin-5'-trifosfát-3'-difosfát
RNAP	RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
RP _C	uzavřený komplex RNAP a promotorové DNA
RP _e	elongační komplex RNAP a DNA
RP _O	otevřený komplex RNAP a promotorové DNA
rRNA	ribosomální RNA
SDS	dodecyl sulfát sodný
ssDNA	jednovláknová DNA (single strand)
TAE	trisacetátový pufr
Tet ^R	tetracyklin rezistentní
tRNA	transferová RNA
wt RNAP	divoký typ RNA polymerázy
[YxbF]	koncentrace YxbF

Úvod

Bakterie jsou schopny přežít v nejrůznějších podmínkách. Dokázaly se za dobu své existence rozšířit do nejrozmanitějších prostředí. Obývají vulkanické krátery, ledová moře, vnitřky i povrchy jiných buněk a jsou schopny přežít i ve vesmíru. Životaschopnost bakteriálních buněk souvisí se schopností rychle reagovat na změny vnějšího prostředí, cíleně regulovat molekulární mechanismy genové exprese a přizpůsobit se tak aktuálním podmínkám.

Genová exprese je proces, při kterém je genetická informace obsažená ve formě DNA realizována do konkrétních buněčných struktur. První fáze genové exprese – transkripce, je zajišťována DNA dependentní RNA polymerázou, která přepisuje DNA do vlákna RNA. Druhá fáze genové exprese – translace, je proces, kdy je využita genetická informace obsažená v mRNA k syntéze proteinů a je zajišťována translačním aparátem buňky. Genová exprese je regulována tak, aby docházelo k efektivní odpovědi na aktuální situaci.

Klíčovým momentem pro regulaci genové exprese je bezesporu fáze iniciace transkripce, kdy se rozhoduje o budoucnosti buňky. Iniciaci transkripce výrazně ovlivňuje i podjednotka δ RNA polymerázy, která se vyskytuje u gram-pozitivních bakterií. Podjednotka δ ovlivňuje virulenci některých patogenních bakterií, ale její přesná fyziologická funkce a molekulární mechanismy pozorovaných efektů nejsou doposud dostatečně objasněny.

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací podjednotky δ RNA polymerázy u modelového organismu gram-pozitivních bakterií *Bacillus subtilis*. Cílem bylo ozřejmit, se kterými proteiny v buňce podjednotka δ interaguje a jak společně ovlivňují transkripci. Dále bylo cílem přispět k poznání, jaká je funkce jednotlivých domén podjednotky δ a jestli jsou tyto domény unikátní pro podjednotku δ nebo se podobají proteinům z jiných organismů.

Literární přehled

1 Adaptace bakterie

Každá bakteriální buňka se neustále musí přizpůsobovat vnějším podmínkám prostředí. Životaschopnost bakteriální buňky úzce souvisí se schopností rychle a cíleně reagovat na tyto změny. Z těchto důvodů si bakterie vyvinuly širokou škálu mechanismů, které jim zprostředkovávají informace z okolí a zaručují adekvátní odpověď.

1.1 Bakterie *Bacillus subtilis*

B. subtilis je půdní, nepatogenní bakterie tyčinkovitého tvaru schopná sporulace. *B. subtilis* náleží do skupiny gram-pozitivních bakterií a reprezentuje tuto skupinu bakterií jako modelový organismus. Je intenzivně studovaným zástupcem skupiny mikroorganismů s nízkým obsahem párů G + C. Systematicky je zařazen do kmene *Firmicutes*. Genom *B. subtilis* tvoří jediný chromozom nesoucí přibližně 4 100 genů. Postupnou systematickou inaktivací bylo zjištěno, že genom *B. subtilis* obsahuje 271 esenciálních genů (Kobayashi *et al.*, 2003).

Výhodou tohoto modelového organismu je jeho schopnost přejít do fyziologického stavu označovaného jako kompetence. Je to stav, do kterého přechází bakterie při nedostatku živin na začátku stacionární fáze růstu. V tomto stavu je také bakterie schopna přijmout vysokomolekulární cizorodou DNA. Následně se tato DNA může integrovat do chromozomu (Dubnau and Losick, 2006).

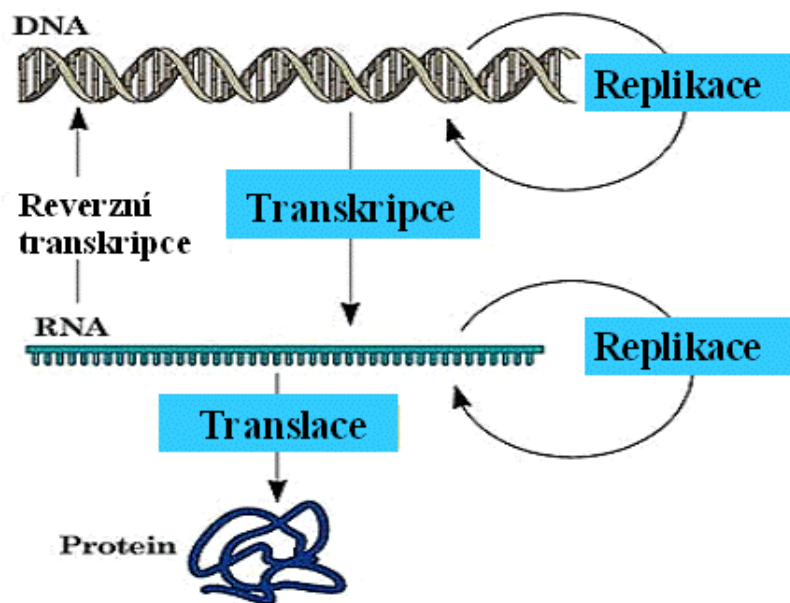
Rozmnožování *B. subtilis* probíhá klasickým dělením. Za nepříznivých podmínek je schopen sporulace, tedy alternativního vývojového stádia. Při sporulaci se tvoří endospory, které jsou odolné vůči vysoké teplotě, působení solí a kyselin. Právě díky sporulaci jsou tyto bakterie schopny přežít jak nepříznivé podmínky, tak i nedostatek živin. V minulosti byla sporulace u *B. subtilis* intenzivně studována (Piggot and Hilbert, 2004).

B. subtilis je často v průmyslu využíván k extracelulární produkci proteinů, enzymů a antibiotik (Ara *et al.*, 2007).

2 Genová exprese

Genová exprese je proces, při kterém je genetická informace obsažená ve formě DNA realizována do konkrétních buněčných struktur. Produkty exprese genů jsou RNA a proteiny. Tyto produkty slouží pro regulaci a udržení životních funkcí buňky. Proces genové exprese probíhá ve dvou hlavních krocích (zobrazených na obr. 1):

1. Transkripce – přepis DNA do RNA – zajišťuje DNA dependentní RNA polymeráza (RNAP)
2. Translace – překlad RNA do proteinu – zajišťuje translační aparát buňky



Obrázek 1: Obecné schéma genové exprese. Převzato z <http://www.sekk.cz/Prodej/encyklopedie/SJATJ.htm>.

2.1 Transkripce

Transkripce u bakterií je zajišťována jedinou RNA polymerázou. Ta je zodpovědná za tvorbu stabilních RNA (tRNA a rRNA), protein kódujících RNA (mRNA) i malých nekódujících RNA. Tato všestrannost bakteriální RNAP je zajištěna interakcemi s různými kofaktory a s kódující sekvencí templátové DNA (Lewis *et al.*, 2008).

Transkripce je proces, při kterém RNAP nasedá na dvoušroubovici DNA (dsDNA), rozplete obě vlákna od sebe a zahájí přepis DNA vlákna podle principu komplementarity do vlákna RNA. Proces transkripce lze rozdělit do třech stupňů:

1. Iniciacce (zahájení) je fáze transkripce, kdy se RNAP váže na specifickou sekvenci DNA zvanou promotor. Tím je vytvořen tzv. uzavřený komplex (RP_C). V tomto komplexu

je DNA kompletně dvouvláknová. Poté uzavřený komplex přechází přes konformační mezistupně do otevřeného komplexu (RP_O), kde jsou vlákna DNA oddělena od sebe (v oblasti -11 až +3, v +1 pozici začíná transkripce) a je vytvořena transkripční bublina. V otevřeném komplexu je pozice +1 templátového vlákna připravena k přiřazení iniciačního nukleosidtrifosfátu (iNTP) a následnému zahájení syntézy RNA vlákna (Haugen *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2010).

2. Elongace je fáze transkripce, kdy RNAP opouští promotor (*promotor escape*) a posunuje se podél řetězce DNA (*promotor clearance*). Podle templátového řetězce postupně syntetizuje novou RNA. Připojuje komplementární nukleotidy na volnou 3' OH skupinu ribosy. Vznikající RNA se postupně uvolňuje z elongačního komplexu a dvoušroubovice DNA samovolně obnovuje svou původní konformaci (Vassylyev, 2009).
3. Terminace je proces ukončení syntézy a úplné uvolnění nově syntetizované RNA. Terminace je kódována speciálními sekvencemi DNA ve struktuře (terminátory). U bakterií jsou známy dva hlavní modely terminace: Rho-nezávislá využívající mRNA elementy (*cis-acting*) a Rho-závislá vyžadující terminační proteinový faktor Rho a mRNA elementy (*trans-acting*) (Ciampi, 2006).

2.2 Posttranskripční modifikace

Většina molekul RNA je syntetizována ve formě prekurzorů (zejména stabilní RNA molekuly rRNA a tRNA). Aby mohly vykonávat funkci ke které jsou určeny, musí být upraveny do své finální podoby. Úprava RNA prekurzorů se nazývá RNA maturace.

Obecně lze říci, že jednotlivé RNA jsou vystříženy ze svých prekurzorů pomocí endonukleáz, následně jsou upraveny jejich 3' a 5' konce. Maturovaná RNA je chráněna před rychlou degradací a je schopna plnit svou funkci. Naopak významná posttranskripční modifikace – polyadenylace 3' konce urychluje degradaci mRNA u bakterií (Condon, 2003; Deutscher, 2006).

Pravděpodobně nejznámějším případem posttranskripční modifikace je modifikace tRNA. Stupeň modifikace tRNA může reagovat v některých případech na změny v okolním prostředí. Také v různých fázích bakteriálního růstu se modifikace tRNA liší. Např. u mutantních buněk defektních v tRNA modifikaci byla mnohokrát nalezena změněná patogenicita nebo metabolická aktivita (Emilsson *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1997).

2.3 Translace

Translace je proces, kdy je využita genetická informace obsažená v mRNA k syntéze proteinů. „Nabité“ tRNA, nesoucí každá určitou aminokyselinu, jsou přenášeny na ribosom pomocí elongačního faktoru Tu. Zde jsou párovány s odpovídajícím tripletem kódovaným mRNA (označovaných jako kodon). Aminokyseliny jsou připojovány ke vznikajícímu polypeptidu a posun mRNA je zajištěn elongačním faktorem G. Tento proces je prováděn tak dlouho, dokud se neobjeví stop kodon a translace je ukončena (Shoji *et al.*, 2009).

Regulace translace probíhá zejména v těchto krocích: konformace mRNA a tRNA, správná funkce aminoacyl-tRNA syntetázy (připojení správné aminokyseliny k tRNA), správné párování mRNA kodonu s nabitou tRNA (Ibba and Söll, 1999).

2.4 Posttranslační modifikace

Po dokončení translace mohou být proteiny modifikovány, aby získaly svou konečnou podobu a mohly plnit požadovanou funkci. Modifikace proteinů záleží zejména na chemických skupinách na jejich povrchu. Nejčastěji se jedná o acetylaci, fosforylaci, metylaci atd. (Yang and Gregoire, 2007).

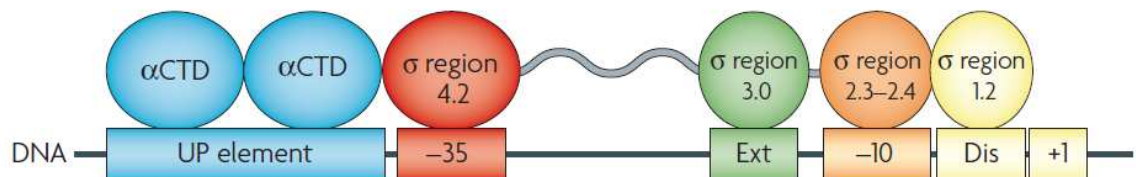
Příkladem významných posttranslačních modifikací je skupina antibiotik produkovaná *B. subtilis* - lantibiotika. Lantibiotika vznikají posttranslační modifikací prekurzorového peptidu, která zahrnuje dehydrataci serinů a threoninů. Následně vzniká lanthionin připojením sousedního cysteinu přes thiolovou skupinu. Antibakteriální účinek těchto látek je založen na tvorbě pórů do cytoplasmatické membrány u gram-pozitivních bakterií (Stein, 2005).

3 Transkripce

3.1 Obecné uspořádání promotoru

Promotorová oblast DNA je zásadní pro správný start transkripce. Čte se ve směru od 5' konce k 3' konci kódujícího (netemplátového) vlákna. Pozice +1 značí místo, ke kterému je přiřazen první nukleotid, od kterého začíná transkripce. Sekvence, která je za iniciačním nukleotidem po směru transkripce, má kladné znaménko. Sekvence protisměru transkripce je označována záporným znamínkem (nukleotid v pozici 0 neexistuje). Oblast promotoru rozdělujeme na tyto úseky (pro názornost jsou zobrazeny na obr. 2):

- **UP element** – AT bohatá oblast mezi -60 a -40, na kterou se váže u některých promotorů C-koncová oblast podjednotky α (Ross *et al.*, 2001; Haugen *et al.*, 2008a).
- **hexamer -35** – jeho konsensus sekvence je určena 5'-TTGACA-3' (u *E. coli* a *B. subtilis*). Tato oblast se s hexamerem -10 udává jako nejdůležitější oblast pro rozeznání promotoru podjednotkou σ RNAP. Hexamer -35 interaguje s oblastí 4.2 podjednotky σ (deHaseth *et al.*, 1998).
- **mezerník** – oblast oddělující hexamery -35 a -10 o optimální délce 17 bazí (u *E. coli*) (Murakami *et al.*, 2002). Interaguje s N-koncovou doménou podjednotky β' (oblast, která svou vazbou ovlivňuje stabilitu navázaného komplexu RNAP se nazývá β' zipper) (Yuzenkova *et al.*, 2011).
- **rozšířená oblast -10** – rozeznává ji oblast 3.0 podjednotky σ . Nachází se jednu bázi proti směru transkripce od hexameru -10 a je určena konsensus sekvencí 5'-TG-3' (v pozici -14/-15) (Mitchell *et al.*, 2003).
- **hexamer -10** – též nazýván jako TATA box nebo Pribnowův box. Jeho konsensus sekvence je 5'-TATAAT-3' a interaguje s oblastí 2.3 a 2.4 podjednotky σ (Haugen *et al.*, 2008a; deHaseth *et al.*, 1998).
- **oblast mezi -10 a +1** – oblast promotoru mezi iniciačním nukleotidem a 3' okrajem hexameru -10, která má vliv na iniciaci transkripce. Pokud je GC bohatá, je nazývána jako diskriminátor (např. u *E. coli*). Tato oblast promotoru interaguje s oblastí 1.2 podjednotky σ a sekvence této oblasti je důležitá pro stabilitu otevřeného komplexu (Pemberton *et al.*, 2000; Haugen *et al.*, 2008a).

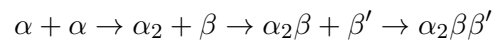


Obrázek 2: Obecné uspořádání sekvence promotoru a domén podjednotek RNAP vázající se na promotor (Haugen *et al.*, 2008a).

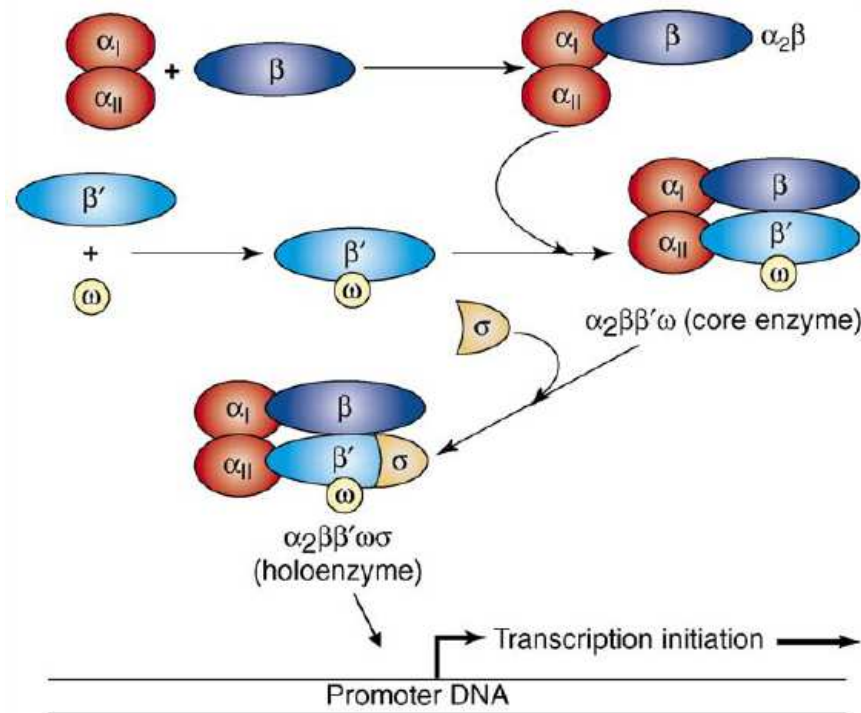
3.2 Bakteriální RNAP

Transkripci u bakterií provádí enzym RNA polymeráza (DNA dependentní RNA polymeráza, RNAP). Protože na rozdíl od eukaryot je to jediný enzym katalyzující transkripci v buňce, zodpovídá tak za veškerou syntézu RNA. Katalytické jádro (E) s molekulovou hmotností přibližně 400 kDa je tvořeno pěti podjednotkami – dimerem podjednotek α (α_2), dále z podjednotek β , β' a ω (Sweetser *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1999). Homodimer podjednotek α tvoří strukturální lešení pro podjednotky β a β' , které mají katalytickou funkci. Podjednotka ω není esenciální pro buňku, ale pomáhá při vazbě β' na ostatní podjednotky. Všechny tyto podjednotky jsou vysoce konzervované, jak v bakteriální a eukaryotní říši, tak i u archeí (Nanamiya *et al.*, 2008).

Skládání podjednotek RNAP probíhá v tomto pořadí (viz obr. 3) (Mathew and Chatterji, 2006):



Jádro RNAP samo o sobě není schopno rozeznat sekvenci promotoru. Tuto funkci, která je zásadní pro iniciaci transkripce, zastává právě podjednotka σ . Složením všech zmíněných podjednotek vzniká komplex zvaný RNAP holoenzym ($E\sigma$), který dokáže rozpoznat sekvenci promotoru, navázat se na něj a iniciovat transkripci (Campbell *et al.*, 2002).



Obrázek 3: Skládání podjednotek RNAP. Dvě α podjednotky interagují a vytváří dimer ($\alpha_1\alpha_{II}$). Následně se připojí β podjednotka a vytváří $\alpha_1\alpha_{II}\beta$ komplex. Jádro RNAP je vytvořeno připojením zmiňovaného komplexu a β' s navázanou ω . Navázáním podjednotky σ je vytvořen holoenzym, který je schopen rozpoznat promotor a iniciovat transkripci (Mathew and Chatterji, 2006).

3.3 Podjednotky bakteriální RNAP (*E. coli*)

alfa Podjednotka α je tvořena cca 330 AK a její molekulová hmotnost je 36 kDa. Kóduje ji gen *rpoA*. Je rozdělena na dvě domény. Větší N-koncová doména (α NTD) se podílí na dimerizaci α podjednotek a zodpovídá za vazbu β a β' . Kratší C-koncová doména (α CTD) se váže na DNA a zvyšuje stabilitu vazby RNAP na promotor (interaguje s UP elementem promotoru) (Gourse *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2001).

Podjednotka α tvoří homodimer dvou sekvencně identických podjednotek α (α_2). Každá z podjednotek α dimeru se váže na jinou část RNAP. Podjednotka α_I váže podjednotku β a α_{II} váže podjednotku β' (Minakhin *et al.*, 2001).

Zajímavostí je bakterie *Franciscella*, která má dva odlišné geny kódující podjednotky α . Tyto podjednotky tvoří heterodimer v RNAP. Efektivní složení všech podjednotek RNAP požaduje obě podjednotky: α_I i α_{II} (Mukhamedyarov *et al.*, 2011).

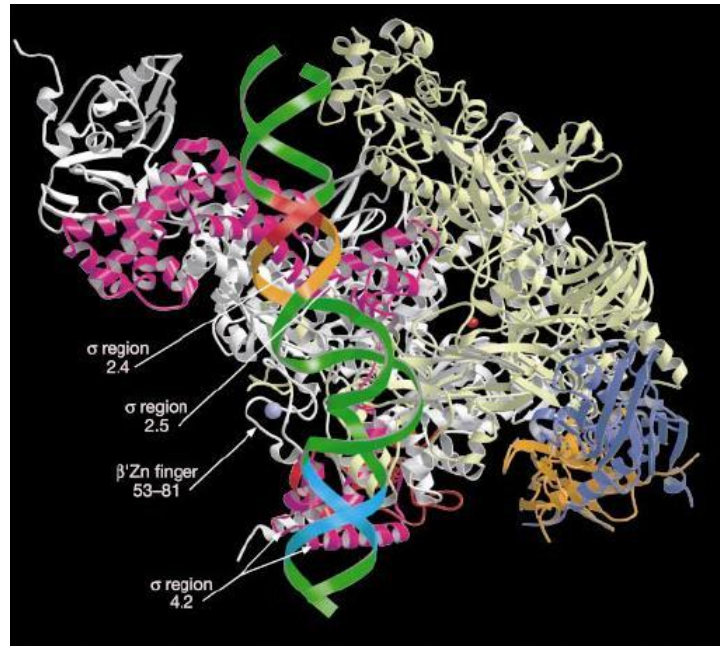
beta Podjednotka β je tvořena cca 1340 AK a její molekulová hmotnost je přibližně 150 kDa (Browning and Busby, 2004). Je kódována genem *rpoB*. Dohromady s podjednotkou β' zaujímá charakteristický tvar krabího klepeta a tvoří katalytické centrum RNAP, jak je zobrazeno na obrázku 4. Na tuto podjednotku se váží některá antibiotika inhibující transkripci (např. rifampicin, sorangicin a streptolydigin) (Gentry and Burgess, 1993; Yang and Price, 1995; Campbell *et al.*, 2005).

Gen *rpoB* je vysoce konzervovaný a díky tomu může být využíván při fylogenetických analýzách a objevování nových bakteriálních druhů podobně jako 16S rRNA (Adekambi *et al.*, 2009).

beta' Podjednotka β' je tvořena přibližně 1400 AK s molekulovou hmotností cca 155 kDa. Je kódována genem *rpoC*. Uplatňuje se zejména při vazbě na DNA do oblasti mezerníku na promotoru. Její N-koncová doména se váže na pozici -22 templátového a -27 netemplátového vlákna. Dále se uplatňuje i při terminaci transkripce (Murakami *et al.*, 2002; Gentry and Burgess, 1993).

omega Podjednotka ω je nejmenší podjednotkou RNAP. Tvoří ji 91 AK a její molekulová hmotnost je 10 kDa (Burgess, 1969). Je kódována genem *rpoZ*. Tento gen se nachází ve stejném operonu jako *spoT* (který kóduje enzym syntetizující a degradující (p)ppGpp) a bylo prokázáno, že ω hraje roli v regulaci stringentní odpovědi. Dále ovlivňuje iniciaci transkripce a přispívá k přežití stacionární fáze (Mathew and Chatterji, 2006; Vrentas *et al.*, 2005).

Podjednotka ω není esenciální pro funkci RNAP. Delecí genu *rpoZ* bylo zjištěno, že je pro buňku postradatelná a transkripce může probíhat i bez její přítomnosti (Gentry and Burgess, 1989). Podjednotka ω váže podjednotku β' a podílí na uspořádání RNAP (asociace β' s $\alpha_2\beta$) (Minakhin *et al.*, 2001).



Obrázek 4: Krystalová struktura holoenzymu RNAP s DNA u *T. thermophilus*. Obrázek znázorňuje navázání RNAP na promotorovou oblast a tvorbu uzavřeného komplexu. Zeleně je zobrazena dsDNA, modře hexamer -35, oranžově hexamer -10 (Vassylyev *et al.*, 2002).

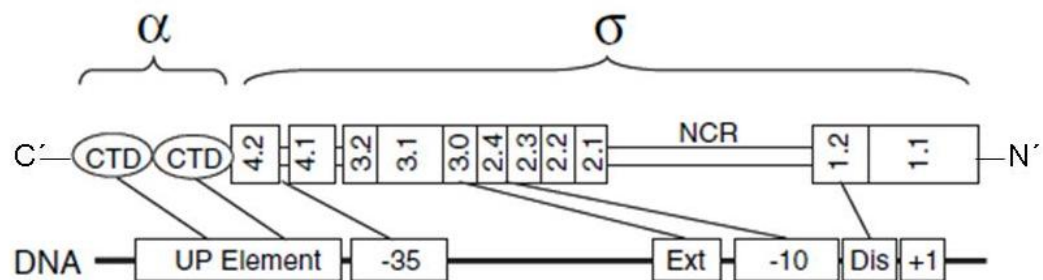
sigma Podjednotka σ (nazývána také jako faktor σ) je nepostradatelná pro správné zahájení transkripce. Během iniciace transkripce rozpoznává sekvenci promotoru a váže na něj RNAP. Pouze RNAP holoenzym ($E\sigma$) je schopen rozpoznat promotor. Podjednotka σ se významně podílí na oddělení DNA vláken a tvorbě transkripční bubliny i při procesu *promotor escape* a *clearance*. Experimenty s nenávanou podjednotkou σ ukázaly, že je auto-inhibována a neváží se na ni promotorové elementy ani známé transkripční aktivátory (Borukhov and Severinov, 2002; Campbell *et al.*, 2002; Vassylyev *et al.*, 2002). Pravděpodobnou hlavní roli v auto-inhibici hraje N-koncová část podjednotky σ (oblast 1.1), která udržuje kompaktnost celého proteinu a brání vazbě σ na promotor (Schwartz *et al.*, 2008). Nicméně nedávné výsledky naznačují možnost vazby samotné σ na promotorovou DNA do oblasti -10 (Yeh *et al.*, 2011; Sevim *et al.*, 2011).

Bakteriální podjednotky sigma se řadí do dvou nepříbuzných rodin : σ^{70} a σ^{54} (Gruber and Gross, 2003).

- **Do rodiny σ^{70}** patří ty, které tvoří promotorový komplex za nepřítomnosti dalších faktorů či energie (Borukhov and Severinov, 2002; Gruber and Gross, 2003). Podjednotka σ z této rodiny byla rozdělena do strukturních domén a jednotlivých oblastí. Tyto oblasti byly očíslovány podle vzdálenosti od N' konce (viz obr. 5). Podjednotka σ je rozdělena do již zmíněných čtyř základních domén: N-koncová doména 1, N-koncová doména 2, spojovací doména a C-koncová doména. Nejvýznamnější je oblast 4.2 (v C-koncové doméně), která interaguje s hexamerem -35 promotoru a oblast 2.4 (v N-koncové doméně 2), která rozeznává a váže oblast -10 promotoru (viz kapitola 3.1 na straně 15) (Vassylyev *et al.*, 2002).

Genomy bakterií obsahující faktor σ z rodiny σ^{70} mohou mít tento faktor v zastoupení od jednoho (např. *Mycoplasma sp.*) až po více než 60 faktorů (u *Streptomyces coelicolor*). *E. coli* obsahuje 6 faktorů σ z rodiny σ^{70} , zatímco *B. subtilis* obsahuje 18 faktorů z rodiny σ^{70} . U gram pozitivních bakterií se vyskytuje vyšší počet σ faktorů, což je vysvětlováno potřebou mnoha faktorů k regulaci sporulace (Gruber and Gross, 2003).

- Druhá, minoritní rodina sigma faktorů se nazývá rodina σ^{54} . Do rodiny σ^{54} patří ty faktory, které tvoří promotorový komplex na promotoru za přítomnosti dalších proteinových faktorů. Na svou činnost spotřebovávají energii získanou hydrolyzou ATP či GTP (Borukhov and Severinov, 2002). Rodina σ^{54} tedy využívá odlišnou cestu při formaci otevřeného komplexu než σ^{70} . Na rozdíl od σ^{70} , která interaguje N-koncovou doménou s DNA, σ^{54} ji potřebuje pro svou aktivaci (Wigneshweraraj *et al.*, 2000). Holoenzym tvořený σ^{54} s RNAP se na rozdíl od σ^{70} rozeznává konsensus sekvenci -24 a -12, kde jsou velmi bohaté oblasti na GC (Burrows *et al.*, 2003). *E. coli* obsahuje pouze jeden faktor σ z této rodiny a tato rodina faktorů σ je obecně minoritní (Wigneshweraraj *et al.*, 2000). U *B. subtilis* byl nalezen pouze jeden ekvivalentní faktor σ k σ^{54} kódovaný genem *sigL* (Debarbouille *et al.*, 1991).
- Zvláštním případem je **2-podjednotkový faktor σ** *B. subtilis* složený z proteinů YvrI a YvrHa. YvrI obsahuje doménu podobnou oblasti 4 podjednotky σ^{70} , který se váže na podjednotku β . YvrHa obsahuje doménu podobnou oblasti 2 podjednotky σ^{70} a váže se na podjednotku β' . Protein YvrHa hraje esenciální roli při stabilizaci otevřeného komplexu RNAP a interaguje s N-koncovou doménou proteinu YvrI. Protein YvrHa se nejspíše váže na hexamer -10 na promotoru, zatímco YvrI interaguje s hexamerem -35 (shodné s funkcemi homologních σ regionů). Po spojení těchto dvou podjednotek faktoru σ je umožněna efektivní iniciace transkripce (MacLellan *et al.*, 2009).



Obrázek 5: Schématické zobrazení interakcí RNAP holoenzymu s promotorem. Čáry naznačují interakce mezi podjednotkami a s RNAP s jednotlivými oblastmi promotoru (Haugen *et al.*, 2008b).

3.3.1 Srovnání RNAP *B. subtilis* a *E. coli*

Celkový tvar RNAP je konzervován napříč bakteriální říší. Přesto můžeme mezi RNAP z jednotlivých organismů najít zásadní rozdíly ve struktuře i mechanismech regulace transkripce. Klíčové části RNAP, zajišťující hlavní mechanismy transkripce, jsou kódovány v evolučně konzervovaných regiorech, zatímco na povrchu enzymu jsou variabilní proteiny zprostředkovávající interakci s regulačními proteiny. Zatím nejsou známy kompletní informace (struktura, biochemie, genetika) ani o jedné bakteriální RNAP (Zhang *et al.*, 1999; Artsimovitch *et al.*, 2000).

Hlavní rozdíly v RNAP a transkripci mezi *B. subtilis* a *E. coli* (Achberger and Whiteley, 1980; Artsimovitch *et al.*, 2000):

- RNAP z *B. subtilis* je menší oproti RNAP z *E. coli*.
- RNAP z *B. subtilis* se skládá navíc z dalších dvou podjednotek: podjednotky δ (viz kapitola 5.3) a ω_1 (nově byl navržen název ε , kódovaná genem *yzkG*). U *E. coli* se vyskytuje pouze jediná ω (homolog ω_2 u *B. subtilis*) (Doherty *et al.*, 2010).
- RNAP z *B. subtilis* tvoří holoenzym s podjednotku σ^A (43 kDa). *E. coli* interaguje s podjednotku σ ze stejné rodiny (σ^{70}), jejíž molekulová hmotnost je přibližně 70 kDa.
- *E. coli* tvoří u většiny promotorů stabilní otevřený komplex při iniciaci transkripce, zatímco *B. subtilis* tvoří nestabilní otevřený komplex.
- 75 % genů u *B. subtilis* je transkribováno ve směru vedoucího vlákna, kdežto u *E. coli* je stejnoměrně přepisováno kódující i nekódující vlákno.
- *B. subtilis* a *E. coli* se liší v rozpoznání terminačních signálů a v mechanismu terminace transkripce.

3.3.2 Mechanismus iniciace transkripce

Po nasednutí RNAP (R) na promotorovou DNA (P), zaujímá zmíněný komplex několik stavů:

- uzavřený komplex (RP_C)
- přechodný komplex (I)
- otevřený komplex (RP_O)
- elongační komplex (RP_e)

Tyto konformační změny nejsou poháněny hydrolýzou ATP, ale vazbou volné energie a tvorbou intermediátů (Haugen *et al.*, 2008a). Průběh iniciace transkripce probíhá podle následujícího schématu (Murakami *et al.*, 2002):



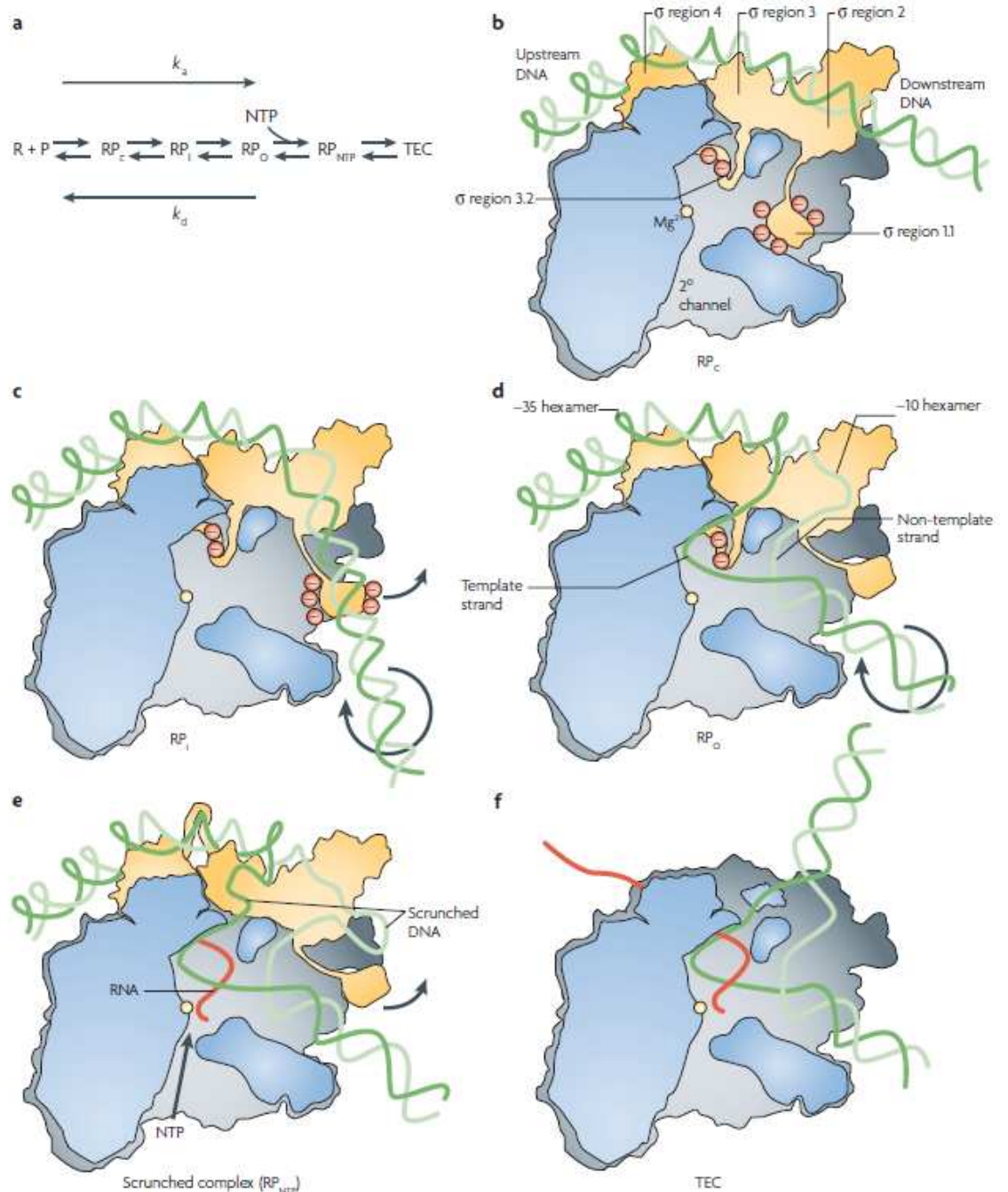
Průběh iniciace transkripce popisuje obr. 6 na straně 22. Nejprve dochází ke kontaktu holoenzymu RNAP s oblastmi promotoru -35 a -10. Hexamer -35 je rozpoznán oblastí 4.2

podjednotky σ a hexamer -10 je rozeznán oblastí 2.4 podjednotky σ . Další významnou oblastí je rozšířená oblast -10 na promotoru, na kterou se váže doména 3 podjednotky σ a s UP elementem interaguje C-koncová doména podjednotky α . Na základě těchto kontaktů RNAP s promotorem se vytvoří uzavřený komplex (RP_C). V tomto komplexu RNAP obklopuje DNA od -55 do +1 a DNA je stále dvouvláknová. Následuje postupné oddělování vláken DNA v oblasti hexameru -10, tzv. tání promotoru. Následuje proces isomerizace (I), při kterém dochází ke konformačním změnám jak RNAP, tak i DNA a tvoří se otevřený komplex (RP_O). V RP_O jsou vlákna DNA rozpletena v rozmezí -11 až +3 a je vytvořena tzv. transkripční bublina. (Haugen *et al.*, 2008a).

Transkripce je iniciována připojením iniciačního nukleosid trifosfátu (iNTP) na +1 pozici templátového vlákna. Dále jsou syntetizovány krátké oligomery o délce 2-9 nukleotidů. Tyto krátké úseky RNA párují s komplementární sekvencí DNA a tvoří tak DNA:RNA hybrid. V počátku polymerace po napojení několika NTP se může syntéza RNA zastavit a RNAP může sklouznout zpět do pozice RP_O . Syntéza těchto krátkých nukleotidů je nazývána abortivní iniciace (RP_{ABORT}). Tyto abortivní transkripty byly pozorovány *in vitro* (Hsu *et al.*, 1995) a následně *in vivo* u *E. coli* (Goldman *et al.*, 2009). Transkripce *in vivo* může být zahájena buď *de novo* pomocí iNTP nebo na základě nanoRNA (2-5 nukleotidů dlouhé oligoribonukleotidy). Způsobem iniciace transkripce může být ovlivněna genová exprese vznikem většího množství transkriptů, vznikem různých 5' konců transkriptů nebo změnou fosforylace na 5' konci transkriptu. Přesná role nanoRNA je nadále studována (Nickels and Dove, 2011).

V následujícím kroku RNAP vytváří elongační komplex (RP_e) a přechází z fáze iniciace do fáze elongace transkripce. RNAP opouští promotor (*promotor escape*) a nově syntetizované vlákno RNA opouští RNAP RNA-exit kanálem. C-koncová doména podjednotky σ blokuje RNA-exit kanál a setkání těchto dvou struktur usnadňuje posun RNAP z oblasti -35 na promotoru. Zároveň je podjednotka σ disociována a RNAP pokračuje v elongaci (Hsu *et al.*, 1995; Vassylyev *et al.*, 2002).

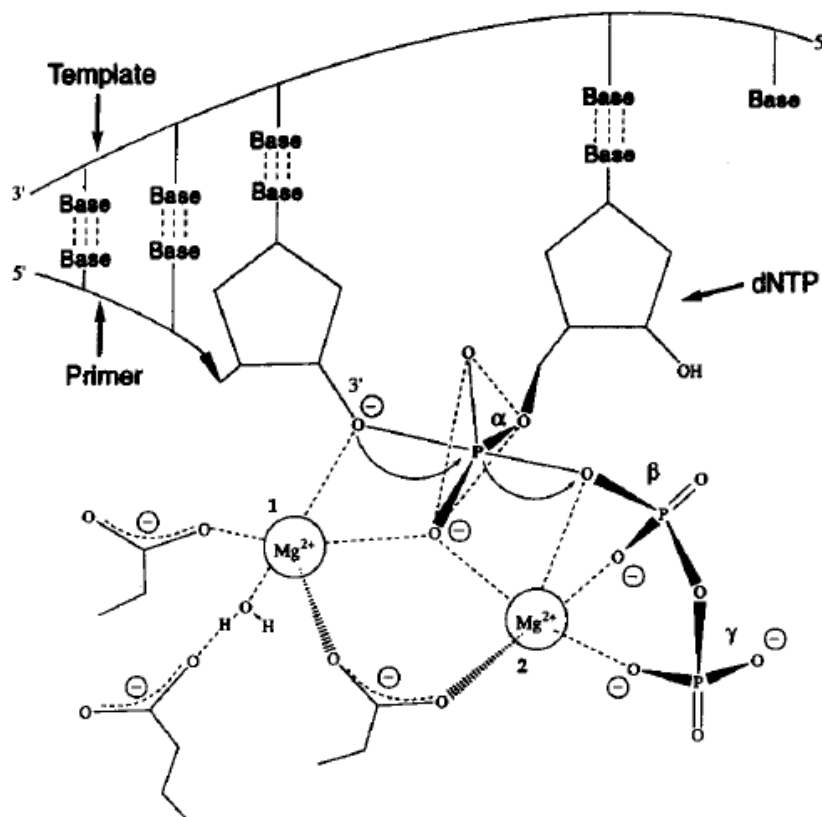
Byl navržen i alternativní mechanismus, při kterém podjednotka σ zůstává navázána na jádro RNAP i v průběhu elongace. Díky konformační změně RNAP podjednotka σ zřejmě neblokuje RNA-exit kanál. Největší množství takto navázaných podjednotek σ bylo nalezeno v průběhu stacionární fáze (Bar-Nahum and Nudler, 2001).



Obrázek 6: Kroky iniciace transkripce: Tmavě zelenou barvou je zobrazeno templátové vlákno, světle zelené netemplátové tedy kódující vlákno, červenou je zobrazen RNA transkript. Katalyzační ionty Mg^{2+} jsou v aktivním místě zobrazeny žlutými kruhy, červeně jsou zobrazeny kyselé aminokyselinové zbytky regionu 1.1 a 3.2 podjednotky σ^{70} . **a** – RNAP se váže na promotor (R+P), přechází přes uzavřený komplex (RP_C), přechodový komplex (I) do otevřeného komplexu (RP_O). Iniciace transkripce je naznačena jako připojení NTP a pokračuje elongace transkripce (TEC). k_a značí asociační konstantu tvorby RP_O a k_d značí disociační konstantu. **b** – V RP_C je DNA dvouvláknová a přesouvá se do hlavního kanálu. **c** – V přechodovém komplexu (I) se region 1.1 σ podjednotky posouvá směrem od aktivního místa a tím se DNA dostává do hlavního kanálu a tvoří se transkripční bublina. **d** – V RP_O se vlákna DNA oddělují a templátové vlákno se posouvá na ideální pozici pro začlenění iNTP. **e** – Syntéza již začala, RNAP těsně před uvolněním z promotoru. **f** – Elongační komplex RNAP opustila σ podjednotka a syntéza transkriptu pokračuje (Haugen *et al.*, 2008a).

3.3.3 Molekulární mechanismus syntézy RNA

Proces polymerace RNA probíhá mechanismem, který je založen na přítomnosti dvou Mg^{2+} iontů v aktivním místě enzymu (RNAP). Tyto dva ionty jsou v blízkosti 3' OH vznikajícího řetězce RNA a α -fosfátu NTP. Polymerace RNA vlákna probíhá mezi 3' OH koncem a α -fosfátem NTP. Mg^{2+} č. 1 zvyšuje kyselost 3' OH skupiny, tvoří se 3' O^- a vzniká kovalentní vazba s α -fosfátem NTP. Mg^{2+} č. 2 usnadňuje odpojení pyrofosfátu, jak je zobrazeno na obr. 7 (Steitz *et al.*, 1994).



Obrázek 7: Mechanismus syntézy RNA. Mg^{2+} č. 1 koordinuje vazbu mezi 3' OH skupinou a α -fosfátem NTP (Steitz *et al.*, 1994).

4 Regulace transkripce

Odhaduje se, že v bakteriální buňce je přes 4000 genů, které musí RNAP přepsat (u *E. coli*) (Ishihama, 2000), aby byly zajištěny všechny zásadní pochody v buňce. Aktivita RNAP nezáleží pouze na vlastnostech promotorů, ale také na koncentraci RNAP v buňce. Pro buňku je nezbytné obsahovat vysokou koncentraci RNAP, protože se vyskytuje v několika formách: přepisuje mRNA a rRNA, nespecificky se váže na DNA, ale existuje i nenavázaná nebo neaktivní RNAP (Klumpp and Hwa, 2008). Tedy koncentrace RNAP je limitující, stejně tak je limitující i množství a druh podjednotky σ , který je nutný pro efektivní iniciaci transkripce (Maeda *et al.*, 2000).

Klíčovým krokem pro regulaci transkripce je iniciace transkripce (podrobněji v kapitole 5). Obecně je aktivita RNAP regulována transkripčními faktory, které působí na DNA, RNA nebo na RNAP v průběhu celé transkripce. Tyto faktory mohou být proteiny, malé peptidy nebo nekódující RNA. Např. u *E. coli* (i u ostatních bakterií) byla nalezena 6S RNA, která se váže přes σ^{70} na RNAP a reguluje tak transkripci mnoha genů. Dalšími faktory jsou polyfosfáty, aminokyseliny a vitamíny (Borukhov *et al.*, 2005; Wassarman, 2007). U *E. coli* je známo okolo 300 transkripčních faktorů (DNA-vazebných proteinů), z čehož většina reguluje iniciaci transkripce snížením nebo zvýšením afinity vazby RNAP na promotor (Borukhov *et al.*, 2005).

Stejně tak jako iniciace, tak i elongace a terminace slouží jako velmi důležité cíle regulace v průběhu transkripce. Elongační faktory předcházejí předčasnému ukončení transkripce, jsou zodpovědné za pozastavení i zastavení transkripčního komplexu a regulují rychlost transkripce (Yang *et al.*, 2009).

U *E. coli* jsou nejvýznamnější při regulaci Nus faktory (NusA, NusB, NusC, NusG a NusE), RfaH, ribosomální S4 protein, Gre faktory (GreA, GreB), Mfd, RapA (HepA) a Rho (Borukhov *et al.*, 2005).

Transkripční faktory jsou regulovány pomocí kontroly jejich aktivity či kontroly jejich exprese. Jejich exprese a proteosyntéza je ovlivněna koncentrací příslušného transkripčního faktoru. Také pomocí ligandů může být regulována afinita DNA-vazebné domény k příslušnému genu nebo pomocí posttranslační modifikace (např. fosforylace) (Browning and Busby, 2004).

Nus faktory Obecně se Nus faktory účastní regulace elongace a terminace transkripce závislé na Rho proteinu (Artsimovitch *et al.*, 2000).

U *E. coli* i u *B. subtilis* se vyskytuje vysoce konzervovaný elongační faktor **NusA**. Hraje významnou roli v anti-terminaci, pozastavení RNAP a terminaci. U *E. coli* je navíc důležitý pro potlačení toxické aktivity cizích genů (Yang *et al.*, 2009). Díky strukturální podobnosti N-koncové domény NusA a regionu 2 podjednotky σ můžeme předpokládat, že oba proteiny se váží do stejného místa RNAP (Borukhov *et al.*, 2005). Nicméně, současné výsledky napovídaly, že σ a NusA se mohou vázat současně (Yang and Lewis, 2010).

NusA u *E. coli* obsahuje dvě přídavné C-terminální domény, které interagují s C-koncovou doménou podjednotky α RNAP. Tyto domény nebyly nalezeny u NusA z *B. subtilis* ani u jiných bakterií. Proto nebyla nalezena ani interakce mezi NusA a podjednotkou α RNAP u *B. subtilis* (Yang *et al.*, 2009).

NusA je esenciální pro *E. coli* a je závislý na proteinu Rho. U *B. subtilis* je NusA také nepostradatelný, ale je potřebný i v dějích nezávislých na proteinu Rho. NusA také působí jako elongační faktor a na rozdíl od NusG zvyšuje pausing RNAP na některých pozastavujících místech a tím zpomaluje elongaci transkripce. Terminaci transkripce pomáhá snižováním rychlosti elongace vedoucí k úplnému zastavení RNAP a následné terminaci (Ciampi, 2006).

NusG je esenciální a hojný u *E. coli*, kdežto u *B. subtilis* není esenciální. NusG zvyšuje rychlost uvolnění RNA z transkripčního elongačního komplexu a pravděpodobně zprostředkovává aktivitu Rho na RNAP vedoucí k ukončení transkripce (Ciampi, 2006).

NusE a **NusB** jsou známé jako ribosomální proteiny S10 a jejich hlavní role je regulace anti-terminace (Lewis *et al.*, 2008).

RfaH RfaH je elongační faktor, který zvyšuje procesivitu transkripce určitých genů, které ve své sekvenci obsahují nepřekládané 12ti nukleotidové oblasti elementů *ops* (*operon polarity suppressor*, element potlačující polaritu operonu). Element *ops* způsobuje pozastavení elongačního komplexu RNAP a po navázání RfaH pokračuje v elongaci. RfaH tedy působí jako anti-terminační faktor (Svetlov *et al.*, 2007; Belogurov *et al.*, 2009).

ribosomální protein S4 U ribosomálního proteinu S4 byla objevena regulační funkce podobná elongačnímu faktoru NusA. Působí anti-terminačně na rRNA i neribosomální operony (Torres *et al.*, 2001).

Gre faktory **GreA** a **GreB** jsou složeny ze 160 AK a jejich struktura je rozdělena na dvě domény. N-koncová doména je složená z antiparalelních α -helixů a C-koncová doména je globulární. C-koncová doména je DNA-vazebná, zatímco N-koncová je RNA-vazebná a má nukleolytickou aktivitu. Tato doména stimuluje pozastavenou RNAP k pokračování v transkripci. Oba tyto faktory se váží do sekundárního kanálu RNAP (Stebbins *et al.*, 1995; Borukhov *et al.*, 2005).

Mfd Je evolučně konzervovaný protein o velikosti 130 kDa, který je strukturně podobný DNA helikáze (ale nemá helikázovou aktivitu). Mfd se váže k primárnímu kanálu (DNA vazebnému) RNAP. Účastní se oprav při probíhající transkripci a jeho hlavní funkce spočívá v reaktivaci zastavené RNAP, tedy obnově elongační fáze (Borukhov *et al.*, 2005).

RapA (HepA) RapA je bakteriální protein patřící do rodiny proteinů SWI/SNF, které mají konzervovaných šest domén podobné helikázám. Je veliký 110 kDa a váže se na RNAP (i na holoenzym RNAP). Váže se na povrch podjednotek α a β' . Vykazuje ATPázovou aktivitu, která se projevuje jen ve vazbě na RNAP (Sukhodolets and Jin, 2000; Cabrera and Jin, 2001). RapA podporuje aktivitu RNAP za vysoké koncentrace solí, kdy je dvoušroubovice DNA pevně sbalena (RNAP bez RapA není schopna transkripce) a aktivuje transkripci pomocí recyklace RNAP molekul (Sukhodolets *et al.*, 2001).

Rho Protein Rho tvoří homohexamery s RNA-dependentní ATPázovou a helikázovou aktivitou, které se vážou na C bohaté oblasti mRNA bez ribosomů. ATPázová aktivita je aktivována interakcí proteinu Rho a mRNA, poskytuje energii pro translokaci Rho podél mRNA, dokud nenarazí na RNAP. Poté nastane terminace transkripce a transkript je uvolněn helikázovou aktivitou Rho faktoru. Při opouštění ukončeného transkriptu hrají důležitou roli Rho-dependentní terminační faktory, jako např. NusG, NusA a NusB, se kterými Rho protein interaguje (Ciampi, 2006).

Zhruba polovina dosud známých terminátorů u *E. coli* je Rho-závislých. Tyto terminátory leží na přirozeném konci genu a v kontrolní oblasti předcházející kódující oblasti genů, kde hrají velmi důležitou roli při kontrole genové exprese (Ciampi, 2006). U *B. subtilis* není protein Rho esenciální a převládá Rho-nezávislá terminace transkripce (de Hoon *et al.*, 2005).

5 Regulace iniciace transkripce

Hlavní úlohou porozumění regulaci genové exprese je objasnit, které specifické geny jsou zapnuty nebo vypnuty v průběhu růstu a diferenciaci buňky nebo při odpovědi na změnu vnějších podmínek. Ačkoliv všechny fáze genové exprese mohou být regulovány, iniciace transkripce je pravděpodobně regulována nejčastěji. Faktory rozhodující o genové aktivitě zahrnují *cis*-regulátory (promotory, operátory, enhancery) a interagují s transkripčními faktory (aktivátory, represory, atd.) *in trans* (Elias-Arnanz *et al.*, 2010).

Promotorová sekvence V bakteriální buňce jsou sekvence jednotlivých promotorů velmi odlišné, což ovlivňuje iniciaci transkripce a genovou expresi. Je známo, že čím více se sekvence hlavních částí promotoru (hexamery -35 a -10, rozšířená oblast -10 a UP element) přibližují konsensus sekvenci, tím tyto promotory fungují efektivněji. Naopak odlišné sekvence promotorů jsou důležité pro modulaci transkripce, aby buňka optimálně reagovala na dané podmínky.

UP element je DNA sekvence, na kterou se váže C-koncová doména podjednotky α . Vazba podjednotky α na UP element ribosomálního promotoru *rrnB* P1 stimuluje aktivitu tohoto promotoru přibližně 30krát (Ross *et al.*, 1993). Zásadní pro vazbu UP elementu byly označeny čtyři aminokyseliny v C-koncové doméně podjednotky α , které se váží do malého žlábků sekvence DNA UP elementu. Tyto aminokyseliny jsou vysoce konzervovány u většiny bakterií (Ross *et al.*, 2001).

Podjednotky sigma *E. coli* používá σ^{70} jako hlavní faktor účastnící se transkripce. Genom této bakterie kóduje dalších 5 faktorů σ z této rodiny, které alternativně využívá při odpovědi na stresové podmínky. Všechny tyto faktory soutěží mezi sebou o vazbu na RNAP, tedy o přepis různých genů (více o sigma faktorech v kapitole 3.3 na straně 18) (Gruber and Gross, 2003). V mnoha případech je transkripce regulována pomocí anti-sigma faktorů, které se naváží na faktory σ a zabraňují navázání na RNAP, inhibují schopnost holoenzymu RNAP nalézt specifickou sekvenci promotoru, nebo změni konformaci holoenzymu RNAP, aby nemohla iniciovat transkripci. Anti-sigma faktory takto regulují odpověď na signály z vnějšího prostředí (Brown and Hughes, 1995).

Transkripční faktory Transkripční faktory předurčené k vazbě na promotor a následné regulace transkripce kóduje více než 300 genů u *E. coli*. Tyto faktory mohou stimulovat nebo naopak inhibovat transkripci. Přibližně u poloviny těchto proteinů byla jejich funkce objevena experimentálně. Velká část z nich jsou DNA-vazebné proteiny, které se váží na specifický promotor. Některé proteiny kontrolují celou skupinu genů, jiné naopak jsou specifické pro jediný gen (asi 60 transkripčních faktorů řídí pouze jediný promotor). Zároveň je odhadováno, že sedm transkripčních faktorů (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL a Lrp) řídí přibližně polovinu regulovaných genů (Browning and Busby, 2004). Podrobnější informace o transkripčních faktorech jsou uvedeny v kapitole 4 na straně 24.

5.1 Regulace pomocí malých molekul

Tento způsob regulace umožňuje bakteriím rychle reagovat na změny prostředí. Příkladem je produkce a vylučování antibiotik a jiných enzymů do svého okolí, či tvorba spór při nedostatku živin (Ochi, 2007).

Iniciační NTP (iNTP) a ppGpp jsou malé efektorové molekuly, jejichž koncentrace se mění v závislosti na růstové fázi, ve které se bakterie zrovna vyskytují (Rutherford *et al.*, 2007). V závislosti na množství živin se v bakteriální buňce dramaticky mění počet ribosomů, protože rychlost syntézy nových proteinů na ribosomu je stále konstantní bez ohledu na množství živin v prostředí. Při dostatku živin, tedy během exponenciální fáze růstu, se buňky dělí a potřebují velmi mnoho nových proteinů, tedy i velké množství ribosomů (Condon *et al.*, 1995). Z tohoto důvodu je aktivita rRNA promotorů během exponenciální fáze velmi vysoká. Naopak ve fázi stacionární se buňkám nedostává tolik živin a začínají šetřit energií. Proto se i výrazně omezuje aktivita rRNA promotorů. Tyto změny jsou regulovány pomocí ppGpp a iNTP (Murray *et al.*, 2003).

E. coli a *B. subtilis* používají odlišné strategie regulace genové exprese pomocí malých molekul při nedostatku živin (Krasny *et al.*, 2008).

(p)ppGpp Pokud bakteriím začnou docházet živiny v jejich okolí, musí výrazně omezit biosyntézu ribosomů a začít regulovat transkripci všech ribosomálních komponent, aby buňka šetřila energii. Začnou inhibovat transkripci stabilních RNA (rRNA, tRNA), zatímco indukují expresi enzymů pro biosyntézu aminokyselin a jejich transport. Tato regulační odpověď je aktivována vstupem „nenabité“ tRNA do A místa ribosomu, tím je aktivován protein RelA asociovaný na ribosomu, který syntetizuje „alarmon“ ppGpp (guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát). Tento mechanismus je nazýván jako stringentní odpověď (Paul *et al.*, 2005; Stallings *et al.*, 2009).

U *E. coli* za produkci (p)ppGpp v buňce zodpovídají dva enzymy, RelA a SpoT. Protein RelA (odpověď na nedostatek aminokyselin) syntetizuje (p)ppGpp z GTP/GDP s využitím ATP. Při syntéze (p)ppGpp se zvyšuje koncentrace proteinu RelA v buňce, který disocioval z ribosomu a je schopen se navázat na jiný ribosom, kde syntetizuje další molekuly (p)ppGpp. Druhý enzym, který je k syntéze (p)ppGpp potřeba, je SpoT. Tento enzym je aktivován za nedostatku mastných kyselin a při nepříznivých fyzikálních podmínkách, např. při nedostatku železa. SpoT je bifunkční enzym, který může syntetizovat (p)ppGpp a zároveň ho může hydrolyzovat na GTP/GDP a pyrofosfát (záleží na okamžité rovnováze reakce) (Srivatsan and Wang, 2008).

U *B. subtilis* byly nalezeny dva geny, které kódují homologní molekuly k RelA a SpoT. Produkty genů *yjbM* a *ywaC* jsou relativně malé a jejich sekvence odpovídá (p)ppGpp syntetázové doméně RelA-SpoT. Produkty těchto genů byly označeny jako *alarmon synthetases* (SASs) a jsou schopny syntetizovat (p)ppGpp. Jejich role v buňce není zcela jasná (Nanamiya *et al.*, 2008).

Alarmon ppGpp působí na regulaci promotorů pozitivně nebo negativně (Mallik *et al.*, 2006), jak je blíže popsáno v následujících odstavcích.

Pozitivní regulace transkripce pomocí ppGpp ppGpp funguje jako přímý aktivátor aminokyselinových promotorů, kdy za přítomnosti molekuly DksA zvyšuje rychlost isomerizace RNAP při tvorbě RP_O *in vitro*. Promotory pro syntézu aminokyselin mají v diskriminátoru AT bohaté oblasti a tyto promotory vytváří stabilní komplexy s RNAP (RP_O), které jsou podporovány ppGpp. Množství ppGpp v buňce slouží jako regulátor odpovědi na vnitřní signály, zatímco DksA působí jako koregulátor (vyskytuje se ho relativně stálé množství v buňce) (Srivatsan and Wang, 2008).

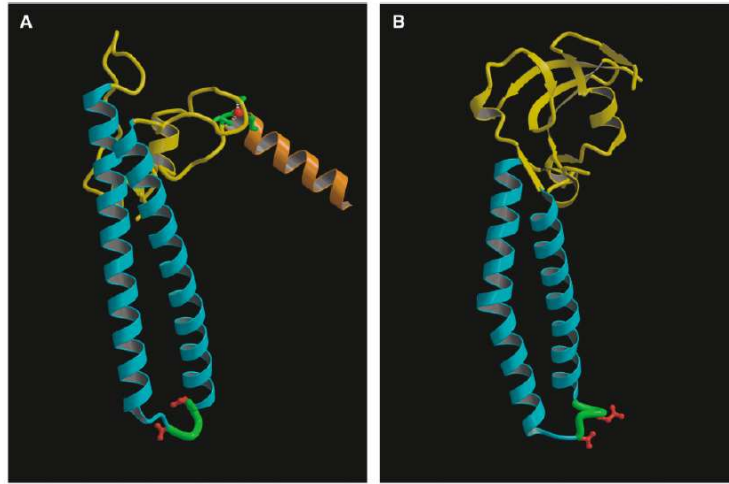
ppGpp snižuje afinitu podjednotky σ^{70} k RNAP holoenzymu a tím zvyšuje schopnost kompetice alternativních σ faktorů o vazbu na RNAP, čímž jsou určovány globální změny genové exprese (Srivatsan and Wang, 2008).

Negativní regulace transkripce pomocí ppGpp Negativně reguluje ppGpp syntézu rRNA, tRNA a některých mRNA v *E. coli* (Mallik *et al.*, 2006). Specificky inhibuje iniciaci transkripce stabilních RNA promotorů *in vitro* i *in vivo*. Promotory rRNA mají CG bohaté oblasti v diskriminátoru na které se váže region 1.2 podjednotky σ RNAP. Tyto promotory tvoří extrémně nestabilní otevřené komplexy s RNAP v průběhu iniciace transkripce. ppGpp ve spolupráci s DksA snižují stabilitu RP_O a tím inhibují iniciaci transkripce (Srivatsan and Wang, 2008).

Transkripční faktor DksA Transkripční faktor DksA je velký přibližně 17,5 kDa (Rutherford *et al.*, 2007) a je složen ze 2 domén: globulární domény a „coiled-coil“ domény s dvěma kyselými aminokyselinami (Asp). DksA vykazuje strukturní podobnost s elongačními faktory GreA a GreB, zatímco sekvenční homologie nebyla nalezena (viz obr. 8). Všechny zmíněné transkripční faktory se váží do sekundárního kanálu RNAP (Rutherford *et al.*, 2007; Perederina *et al.*, 2004). DksA je klíčový při pozitivní i negativní kontrole transkripce rRNA *in vivo*. Delece genu *dksA* se projevuje v genové expresi, funkci chaperonů, buněčném dělení, požadavcích na aminokyseliny, vnímání hustoty okolních bakterií a virulenci. Přímý efekt delece se projevil pouze u exprese rRNA, u všech ostatních fenotypů se projevil nepřímo (Paul *et al.*, 2005).

DksA zesiluje účinek malých efektorových molekul, tedy ppGpp i iNTP. Nebyla pozorována kompetice mezi ppGpp a iNTP o rRNA promotorový komplex *E. coli* v průběhu iniciace transkripce (Vrentas *et al.*, 2008). Je zajímavé, že v genomu *B. subtilis* se nevyskytuje gen pro protein DksA (Kobayashi *et al.*, 2003).

Iniciační NTP (iNTP) Iniciační NTP (iNTP) je malá efektorová molekula, která reguluje aktivitu RNAP a tím efektivitu iniciace transkripce. Obecně lze říci, že na promotorech, které tvoří relativně nestabilní otevřený komplex s RNAP, může být stabilita komplexu regulována intracelulární koncentrací iNTP. A to tak, že zvyšující se koncentrace iNTP v buňce stabilizuje otevřený komplex navázáním iNTP a tím zvyšuje promotorovou aktivitu. Zatímco snižující se koncentrace iNTP v buňce působí opačným efektem (Gaal *et al.*, 1997; Revyakin *et al.*, 2004). Tyto promotory se označují jako iNTP-senzitivní. Naopak promotory, které nejsou regulovány koncentrací iNTP v buňce a k jejich plné aktivitě je dostatečná malá koncentrace iNTP jsou označovány jako iNTP-nesenzitivní (Krasny *et al.*, 2008).



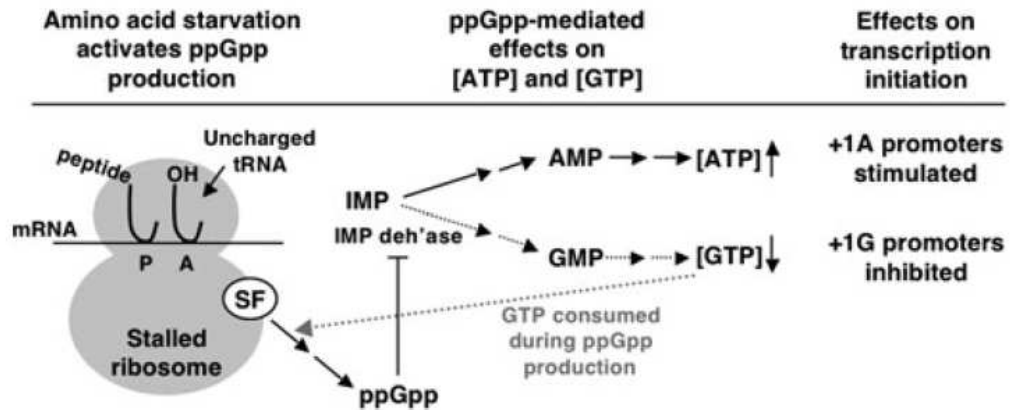
Obrázek 8: Porovnání struktury DksA (A) a GreA (B). Charakteristické kyselé AK jsou označeny červeně jako *ball-and-stick* model (Perederina *et al.*, 2004).

Identita iNTP může mít v buňce rozhodující roli při regulaci transkripce. U *B. subtilis* se v průběhu stringentní odpovědi v buňce mění koncentrace ATP a GTP recipročně. To je zprostředkováno pomocí alarmonu (p)ppGpp, který inhibuje inosin monofosfát (IMP) dehydrogenázu (první enzym v cestě biosyntézy GTP). Inhibice biosyntézy GTP způsobí akumulaci IMP. IMP dehydrogenáza je poslední společný intermediát syntézy ATP a GTP (viz obr. 9). Proto se při hladovění v buňce sníží koncentrace GTP a zároveň zvýší se koncentrace ATP. Tento stav iniciuje sporulaci u *B. subtilis* (Lopez *et al.*, 1981).

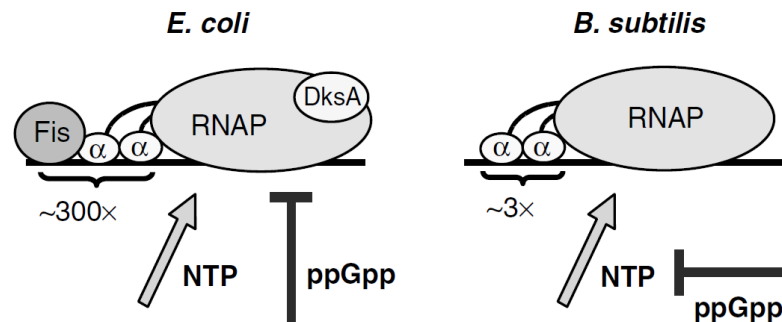
Majoritní část veškeré RNA v buňce je rRNA, proto jsou rRNA promotory významné modely pro studium regulace transkripce. Iniciace transkripce z rRNA promotorů je u *B. subtilis* stejně tak jako u *E. coli* závislá na koncentraci iNTP. U *B. subtilis* je na pozici +1 připojováno GTP, zatímco u *E. coli* GTP, CTP a ATP (Krasny and Gourse, 2004). Citlivost promotoru k iNTP je důležitá pro efektivitu transkripce, která je úměrná fyziologické koncentraci iNTP v buňce. Při studiu mutace v promotorové oblasti +1 *in vitro* se ukázalo, že pro maximálně efektivní iniciaci transkripce je potřeba právě vysoká koncentrace aktuálního iNTP (např. pro +1A je potřeba vysoká koncentrace iATP). Při stringentní odpovědi je koncentrace GTP v buňce limitována a proto jsou inhibovány rRNA promotory požadující na pozici +1 přiřazení GTP. Naopak promotory požadující na pozici +1 přiřazení ATP jsou důležité pro zvyšující se aktivitu promotoru při stringentní odpovědi. Obecně iNTP určují, jestli stringentně hlídáný operon bude při stringentní odpovědi aktivován či reprimován (Krasny *et al.*, 2008).

Rozdíly v regulaci iniciace transkripce rRNA promotorů u *E. coli* a *B. subtilis*

Regulace iniciace transkripce z rRNA promotorů probíhá u *B. subtilis* odlišně než u *E. coli*. U *B. subtilis* se ppGpp přímo neváže na RNAP. Buňka používá na syntézu ppGpp GTP, čímž se jeho koncentrace v buňce snižuje a tím jsou regulována aktivita těchto promotorů. Efekt ppGpp je tedy nepřímý a nezávislý na DksA (gen kódující DksA se v genomu *B. subtilis* nevyskytuje). Koncentrace ppGpp nemá tedy na aktivitu rRNA promotorů přímý vliv *in vitro* ani *in vivo* (viz obr. 10) (Krasny and Gourse, 2004).



Obrázek 9: Regulace iniciace transkripce pomocí iNTP v průběhu stringentní odpovědi u *B. subtilis*. Nedostatek AK umožní vstup „nenabitých“ tRNA do A místa ribosomu, což aktivuje stringentní faktor (SF) RelA. SF produkuje pppGpp, který se rychle mění na ppGpp. Vysoká koncentrace ppGpp inhibuje IMP dehydrogenázu. Tato inhibice způsobí snížení koncentrace GTP a zvýšení koncentrace ATP v buňce. Vysoká koncentrace ATP stimuluje iniciaci transkripce stringentně regulovaných promotorů obsahujících +1A. Naopak snížení koncentrace GTP v buňce inhibuje iniciaci transkripce stringentně regulovaných promotorů obsahujících +1G (Turnbough, 2008).



Obrázek 10: Rozdíly v regulaci iniciace transkripce rRNA promotorů u *E. coli* a *B. subtilis*. U *B. subtilis* je role UP elementů minoritní, hlavní roli v regulaci iniciace transkripce mají iniciační nukleotidy (zde NTP) (Krasny and Gourse, 2004).

5.2 CarD (YdeB)

CarD (homologní k YdeB z *B. subtilis*) je esenciální protein získaný z *Mycobacterium tuberculosis*. Deplece tohoto genu vede ke zvýšení citlivosti a až k smrti buněk v důsledku působení oxidačního stresu, poničením DNA a hladověním. Zároveň deplece tohoto genu vede k výraznému snížení transkripce rRNA. CarD dokáže funkčně nahradit protein DksA při stringentní odpovědi přesto, že se každý váže na jinou část RNAP. CarD na rozdíl od DksA je pro buňku esenciální (Stallings *et al.*, 2009). Tyto efekty nasvědčují tomu, že CarD je velmi důležitý při odpovědi na stresové podmínky. Na rozdíl od *Mycobacterium tuberculosis*, u *B. subtilis* homolog tohoto proteinu není esenciální (Connolly and Cox, 2009).

CarD je strukturně rozdělen na dvě domény: C-koncovou DNA-vazebnou doménu podobající se eukaryotické HMGA (*high-mobility group A*) a N-koncovou doménu, která je sekvenčně unikátní pro bakterie (Cayuela *et al.*, 2003). HMGA je skupina malých, relativně hojných proteinů nehistonové povahy, které jsou součástí chromatinu v eukaryotních buňkách. Účastní se remodelace chromatinu a tvorby nukleoproteinových komplexů. Typickým znakem těchto proteinů jsou AT bohaté DNA-vazebné oblasti a oblast s kyselé nabitými aminokyselinami. CarD a jeho ortolog u *Stigmatella aurantiaca* jsou jedinými dvěma zástupci u prokaryot, které mají HMGA podobnou doménu (Cayuela *et al.*, 2003; Elias-Arnanz *et al.*, 2010).

N-koncová doména CarD je složena ze 179 AK (CarDNter). Je esenciální pro specifickou vazbu s CarG. Tento komplex je schopen interagovat s podjednotkou β RNAP a do stejného vazebného místa jako TRCF (*transcription coupling factor*) (Stallings *et al.*, 2009; Garcia-Moreno *et al.*, 2010).

TRCF je 130 kDa velký, evolučně konzervovaný elongační faktor, který opravuje chyby v DNA v průběhu transkripce. Pokud se v průběhu transkripce vyskytne poškozené místo na DNA, RNAP se zastaví a započne oprava chyb při transkripci (proces nazvaný TCR; *transcription-coupled repair*). Zastavená RNAP zabraňuje odstranění poškození, proto se na ni naváže faktor TRCF. Ten RNAP odstraní z poškozeného místa díky své translokázové aktivitě závislé na ATP a následně nastartuje opravu DNA navázáním komplexu endonukleáz Uvr(A)BC (Westblade *et al.*, 2010).

CdnL je homologní ke CarD v *Myxococcus xanthus*. CdnL ale neobsahuje DNA-vazebnou doménu, pouze N-koncovou (*CarD N-terminal like*). CdnL nenahrazuje funkci N-koncové domény CarD, protože se neváže na protein CarG a v buňce nemůže být komplementována delece *cdnL* N-koncovou doménou CarD. Tento protein se ukázal být nezbytný pro život *Myxococcus xanthus*. V tomto organismu je protein DksA též esenciální a jeho funkce není nahraditelná CdnL (Garcia-Moreno *et al.*, 2010).

V genomu *B. subtilis* není gen pro protein DksA a zároveň gen pro CarD se ukázal jako postradatelný (Kobayashi *et al.*, 2003).

Přehledné zobrazení proteinů homologních ke CarD je zobrazené v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehledné zobrazení proteinů homologních ke CarD a jejich vazebných partnerů.

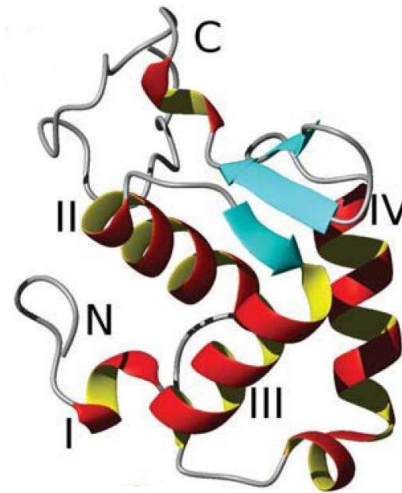
homologní proteiny	velikost (kDa)	interakční partner	velikost (kDa)
CarD	17,9	CarG	19,1
YdeB	17,6		
TCRF	130		
CdnL	18,7		

5.3 Podjednotka δ RNAP

Jak již bylo zmíněno, RNAP gram-pozitivních bakterií se skládá navíc z dalších dvou podjednotek (ω a δ). V této kapitole se budu věnovat podjednotce δ , protože je to významný transkripční faktor a vztahují se k ní i výsledky mé experimentální činnosti.

První zmínka o δ se objevila v roce 1975, jako o faktoru kódovaným hostitelem, který je součástí virové RNAP. Ukázalo se, že podporuje transkripci středních a pozdních fágových genů (Pero *et al.*, 1975). Díky zjištění, že se δ váže na RNAP, začala být považována za její regulační součást a následně začala být označována jako podjednotka δ RNAP (Tjian *et al.*, 1977). Nejprve byla δ objevena u několika druhů rodu *Bacillus* (Achberger *et al.*, 1982b) a posléze se ukázala jako unikátní pro kmen *Firmicutes* gram-pozitivních bakterií (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě). Podjednotku δ obsahuje i minimální genom *Mycoplasma genitalium* (Doherty *et al.*, 2010).

Podjednotka δ je kódována genem *rpoE* a je složena z 173 AK u *B. subtilis*. Její molekulová hmotnost je přibližně 21,4 kDa (Lampe *et al.*, 1988). Dělí se na dvě domény, které jsou spojeny 7 - 9 AK sekvencí lysinů. Větší strukturovaná N-koncová doména (NTD) o velikosti 95 AK je složena z čtyř α -helixů a jednoho antiparalelního β -listu (viz obr. 11). Vysoce nestrukturovaná C-koncová doména (CTD) je složena z 69 AK a je výrazně záporně nabitá díky vysokému obsahu aspartátu a glutamátu (de Saro *et al.*, 1995; Motackova *et al.*, 2010).



Obrázek 11: Struktura N-koncové domény podjednotky δ RNAP u *B. subtilis*. Čtyři α -helixy jsou označeny I až IV a antiparalelní β -list je vyznačen modře. Koncové domény jsou označeny N a C (Motackova *et al.*, 2010).

5.3.1 Efekty podjednotky δ pozorované *in vitro*

Tvorba transkripční bubliny a procesivita transkripce Podjednotka δ ovlivňuje stabilitu transkripční bubliny tím, že ovlivňuje rovnováhu mezi tvorbou uzavřeného a otevřeného komplexu RNAP. Podjednotka δ má inhibiční efekt na tvorbu transkripční bubliny (Juang and Helmann, 1994b) a snižuje stabilitu otevřeného komplexu RNAP (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).

Recyklace jádra RNAP N-koncová doména se váže na RNAP a tím zároveň orientuje C-koncovou doménu k vazbě na povrch RNAP. CTD δ obsahuje polyanionický region, který umožňuje navázat se do místa RNAP pro templát či produkt. CTD je podobná svou strukturou NK a tedy s ní kompetuje při vazbě do aktivního místa RNAP. Jako vysvětlení bylo navrženo, že podjednotka δ stimuluje množství RNA transkriptu v reakcích o několika cyklech a celkově stimuluje syntézu RNA.

C-koncová doména δ odstraňuje RNA transkript z binárního komplexu (RNAP + RNA), což umožňuje recyklaci jádra RNAP (mechanismus, kdy RNAP ukončí aktuální transkripci a je okamžitě připravena nasednout na jiný promotor a transkribovat příslušný gen) (Spiegelman *et al.*, 1978; Juang and Helmann, 1994a; de Saro *et al.*, 1995).

Zvýšení specifity transkripce Působení podjednotky δ záleží na typu templátu a podmínkách transkripce. Ovlivňuje míru syntézy RNA a zvyšuje promotorovou selektivitu (Tjian *et al.*, 1977; Juang and Helmann, 1994a). Podjednotka δ omezuje interakce RNAP holoenzymu s nepromotorovými oblastmi DNA a snižuje stabilitu komplexu RNAP s nepromotorovou DNA až 1000krát. Tím je zvýšena selektivita vazby RNAP na promotorové oblasti (Achberger *et al.*, 1982a; Hilton and Whiteley, 1985; Juang and Helmann, 1994a; Spiegelman *et al.*, 1978). Za nepřítomnosti δ se RNAP váže s menší specifitou (Achberger and Whiteley, 1981).

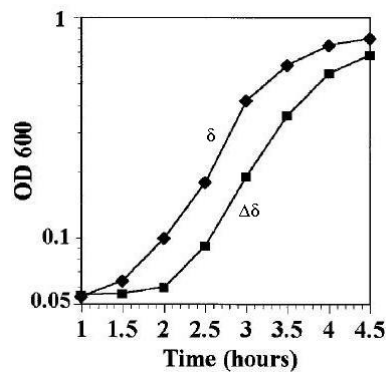
Změna citlivosti RNAP ke koncentraci iNTP Mnoho promotorů *B. subtilis* je iNTP-senzitivní (regulace pomocí iNTP je podrobně popsána na straně 29). Typickými zástupci této skupiny jsou rRNA promotory. K pozorování efektu proteinu δ na transkripci *in vitro* z rRNA promotorů byly vybrány dva reprezentativní promotory: *rrnB* P1 jako zástupce iNTP-senzitivních rRNA promotorů a *Pveg* jako představitel iNTP-nesenzitivních rRNA promotorů. Promotor *rrnB* P1 potřebuje relativně vysokou koncentraci iNTP pro maximální aktivitu, zatímco promotor *Pveg* tvoří relativně stabilní komplexy s RNAP, které jsou saturovány již při nízké koncentraci iNTP (Krasny and Gourse, 2004; Sojka *et al.*, 2011). Za daných experimentálních podmínek (kdy se zvyšuje molární koncentrace δ a zůstává stálá molární koncentrace RNAP), δ inhibuje transkripci z promotoru *rrnB* P1 a zároveň stimuluje transkripci z promotoru *Pveg* (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě). Pozorovaný efekt na promotor *rrnB* P1 by mohl být vysvětlen tím, že δ snižuje stabilitu otevřeného komplexu RNAP (Dobinson and Spiegelman, 1987; Juang and Helmann, 1994a). Aktivitu promotoru *Pveg* nelimituje stabilita otevřeného komplexu RNAP a zvýšení této aktivity by mohlo být způsobeno recyklací jádra RNAP (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).

Možná funkční homologie podjednotek δ a σ^{70} Podjednotka σ^{70} je hlavním σ faktorem u gram-negativních bakterií. σ^{70} snižuje afinitu RNAP k nepromotorové DNA až 10 000krát a účastní se selektivní vazby na promotor. Teoreticky je možné, že podjednotka σ^A (43 kDa) ve spojení s podjednotkou δ (21,4 kDa) u *B. subtilis* by mohly být funkčně homologní s σ^{70} (70 kDa) u *E. coli*. Porovnáním AK sekvence podjednotek σ^A a σ^{70} se ukázalo, že jsou z velké části homologní. Pouze 245 AK mezi regiony 1 a 2 u σ^{70} nevykazovalo žádnou homologii. V těchto 245 AK bylo nalezeno 80 AK záporně nabitých, které se výrazně podobají

zápornému náboji CTD podjednotky δ (de Saro *et al.*, 1999). Zda těchto 245 AK hraje roli u proteinu σ^{70} podobnou jako CTD podjednotky δ není dosud známo.

5.3.2 Efekty podjednotky δ pozorované *in vivo*

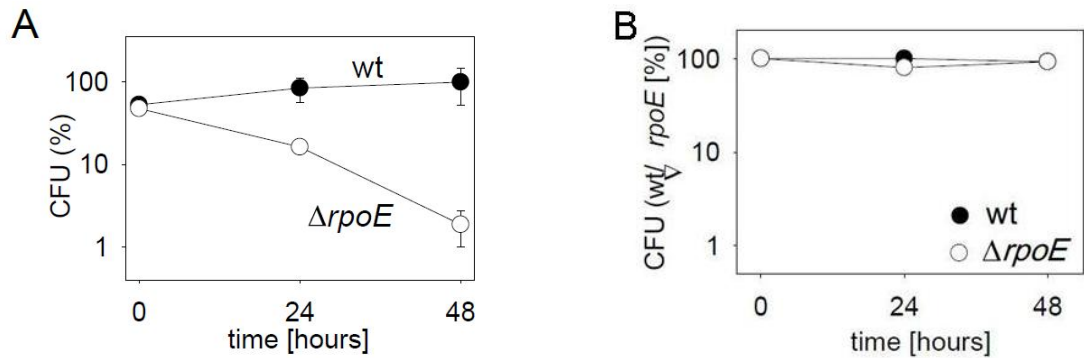
Delece v genu *rpoE* vede ke změnám v lag fázi a morfologické odlišnosti Mutanty s částečnou delecí genu *rpoE* u *B. subtilis* se neliší v životaschopnosti ani v rychlosti růstu za standardních podmínek. U mutant byla pozorována prodloužená lag fáze (viz obr. 12) a odlišná morfologie (prodloužené buňky oproti divokému kmeni, které se shlukují na začátku exponenciální fáze) (de Saro *et al.*, 1999).



Obrázek 12: Srovnání divokého kmene s mutantem v genu *rpoE*. Mutant v genu *rpoE* vykazuje prodlouženou lag fázi ($\Delta\delta$) oproti divokému kmeni (δ) (de Saro *et al.*, 1999).

Podjednotka δ ovlivňuje genovou expresi iNTP-senzitivních promotorů *in vivo*, což je důležité zejména při stringentní odpovědi, kdy se rychle snižuje intracelulární koncentrace GTP v buňce a klesá aktivita rRNA promotorů. Mutanty v genu *rpoE* u *B. subtilis* nejsou schopny reagovat při stringentní odpovědi stejně rychle jako divoký kmen *B. subtilis*.

Zásadní význam δ při kompetici mezi buňkami Na základě experimentálních dat *in vitro* i *in vivo* bylo zkoumáno, jestli podjednotka δ hraje roli při kompetici mezi buňkami. Úspěšnější buňky při kompetici s jinými buňkami musí být schopny rychleji se přizpůsobit měnícím se podmínkám. Mutant v genu *rpoE* s divokým kmenem *B. subtilis* byly zaočkovány do společného média v exponenciální fázi růstu a narostlá kultura byla přeočkována každých 24 hodin do čerstvého média. V průběhu byly vždy odebírány vzorky buněk a byly vysety na selektivní agarové misky (kmeny byly odlišeny rezistencí). Růst mutantu v genu *rpoE* byl brzy potlačen divokým kmenem (viz obr. 13 A). Pro ověření životaschopnosti jednotlivých kmenů byl každý kmen pěstován samostatně. Za těchto podmínek nebyl mezi počtem buněk v obou kulturách žádný měřitelný rozdíl (viz obr. 13 C) (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).



Obrázek 13: δ je nezbytná pro kompetitivní zdatnost. **A** – Stejně množství buněk (CFU, colony forming units) bylo smícháno v LB médiu v exponenciální fázi růstu. Každých 24 hodin byla kultura přeočkována do čerstvého média. Po 48 hodinách byl kmen mutantní v genu *rpoE* eliminován divokým kmenem. **B** – Paralelní růst divokého kmene a mutantu v genu *rpoE* v LB médiu. Oba kmeny neměly problém s přežitím (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).

Efekt podjednotky δ na sporulaci Proces sporulace je nastartován nedostatkem živin v okolním prostředí bakterie, aby bakterie byla schopna tyto podmínky přežít. Jedná se tedy o konec exponenciální fáze a začátek stacionární fáze. Zároveň v této fázi životního cyklu bakterií je protein δ produkován nejvíce. Při mutaci v genu *rpoE* se projevila rozdílná transkripce určitých genů v časně III. fázi sporulace (kdy dochází k vytvoření prespory). Podjednotka δ hraje pravděpodobně přímou či nepřímou roli v transkripci těchto genů (Gao and Aronson, 2004; de Saro *et al.*, 1999).

Ovlivnění virulence patogenních bakterií podjednotkou δ Mutanty genu *rpoE* byly studovány pouze u několika vybraných patogenních bakterií. Přesto vypovídají o roli podjednotky δ v bakteriální buňce, která působí jako globální modulátor genové exprese potřebný k optimálnímu růstu bakterií a schopnosti rychle se přizpůsobit vnějším podmínkám. Rozdílná role tohoto proteinu v různých bakteriích je překvapivá.

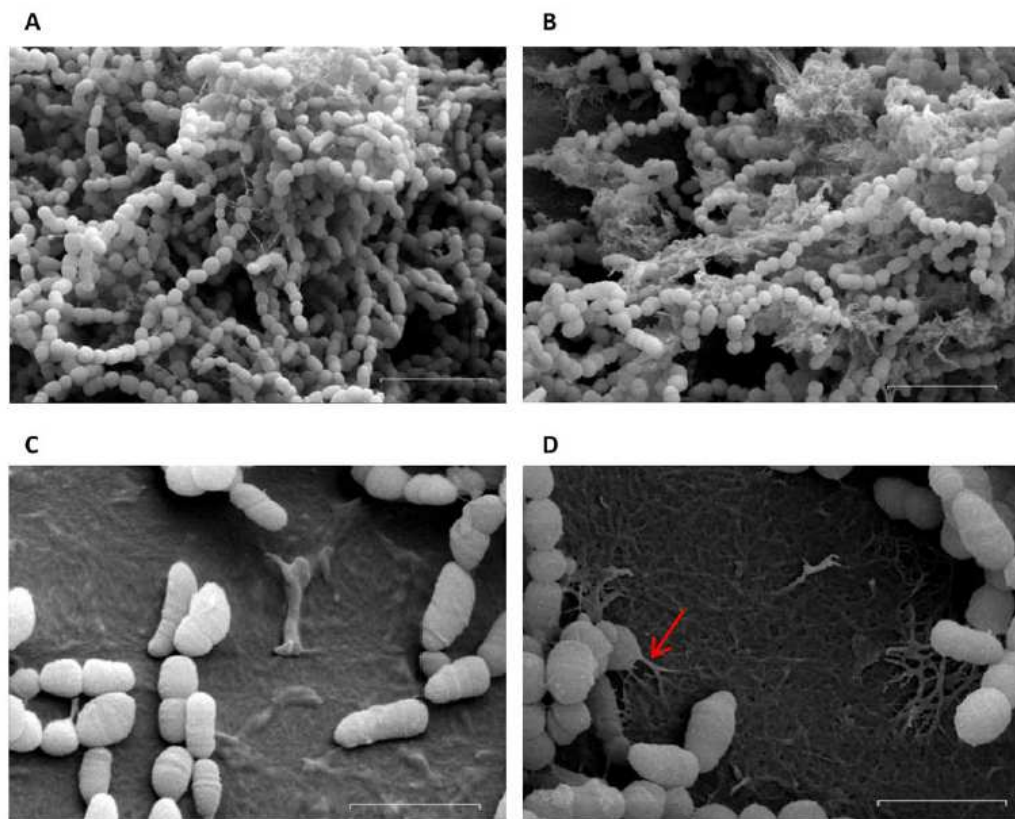
Mutanty s delecí genu *rpoE* snížily svou virulenci až o dva řády oproti divokému kmeni *Streptococcus agalactiae*. Tato bakterie může způsobit velmi závažná onemocnění, ale u zdravých jedinců se vyskytuje běžně jako komenzální organismus (Jones *et al.*, 2003; Seepersaud *et al.*, 2006).

Mutant v homologním genu k *rpoE* se projevil jako méně životaschopný za podmínek s omezeným přísunem aminokyselin oproti divokému kmeni *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* způsobuje širokou škálu nemocí – od lehkých infekcí až po sepsi (Watson *et al.*, 1998).

Streptococcus mutans je hlavní příčinou vzniku zubního kazu. Jeho mechanismus patogenicity je závislý zejména na vazbě mezibuněčné hmoty (fibronektinu), schopnosti přežít v hostiteli a vytvoření biofilmu odolávajícímu vnějším stresovým faktorům. Mutanty s delecí genu *rpoE* zkoumané *in vitro* mají efekt na některé vlastnosti související s virulencí. Tyto mutanty vykazují zvýšenou agregaci buněk a agregaci s ostatními bakteriemi (také s *Candida albicans*). Vytváří jinou strukturu biofilmu, jsou schopny využívat širší spektrum látek jako zdroj uhlíku a jsou odolnější vůči některým antibiotikům a inhibitorům. Tyto mutanty se sil-

něji váží na mezibuněčnou hmotu lidských buněk oproti divokému kmeni (obr. 14). Všechny tyto poznatky získané *in vitro* naznačují, že by kmeny s delecí genu *rpoE* měly vykazovat vyšší virulenci tohoto organismu (Xue *et al.*, 2011). Nicméně pokud by byla výhodná pro *Str. mutans* delece genu *rpoE in vivo*, jistě by v průběhu evoluce tato mutace byla konzervována.

Delece genu *rpoE* také způsobuje velké změny v transkriptomu u *Streptococcus mutans*, které mohou vést ke snížené virulenci tohoto organismu. Tyto mutanty vykazují: sníženou schopnost růstu, sníženou schopnost odolávat stresovým faktorům, sníženou schopnost odolávat působení kanamycinu a tetracyklinu a tvoří nehomogenní biofilm (Xue *et al.*, 2010). Analýza proteomu mutantního kmene v *rpoE* podpořila svými výsledky všeobecnou roli δ při odpovědi na stresové podmínky (Xue *et al.*, 2012).



Obrázek 14: Skenovací elektronová mikroskopie 16 hodin starého biofilmu *Streptococcus mutans*. Divoký kmen je na obrázku A a C, mutant v *rpoE* na B a D. Mutant v *rpoE* vykazuje odlišnou strukturu biofilmu oproti divokému kmeni. Červená šipka poukazuje na strukturu podobné dendritickému výběžku u mutantního kmene. Obrázky A, B zobrazují 5 μm a C, D 2 μm biofilmu (Xue *et al.*, 2011).

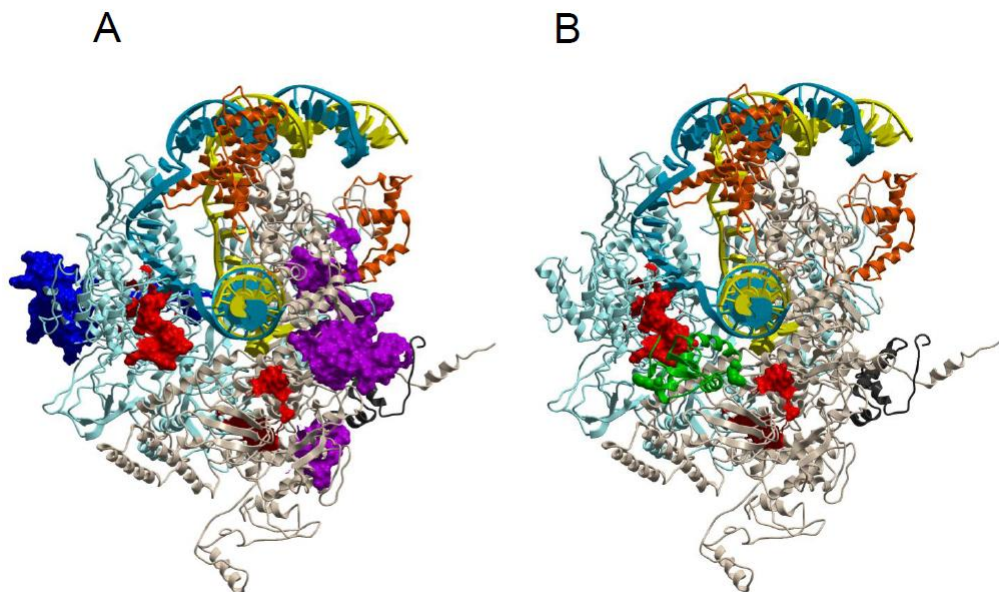
5.3.3 Pozice δ na RNAP

Pomocí detekovaných vazeb (*cross-link*) mezi RNAP z *B. subtilis* a podjednotkou δ bylo identifikováno několik vazebných míst. Žádná vazba nebyla detekována mezi podjednotkami δ a α , ani u flexibilní CTD δ . NTD δ interagovala se třemi místy na RNAP, jak zobrazuje obrázek 15 A. Oblasti A a B jsou relativně velmi vzdáleny od dvoušroubovice DNA.

Oblast A (zobrazena modře) byla lokalizována na povrchu podjednotky β , kde by δ mohla pomáhat RNAP při vazbě na promotorové oblasti -35 a -10. Což se neshoduje s dříve publikovanými daty pojednávající o působení δ na DNA po směru transkripce od pozice +1 (Juang and Helmann, 1994a; Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).

Oblast B (zobrazena fialově) byla umístěna zejména na podjednotku β' a částečně zasahovala do β tam, kde se váže podjednotka ω na C-koncovou doménu β' . Tato pozice opět neodpovídá fyziologicky pravděpodobné vazby δ na RNAP.

Oblast C (zobrazena červeně na obrázku 15 A) je nejpravděpodobnější reálnou pozicí vazby δ na RNAP, vzhledem k dosud získaným poznatkům *in vitro* a *in vivo*. V této pozici by δ mohla odstraňovat DNA z povrchu RNAP (nespecifické vazby na DNA; pomocí záporně nabitě CTD fungující jako analog nukleové kyseliny) a zároveň by mohla ovlivňovat stabilitu otevřeného komplexu RNAP v případě navázání na promotor. Na obrázku 15 B je zobrazen navržený model NTD δ (zeleně) na základě získaných výsledků (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).



Obrázek 15: Model interakce podjednotky δ s RNAP. Podjednotky RNAP jsou zobrazeny: β světle modře, β' šedě, σ^A oranžově, ω černě, templátové vlákno DNA žlutě a netemplátové vlákno DNA tyrkysově. **A** RNAP je zobrazena v komplexu s DNA a s třemi místy vazby δ detekovanými studií. Oblast A je zobrazena modře, B fialově a C červeně. **B** Model interakce δ s RNAP na základě detekovaných vazeb. NTD δ je zobrazena zeleně, pozice CTD zatím nebyla objasněna (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).

5.4 Proteiny YxbF a YwcC

Tyto proteiny byly identifikovány jakožto možní interakční partneři podjednotky δ bakteriální RNAP.

YxbF a YwcC patří mezi transkripční represory rodiny Tet^R. Rodina Tet^R proteinů je pojmenovaná podle proteinu Tet^R, který ovládá transkripci z *tet* genů, jejichž produkty způsobují rezistenci na tetracyklin. Tato rodina represorů je velmi rozšířena mezi bakteriemi a je pro ni charakteristický helix-turn-helix (HTH) DNA-vazebný motiv v C-koncové doméně. Proteiny patřící do této rodiny hrají významnou roli v biosyntéze antibiotik, regulaci osmotického stresu a působí na efluxní pumpu (Aramaki *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 2005).

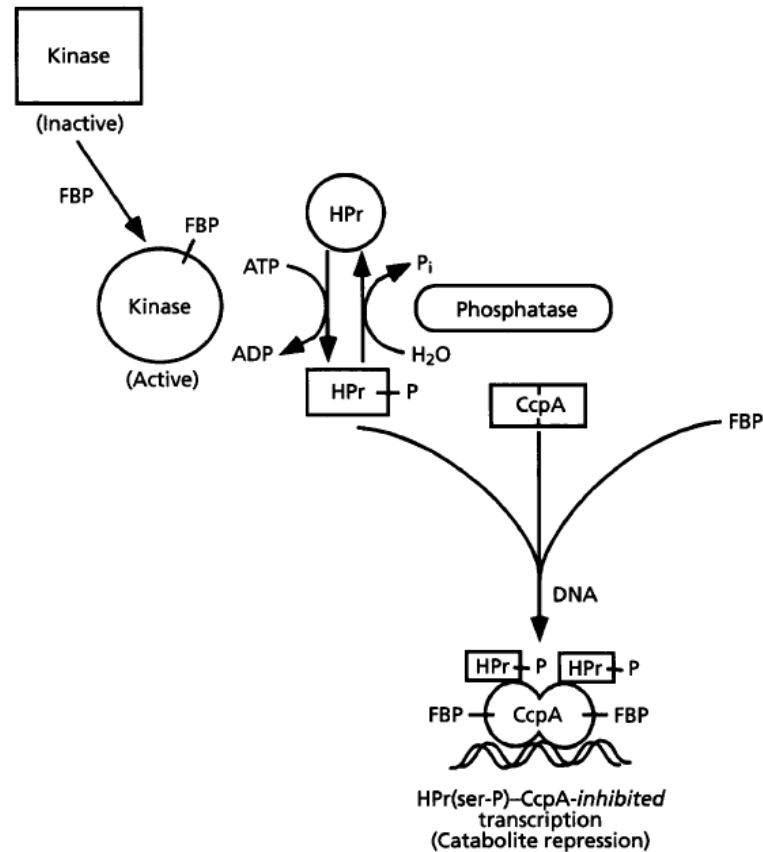
Proteiny z Tet^R rodiny vykazují vysokou sekvenční podobnost v DNA-vazebné doméně. Tyto proteiny působí jako represory, tedy za jejich přítomnosti na operátoru je transkripce reprimována. Pokud je navázán induktor, konformační změna uvolní DNA-vazebnou doménu z operátoru a může začít transkripce z příslušného promotoru (Ramos *et al.*, 2005).

5.4.1 YxbF

Jediná zmínka o genu *yxbF* u *B. subtilis* v dostupné literatuře je spojena s katabolickou represí.

Katabolická represe je regulační mechanismus, při kterém je exprese některých katabolizujících genů potlačena za přítomnosti lépe využitelných zdrojů uhlíku a energie. *B. subtilis* využívá jiný mechanismus katabolické represe než *E. coli* (která využívá cAMP-závislý mechanismus katabolické represe). Katabolická represe nastává pouze tehdy, pokud je cukr (který je schopen potlačit katabolismus jiných cukrů, např. glukóza) schopen být přeměněn v glykolytický meziprodukt FBP (fruktóza-1,6-bisfosfát). U *B. subtilis* FBP aktivuje HPr(ser) kinázu. Tato kináza fosforyluje 46. serin na proteinu HPr (P-Ser-HPr), který se díky své fosforylaci váže na transkripční faktor CcpA (*catabolite control protein A*) a spolu s FBP vytvoří komplex. Tento komplex se naváže na *cre* sekvenci (*catabolite responsive element*) cílových operonů a tím podporují katabolickou represí (blokují transkripci genů alternativních cukrů) (Saier *et al.*, 1996). Viz obr. 16.

Transkriptomová a proteomová analýza mutantů v genu *ccpA* u *B. subtilis* odhalila mnoho genů, jejichž transkripce je závislá na proteinu CcpA a naopak i několik genů, jejichž regulace je CcpA-nezávislá (Fujita, 2009). Pomocí DNA čipu (*DNA Microarray*) bylo odhaleno 66 genů, které jsou reprimované glukózou. Z toho 22 genů se ukázalo jako přinejmenším částečně CcpA-nezávislých. V této kategorii byl objeven také gen *yxbF* (Yoshida *et al.*, 2001).



Obrázek 16: Schéma katabolické represe u *B. subtilis*. Metabolitem aktivovaná kináza fosforyluje protein HPr. P-HPr je schopný se navázat na transkripční regulátor CcpA a společně s fruktózou-1,6-bisfosfát (FBP) interagují s operony katabolických genů a tím podporují katabolickou represi (Saier *et al.*, 1996).

5.4.2 YwcC

Protein YwcC reguluje dráhy genové exprese, které vedou u bakterie k zaujmutí určité morfologické struktury buňky. Reguluje přepínání genů mezi planktonní fází buňky a tvorbou biofilmu. Pro lepší pochopení je v následujících odstavcích popsán princip regulace těchto drah a následně role proteinu YwcC.

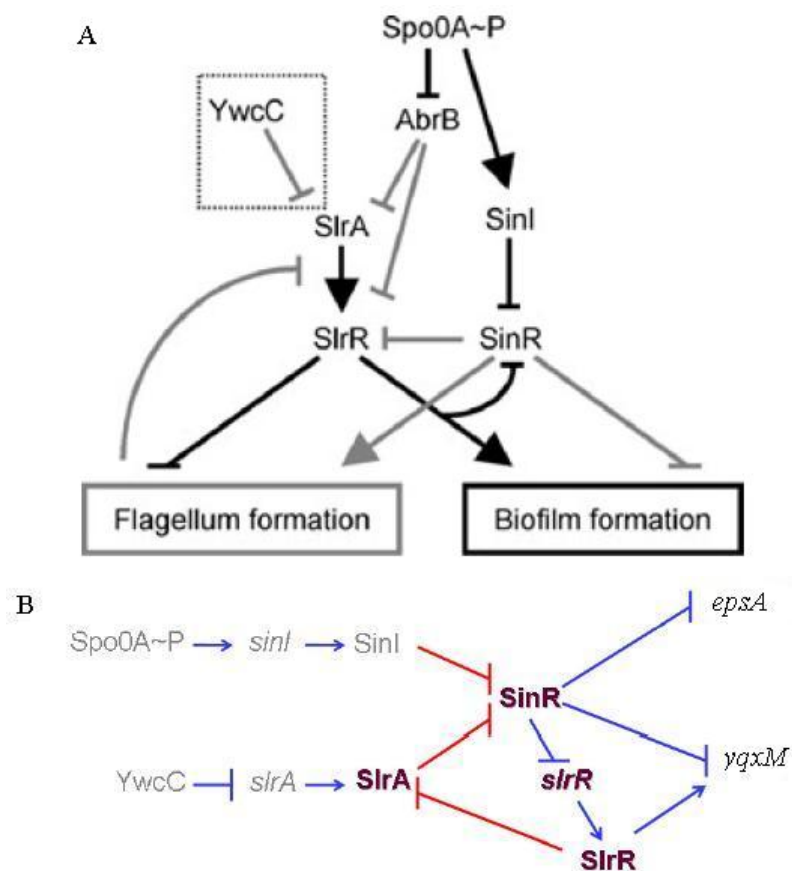
Bakterie mohou růst buď jako jednotlivé planktonní buňky nebo jako součást skupiny buněk např. biofilmu. Jednotlivé planktonní buňky exprimují na svém povrchu bičíky, zatímco buňky tvořící biofilm produkují extracelulární matrix. Bakteriální buňky dokáží přepnout svou genovou expresi a stát se buňkou jednoho ze zmíněného typu, ale přesný mechanismus dosud není znám (Kobayashi, 2008).

B. subtilis je schopen vytvořit slabý nestrukturovaný biofilm na povrchu stacionárně pěstované kultury (Branda *et al.*, 2001). Tvorba biofilmu závisí na produkci extracelulární matrix, což je regulováno dvěma operony. Operon *eps* je zodpovědný za syntézu exopolysacharidů a operon *yqxM* kóduje transportéry a proteiny pro extracelulární matrix. Protein SinR blokuje transkripci těchto dvou operonů a naopak aktivuje transkripci genů proteinů tvořící bičík. Aktivita SinR je inhibována proteinem SinI, protože navázáním SinI na SinR je inhibována DNA-vazebná aktivita tohoto proteinu (Bai *et al.*, 1993; Kobayashi, 2008). Protein SinI je

homologní k proteinu SlrA. Při aktivaci SlrA spolu se SrlR dojde k potlačení transkripce genů pro tvorbu bičíku a zároveň je iniciována transkripce operonů pro tvorbu biofilmu. Pro lepší pochopení jsou tyto informace schématicky zobrazeny na následujícím obr. 17A.

Chai *et al.* (2009) poukázal na rozdílný mechanismus regulace tohoto procesu. SlrA stejně jako SinI interaguje a inhibuje SinR. Zároveň SlrA neaktivuje SlrR při tvorbě biofilmu. Naopak SlrR inhibuje svou vazbou SlrA. Tyto změny jsou zobrazeny na obr. 17B.

U určitého kmene *B. subtilis* vznikla delece 1 base v genu *ywcC*, čímž se posunul čtecí rámec a transkript byl výrazně kratší, protein tak pravděpodobně ztratil svou funkci. Mutace v genu *ywcC* způsobila derepresi transkripce genu *slrA*, čímž se zvýšila aktivita SlrR a SrlA. V těchto mutantech SlrA nahradí funkci SinI a reprimuje SinR. Zároveň interaguje s SlrR zvyšuje jeho aktivitu podle Kobayashi (2008). Chai *et al.* (2009) potvrdil, že protein YwcC reprimuje expresi genu *slrA*.



Obrázek 17: Schématický model regulace růstových forem bakterií. **A** Proteiny AbrB a SinR stimuluje tvorbu bičíku. SlrA s SlrR inhibují tvorbu bičíku a stimuluje tvorbu biofilmu. SinI a SlrA jsou homologní proteiny, YwcC inhibuje syntézu proteinu SlrA (Kobayashi, 2008). **B** SlrA stejně jako SinI se inhibuje SinR. Na rozdíl od předchozího obrázku, SlrR inhibuje SlrA. SlrR působí jako induktor na operony *eps* a *yqxM*, které vytváří jednotlivé složky biofilmu (Chai *et al.*, 2009).

6 Materiál a metody

6.1 Přístroje

Centrifugy

Beckman Coulter Avanti J-26XPI (USA) – vakuová chlazená centrifuga s možností výměny rotorů

- Rotor JA 25.50 (určený pro 8 kyvet o objemu 50 ml s maximálním odstředivým zrychlením až 75 600*g*)

Beckman Model J2-21M (USA) – vakuová chlazená centrifuga s možností výměny rotorů

- Rotor JA 20 (určený pro 8 kyvet o objemu 50 ml s maximálním odstředivým zrychlením 48 400*g*)

Heraeus Cryofuge (Německo) – chlazená centrifuga s výkyvnými rotory (objem až 6 l) a s maximálním zrychlením 8 000*g*

Heraeus Crist Biofuge A (Německo) – nechlazená mikrocentrifuga centrifuga pro 24 mikrozkuvek o objemu 1,5 ml, maximální odstředivé zrychlení je 13 000*g*

Univerzal 16 R, Hettich (Německo) – chlazená mikrocentrifuga určená pro 24 mikrozkuvek s maximálním odstředivým zrychlením 20 000*g*

Roth microcentrifuge (Taiwan) – stolní mikrocentrifuga pro 6 mikrozkuvek určená pro krátké stáčení vzorků

Gilson Capsulefuge PMC-880 (Francie) – stolní mikrocentrifuga pro 8 mikrozkuvek určená pro krátké stáčení vzorků

Elektroforézy

OWL (Anglie) – pro horizontální agarózovou elektroforézu, na velikosti gelů 7 x 8 cm a 13 x 11,5 cm

Thermo scientific OWL P10DS – vertikální elektroforéza, velikost gelu 16 x 16 cm

Agarózová elektroforéza (ČR) – velikost gelu 6 x 7,5 cm

Mini-Protean II – Bio-Rad (USA) – vertikální elektroforéza proteinů, velikost gelu 9,5 x 7,5 cm

X Cell SureLock™ Mini-Cell (USA) – vertikální elektroforéza proteinů, užívaná pro předpřipravené gely na SDS-PAGE a nativní elektroforézu, velikost gelu 8,5 x 9 cm

Elektroforetické zdroje Bio-Rad (USA) model 500/200 a model PAC 3000

Inkubátory a třepačky

Thermo 120 (ČR) – termoblok s možným nastavením teploty (max. 120 °C)

Biological Termostat BT120 (ČR) – inkubace Petriho misek

Biosan Multi-Shaker PSU 20 (ČR) – stolní třepačka vhodná pro inkubaci kultur v tekutých médiích

Stuart-block heater SBH130D (Anglie) – termoblok s možným nastavením teploty

Biosan MR-1 mini-rocker (ČR) – třepačka s kývavým pohybem užívaná pro promývání gelů

Gilson-vortex GVLab (Německo) – stolní vortex

PCR cyclery (USA)

PTC 100 MJ Research (cyclery s jedním termoblokem pro jeden typ mikrozkušavek)

PTC 200 MJ Research (cyclery s dvěma termobloky)

Další přístroje:

Analytické váhy Kern ABJ a Kern EG (Německo)

Phosphoimager – Bio-Rad Molecular Imager FX (USA) a kazeta s expoziční fólií BAS-MS2040 Fuji (Japonsko)

Geigerův-Müllerův počítač – mini monitor Series 900 (Anglie)

Spektrofotometr – Shimadzu UV-1601

Sonikační zařízení – Hielschener UP200S (Německo)

Sušička gelů Biomedra D 62-Schoeller (Německo)

Transiluminátor UVT-20M Herolab (Německo)

Vakuová pumpa KNFLAB Laboport (Německo/USA)

6.2 Chemikálie, enzymy a další preparáty

- [α -³²P] UTP (MGP Zlín)
- [γ -³²P] ATP (M.G.P., ČR)
- 2-merkaptoethanol (Serva, USA)
- 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)
- Ampicilin (Biotika, SR)
- BSA (Sigma, Německo)
- Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, USA)
- dNTP - ATP, CTP, GTP, UTP, TTP (Roche, USA)
- EDTA (Chelaton III, Lachema, ČR)
- Fenol (Sigma, Německo)
- GelRedTM (Biotium, USA)
- Chloramfenikol (Sigma, Německo)
- Izopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) (Sigma, Německo)
- Protein kináza A (Promega, USA)
- N, N, N', N'-tetramethylethyldiamine (TEMED) (LKB, Švédsko)
- N, N'-metylenbisacrylamid (Serva, USA)
- Restrikční enzymy - NdeI, XhoI, BamHI (TaKaRa, Japonsko; BioLabs, USA)
- T4 DNA ligáza (TaKaRa, Japonsko)
- Expand High Fidelity PCR System - Taq polymeráza a Tgo polymeráza (Roche, Německo)
- SDS (Serva, USA)
- Tris-HCl (Serva, USA)

Používaná kultivační média

- **Komplexní médium LB** – složení 1 litru:

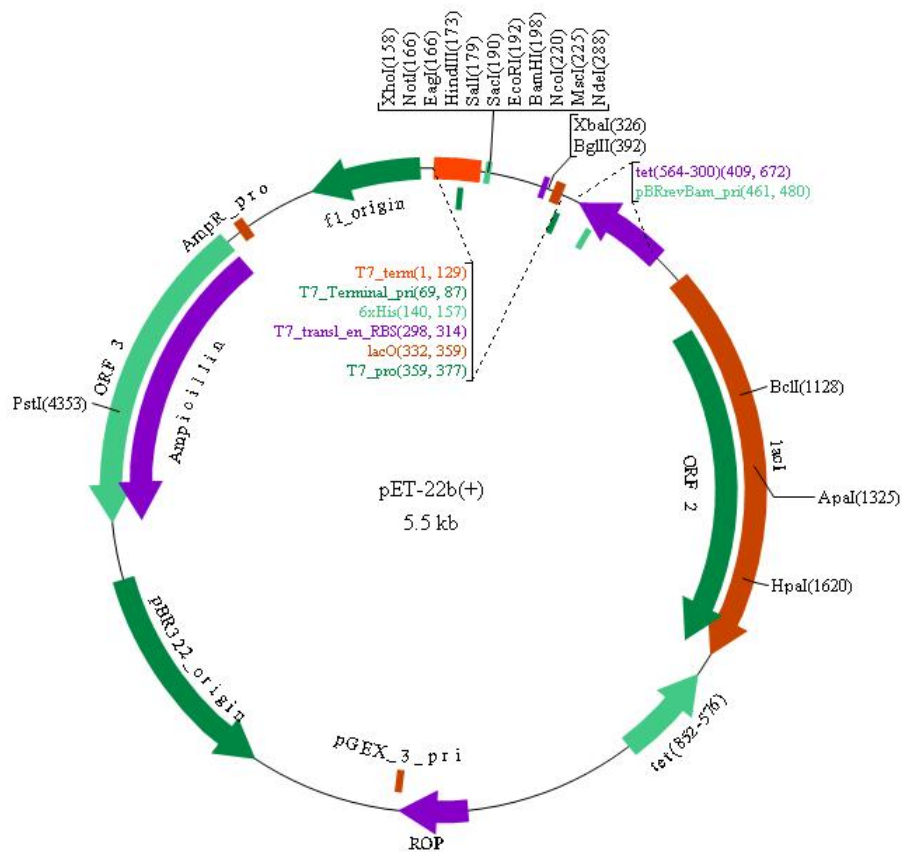
Složka směsi	Množství
Tryptone	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
NaCl	10 g
ddH ₂ O doplněná do 1 litru	

6.3 Používané bakteriální kmeny a plasmidové konstrukty

Příprava plasmidových konstruktů probíhala v *E. coli* v kmeni DH5 α . Kmeny *B. subtilis* i *E. coli* použité v této práci jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 2: Seznam používaných bakteriálních kmenů a plasmidů.

Kmen/plasmid	Genotyp	Reference
<i>B. subtilis</i>		
MH5636	<i>rpoC</i> -His10 : Cm	Qi and Hulett, 1998
LK637	MH5636 <i>rpoC</i> -His10: KO <i>rpoE</i> - Cm, Kan	Rabatinová <i>et al.</i> , rukopis v přípravě
<i>E. coli</i>		
RLG7396	pDG 3661 <i>rrn</i> BP1 (-39/+2)	Krasny and Gourse, 2004
RLG7557	pDG 3661 <i>Pveg</i> (-38/-1/+1G)	Krasny and Gourse, 2004
pRLG7023	BL21/pFL31/BsU_Delta	de Saro <i>et al.</i> , 1995
LK407	BL21/pET22b-pPKA/BsU_delta	Laboratoř
LK621	BL21/pET22b/BsU_Delta_1-95AK (N δ)	Rabatinová <i>et al.</i> , rukopis v přípravě
LK402	BL21/pET22b/BsU_Delta_1-65AK ($\frac{3}{4}$ N δ)	Tato práce
LK743	BL21/pET22b/BsU_Delta_1-45AK ($\frac{1}{2}$ N δ)	Tato práce
LK840	BL21/pET22b/BsU_YxbF	Tato práce
LK925	BL21/pET22b/BsU_YwcC	Tato práce
Plasmidy		
278	pET22b	Novagen
LK403	pET22b-pPKA	Laboratoř



Obrázek 18: Schéma plasmidu pET-22b(+) použitého pro klonování genů pro následnou nadprodukcí proteinů (<http://www.biovisualtech.com>).

6.4 Práce s DNA

6.4.1 Izolace plasmidové DNA z *Escherichia coli* DH5 α

Minipreparace

Touto metodou byla získána plasmidová DNA pro ověření vložených DNA konstruktů. Minipreparace byla prováděna za použití soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy QIAGEN. Princip této izolace plasmidové DNA je založen na adsorpci DNA na silikagel za přítomnosti vysoké koncentrace solí. RNA, proteiny a další nízkomolekulární intermediáty jsou odmyvány zvýšenou koncentrací solí a plasmidová DNA je následně eluována nízkou koncentrací solí.

Použité roztoky:

Pufr P1: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 nM EDTA; 100 μ g/ml RNáza A

Pufr P2: 200 mM NaOH; 1% SDS

Pufr EB: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Pufr N3

Pufr PB

Pufr PE

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Provedení:

- Jednou kolonií bylo inokulováno 10 ml LB média s antibiotikem ampicilinem (výsledná koncentrace 100 μ g/ml). Následně bylo inkubováno a třepáno ve 37 °C po dobu 12 – 16 hodin.
- Kultura byla centrifugována při 10 000g, 10 minut ve 4 °C. Supernatant byl odstraněn.
- K peletu bylo přidáno 250 μ l pufru P1, pelet byl resuspendován a převeden do mikrozkušavky.
- Bylo přidáno 250 μ l pufru P2 a jemně převrácením promícháno (4x – 6x). Probíhala lyze bakterií.
- Přidáním 350 μ l pufru B3 a následným převrácením byla lyze zastavena. Sraženina byla centrifugována 20 minut při 14 500g při 4 °C.
- Supernatant byl promíchán a přenesen na kolonku QIAprep. Pomocí centrifugace (12 000g, 4 °C, 1 minuta) supernatant prošel přes kolonku, byl odebrán ze spodní části kolonky a tento postup byl zopakován.
- Kolonka s navázanou plasmidovou DNA byla přečištěna 0,5 ml pufru BP a 2 x 0,75 ml pufru PE.
- Zbylé pufrы byly odstraněny z kolonky pomocí centrifugace (12 000g, 4 °C, 1 minuta).
- Plasmidová DNA byla eluována z kolonky pomocí 50 μ l pufru EB a následnou centrifugací do čisté mikrozkušavky.

Midipreparace

Touto metodou byla získána plasmidová DNA v dostatečném množství pro další pokusy. Na midipreparaci byl použit QIAGEN Plasmid Midi Kit od firmy QIAGEN a Wizard Plus Midipreps DNA Purification System od firmy Promega. Principem této metody je aniontoměničová chromatografie. Plasmidová DNA je na kolonce vychytávána na resinové částice při nízké koncentraci solí. RNA, proteiny a nízkomolekulární částice jsou odmyvány zvýšenou koncentrací solí. Plasmidová DNA je eluována vysokou koncentrací solí a následně je odsolena sražením v isopropanolu.

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)

Použité roztoky:

Pufr P1:	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 μ g/ml RNáza A
Pufr P2:	200 mM NaOH; 1% SDS
Pufr P3:	3,0 M octan draselný (pH 5,5)
Pufr QBT:	750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100 (v/v)
Pufr QC:	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% isopropanol (v/v)
Pufr QF:	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8,5); 15% isopropanol (v/v)
Zásobní roztok ampicilinu	(50 mg/ml)

Provedení:

- Do 100 ml LB média s přidaným ampicilinem (výsledná koncentrace 100 μ g/ml) byla přidána bakteriální kultura z glycerinové konzervy (-80 °C). Kultura byla inkubována za stálého třepání 12 – 16 hodin ve 37 °C.
- Narostlá kultura byla centrifugována při 10 000g 15 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl následně odstraněn.
- Pelet byl resuspendován v 4 ml pufru P1. Po přidání 4 ml pufru P2 byl roztok jemně promíchán a ponechán působit 1,5 minuty (lyze buněk).
- Neutralizačního pufru P3 byly přidány 4 ml a opět byl jemně promíchán.
- Roztok byl centrifugován 20 minut při 4 °C (8 000g).
- Kolonka byla ekvilibrována 4 ml QTB a byl na ni nanesen supernatant.
- Následně byla promyta 2 x 10 ml QC.
- Plasmidová DNA byla z kolonky eluována 5 ml QF do sterilní falkonky.
- K eluované DNA bylo přidáno 3,5 ml isopropanolu, plasmidová DNA v tomto roztoku precipituje.
- Roztok byl centrifugován 10 000g 30 minut při 4 °C.

- Supernatant byl opatrně slit a pelet s plasmidovou DNA opatrně opláchnut 70% ethanolem a usušen ve vakuu.
- Pelet byl rozpuštěn v 400 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) a výsledný roztok byl dále čištěn.

Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega)

Použité roztoky:

Cell Resuspension Solution:	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 100 μ g/ml RNáza A
Cell lysis Solution:	200 mM NaOH; 1% SDS
Neutralization Solution:	1,32 M octan draselný (pH 4,8)
Column Wash Solution:	80 mM octan draselný; 8,3 mM Tris-HCl (pH 7,5); 40 μ M EDTA; s přidaným ethanolem dle návodu
Resin:	7 M guanidin chlorid,
ddH ₂ O	
Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)	

Provedení:

- Do 100 ml LB média s přidaným ampicilinem (výsledná koncentrace 100 μ g/ml) byla přidána bakteriální kultura z glycerinové konzervy (-80 °C). Kultura byla inkubována za stálého třepání 12 – 16 hodin ve 37 °C.
- Narostlá kultura byla centrifugována při 10 000g 15 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl následně odstraněn.
- Pelet byl resuspendován v 3 ml pufru Cell Resuspension Solution.
- Po přidání 3 ml pufru Cell lysis Solution byl roztok jemně promíchán (lyze buněk).
- Promícháním roztoku s 3 ml Neutralization Solution byla lyze buněk zastavena.
- Roztok byl centrifugován 2 x 15 minut při 4 °C (14 000g). Supernatant obsahující DNA byl opatrně přenesen do nové zkumavky.
- K DNA v roztoku bylo přidáno 10 ml Resinu a tato směs byla promíchána.
- Kolonka byla připevněna na vakuovou pumpu a byl na ni nanesen Resin s DNA. Pod tlakem roztok prošel přes kolonku.
- Kolonka byla promyta 15 ml pufrem Column Wash Solution. Toto promytí bylo provedeno celkem 2x.
- Po druhém promytí kolonka prosychala ještě 20 sekund působením vakua.
- Spodní část kolonky obsahující membránu byla oddělena a vložena do minizkumavky. Následovala centrifugace 2 min při 10 000g. A následně byla přesunuta do čisté minizkumavky.

- Byla přidáno 300 μl ddH₂O o teplotě 70 °C a necháno 1 min působit, následně plasmidová DNA byla z kolony eluována centrifugací 20 sekund (10 000g).
- Plasmidová DNA s Resinem byla centrifugována 5 min při 10 000g a Resin vytvořil pelet.
- Supernatant obsahující plasmidovou DNA byl přenesen do čisté minizkumavky a uložen v -20 °C.

6.4.2 Purifikace plasmidové DNA fenolem, chloroformem

Touto metodou je DNA čištěna od proteinů a RNázy, která byla použita při midipreparaci.

Použité roztoky:

Fenol (pH 6,7): ekvilibrovaný s 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA

Chloroform

Provedení:

- K roztoku obsahující plasmidovou DNA byl přidán fenol v poměru 1:1. Byla vytvořena emulze, která byla 5 minut míchána převrácením zkumavky a následně centrifugována 5 minut při 12 000g. Do nové zkumavky byla odebrána vodná fáze (supernatant).
- K roztoku byla přidána $\frac{1}{2}$ objemu fenolu a stejné množství chloroformu. Směs byla 5 minut míchána převrácením zkumavky a následně centrifugována 5 minut při 12 000g.
- Do nové zkumavky byla odebrána vodná fáze, byl přidán chloroform v poměru 1:1. Směs byla 5 minut míchána převrácením zkumavky a následně centrifugována 5 minut při 12 000g.
- Plasmidová DNA byla dále precipitována ethanolem v prostředí octanu sodného (viz kapitola 6.4.3).

6.4.3 Precipitace plasmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného

Tato metoda slouží k vysrážení DNA z vodného roztoku přidáním koncentrovaného ethanolu. S DNA se srážejí i soli, které jsou následně odmyty 70% ethanolem. Přechištěná DNA je rozpuštěna ve vhodném pufru nebo injekční vodě.

Použité roztoky:

3 M octan sodný (pH 5,2)

96% a 70% ethanol

Provedení:

- Roztok s plasmidovou DNA byl smíchán s $\frac{1}{10}$ objemu 3 M octanu sodného a k takto vzniklému roztoku byl přidán 2,2 násobek objemu vychlazeného 96% ethanolu (-20 °C). Vše bylo důkladně promícháno a uloženo na 10 minut do -80 °C.
- Roztok byl centrifugován 30 minut při 14 000g, 4 °C.
- Pelet byl opláchnut 50 μ l vychlazeného 70% ethanolu, následně usušen a rozpuštěn v 30 μ l injekční vody.
- Koncentrace plasmidové DNA byla určena spektrofotometricky (viz kapitola 6.4.4).
- Plasmidová DNA byla následně analyzována restričním štěpením a pomocí elektroforézy (viz kapitola 6.4.5).

6.4.4 Měření optické denzity (OD)

Principem této metody je měření množství světla, které projde vzorkem oproti množství světla dopadající na vzorek. Tedy čím je vzorek hustší, tím méně světla projde a tím má vzorek větší absorpční. Měření probíhá na spektrofotometru Shimadzu UV - 1601, na kterém je možno nastavit požadovanou vlnovou délku světla dopadající na vzorek.

- Měření koncentrace buněk probíhá při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀)
- Měření koncentrace proteinů probíhá při vlnové délce 280 nm (OD₂₈₀)
- Měření koncentrace nukleových kyselin probíhá při vlnové délce 260 nm (OD₂₆₀)
- Pro zjištění čistoty vzorku NK se používá určení poměru absorpčních při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Tato hodnota u čistých vzorků by se měla pohybovat v rozmezí 1,7 - 2,0.

6.4.5 Analýza plasmidové DNA restričním štěpením**Použité roztoky:**

Restriční endonukleázy NdeI a XhoI: konečná koncentrace 1-2 U/500ng DNA
10x koncentrovaný restriční pufr (v tomto případě pufr H)

Provedení:

- Byla namíchána restriční směs o objemu 10 – 50 μ l, která obsahovala restriční endonukleázu v koncentraci 1-2 U/500ng DNA, restriční pufr ($\frac{1}{10}$ celkového objemu, je dodáván 10x koncentrovaný) a plasmidovou DNA (obvykle 10 μ l izolátu z minipreparace nebo 500 ng plazmidu vyizolovaného pomocí midipreparace).
- V případě, že byly použity 2 restriční endonukleázy současně, bylo nutné použít vhodný pufr, ve kterém jsou obě aktivní.
- Restriční směs byla inkubována 90 minut ve 37 °C.
- Po inkubaci byla reakce ukončena tepelnou inaktivací 10 minut při 65 °C.

6.4.6 Elektroforetická analýza DNA

K analýze DNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza. Princip této metody je založen na skutečnosti, že se DNA v roztoku chová jako polyanion a v elektrickém poli putuje k anodě. Pro kontrolu velikosti a pro odhad její koncentrace byl použit hmotnostní marker pUC Mix Marker, 8 (velikost fragmentů 1 118 – 67 párů bází) nebo DNA z bakteriofága lambda štěpená enzymy HindIII a EcoRI (velikost fragmentů v rozmezí 21 226 – 564 páru bází).

Použité roztoky:

50x TAE (pH 8,0): 2 M Tris-acetát, 50mM EDTA (pH 8,0)
vzorkový pufr pro DNA: 2,5 mg/ml bromfenolová modř; 2,5 mg/ml xylen cyanol;
30% glycerol; 6 mM EDTA
ethidium bromid (10 mg/ml) nebo GelRedTM (10 000x koncentrované)
Agaróza (0,5 – 2%)

Provedení:

- Nejprve byla sestavena aparatura pro elektroforézu.
- Požadované množství agarózy (hmotnostní jednotky odpovídají objemovým) bylo v mikrovlnné troubě rozvařeno v 1x TAE na 1% agar.
- Agaróza byla ochlazená na teplotu přibližně 50 °C a byl do ní přidán ethidium bromid nebo GelRed na výslednou koncentraci 0,5 µg/ml. Agaróza byla rychle nalita do elektroforetického aparátu.
- Ztuhlý gel byl zalit pufrům 1x TAE a do připravených komůrek byly nanášeny vzorky DNA (s přidáním bromfenolové modři a xylen cyanolem) a hmotnostní markery.
- Po nanesení vzorků byla DNA dělena za stálého napětí 5 V.cm⁻¹.
- Gely byly prohlíženy na UV transluminátoru při vlnové délce 320 nm a vyfotografovány fotoaparátem (Olympus).
- U plasmidů byla zkoumána jejich kvantita i kvalita.
- Pokud to vyžadoval další postup, byly vybrané DNA fragmenty z gelu vyříznuty a následně izolovány (viz kapitola 6.4.7 na následující straně).

6.4.7 Izolace DNA z gelu

Izolace DNA z gelu byla prováděna pomocí soupravy QIAquick Gel Extraction Kit od firmy Qiagen. Principem této metody je adsorpce DNA na silikagelovou membránu za vysoké koncentraci solí a eluce DNA je způsobena nízkou koncentrací solí. V průběhu jsou odmyty primery, nukleotidy, enzymy, soli, ethidium bromid a agaróza.

Použité roztoky:

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

Pufr EB: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Pufr PE

isopropanol

Provedení:

- Při prohlížení elektroforetického gelu na UV transluminátoru (vlnová délka 320 nm) bylo zvláště dbáno na to, aby DNA byla minimálně osvětlena UV světlem. Následně byla z agarózového gelu vyříznuta oblast, kde se nachází DNA.
- Vyříznutý díl byl zvážen a vložen do mikrozkušavky.
- Ke vzorku byl přidán pufr QC (3 objemy pufru na 100 mg vyříznutého dílu). Vzorek byl inkubován v 50 °C, každé 2 - 3 minuty promíchán až do úplného rozpuštění.
- Ke vzorku byl přidán 1 objem isopropanolu dle hmotnosti dílu (100 mg = 100 μ l).
- Roztok byl nanesen na kolonku a centrifugován 1 minutu při 12 500g při pokojové teplotě. Tyto podmínky byly stejné pro všechny centrifugace.
- Tento krok byl ještě jednou zopakován.
- Kolonka byla promyta 500 μ l pufru QC a následovala centrifugace.
- Na kolonku bylo nanесeno 750 μ l pufru PE, vzorek byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě a následně centrifugován.
- Aby byl odstraněn zbylý ethanol z kolonky (který je obsažen v pufru PE), opakovala se centrifugace prázdné kolonky.
- Horní část kolonky byla přenesena do nové mikrozkušavky. Ke vzorku bylo přidáno 30 μ l pufru PE.
- DNA byla z membrány eluována centrifugací.

6.4.8 Klonování DNA

Příprava DNA inzertů

Geny byly amplifikovány metodou PCR pomocí primerů, které nesly vždy na 5' konci oblast obsahující restrikční místa enzymů pro klonování. Tyto primery byly nejdříve navrženy, následně byla provedena PCR. PCR produkty byly izolovány z gelu (viz kapitola 6.4.7 na předchozí straně). Dále jejich konce byly štěpeny restrikčními endonukleázami a ty byly následně tepelně inaktivovány (viz kapitola 6.4.5 na straně 52).

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Nejprve byla namíchána reakční směs o finálním objemu 50 μl v jedné reakci, která obsahovala:

Složka směsi	Množství
10x pufr s MgCl_2	5 μl
10 mM dNTP	1 μl
forward primer (100 pmol/ μl)	1 μl
reverse primer (100 pmol/ μl)	1 μl
enzym Expand High Fidelity PCR systém (Tag polymeráza a Tgo polymeráza)	0,75 μl
templátová DNA	1 μg chromozomální DNA nebo 1 ng plasmidové DNA
iH_2O na doplnění objemu	

- Směs byla dobře promíchána, vložena do PCR cycleru PTC-200 a reakce probíhala na program TGO (' minuta, '' vteřina). V následující tabulce je zobrazen ukázkový program. Teplota při které nasedají primery (teplota annealingu) se mohla různit podle primerů.

Počet cyklů	Teplota	Čas
1x	95 °C	2'
1x	95 °C	15''
	56 °C	30''
	72 °C	1'
	95 °C	15''
5x	52 °C	30''
	72 °C	1'
	95 °C	15''
24x	48 °C	30''
	72 °C	1'
	95 °C	15''

- Produkty byly analyzovány elektroforeticky.

Příprava plasmidů

Plasmidy byly štěpeny odpovídajícími restrikčními endonukleázami (viz kapitola 6.4.5 na straně 52). Restrikční směsi byly rozděleny horizontální agarózovou elektroforézou, štěpené plasmidy byly izolovány z gelu (viz kapitola 6.4.7 na straně 54) a defosforylovány.

Defosforylace plasmidů

Defosforylace byla prováděna pomocí alkalické fosfatázy SAP dodané firmou USB, která defosforyluje 5' konce fragmentu.

Provedení:

- Nejprve byla namíchána reakční směs o finálním objemu 10 μl který obsahoval:

Složka směsi	Množství
10x SAP pufr	1 μl
enzym SAP (1 U/ μl)	1 μl
naštěpený plasmid iH ₂ O na doplnění objemu	

- Směs byla inkubována 60 minut při 37 °C a následně enzym byl inaktivován 20 minut při 65 °C.

Ligace inzertu do plasmidů

K ligaci byla použita T4 DNA ligáza od firmy Promega o koncentraci 20 U/ μl . Tento enzym spojuje kohezní konce plasmidů a ligovaných inzertů za vzniku fosfodiesterových vazeb. Reakce vyžaduje přítomnost ATP v prostředí.

Provedení:

- Byly namíchány reakční směsi o objemu 10 μl tak, aby obsahovaly:
 - plasmid a inzert v množstevním poměru 1:5
 - 1-5 U/ μl ligázy
 - ligační pufr o koncentraci 1x
 - 50 – 100 ng plasmidu
- Mikrozskumavky s reakcemi byly inkubovány 2 – 16 hodin při 16 °C.
- Ligace byla ukončena inkubací 15 minut při 65 °C.

Transformace buněk *Escherichia coli*

Transformace všech kmenů byla prováděna metodou tepelného šoku.

Provedení:

- Zmražené kompetentní buňky (-80 °C) pomalu roztály v ledové lázni (0 °C).
- Ligační směs nebo plasmidy byly rozpipetovány do vychlazených mikrozkušavek (4 °C) a bylo připipetováno 100 μl kompetentních buněk. Směsi byly lehce protřepány a inkubovány na ledu 30 minut.
- Mikrozkušavky byly dále inkubovány 90 sekund ve 42 °C a následně 5 minut na ledu.
- Do každé mikrozkušavky byl přidán 1 ml LB média, byly zaparafilmovány a horizontálně připevněny do stojánku na třepačce ve 37 °C. Inkubace trvala 1 hodinu.
- Buňky byly centrifugovány, supernatant částečně slit a ve zbylém supernatantu byl resuspendován pelet.
- Buňky byly rozetřeny na Petriho misky se selekčním antibiotikem a inkubovány dnem vzhůru ve 37 °C přes noc.

Sekvenační reakce

K ověření úspěšnosti klonování a transformace byla použita sekvenační reakce. Její vyhodnocení bylo provedeno na kapilárním sekvenátoru.

Provedení:

- Do mikrozkušavek o objemu 200 μl byl namíchán sekvenační mix o finálním objemu 10 μl . Složení 1 reakce:

Složka směsi	Množství
plasmidová DNA z vybraných kolonií	7 μl
premix – BigDye Terminator	2 μl
primer reverse/ forward	1 μl
iH_2O na doplnění objemu	

- Směs byla dobře promíchána a vložena do PCR cycleru (PTC-200) zajišťující následující reakce (25 cyklů):

Teplota	Čas	Proces
96 °C	10 sekund	tání DNA
58 °C	5 sekund	nasedání primerů
60 °C	4 minuty	polymerace

- Ke směsi bylo přidáno 10 μl 3 M acetátu sodného (pH 5,6) a 80 μl iH_2O . Vzorek byl promíchán a přepipetován do 1,5 ml mikrozkušavky.
- Následně bylo přidáno 5 μg glykogenu (0,25 μl) a vzorek byl promíchán.
- Ke vzorku bylo přidáno 300 μl 96% ethanolu a směs byla promíchána.
- Vzorek byl centrifugován 20 minut při 17 000g při 4 °C.
- Pelet byl opláchnut 250 μl 70% ethanolu, následovala 5 minut centrifugace za stejných podmínek.
- Pelet byl usušen v exikátoru a byl odeslán do sekvenační laboratoře.
- DNA sekvence byla zkontrolována pomocí programu EditSeq a ClustalX. Bakteriální kolonie obsahující požadovaný plasmid byly zakonzervovány do glycerinových konzerv (viz Glycerinová konzerva na této straně).

Glycerinová konzerva

Slouží pro dlouhodobé uchování bakterií v -80 °C.

- Z bakteriální kultury narostlé z 1 kolonie v LB médiu odebereme 850 μl a přidáme 150 μl glycerolu.
- Důkladně promícháme a uložíme do -80 °C.

6.5 Metody práce s proteiny

6.5.1 Exprese a izolace podjednotky δ RNAP z *B. subtilis*

Izolace podjednotky δ RNAP z *B. subtilis* byla provedena metodou izoelektrické precipitace. Principem této metody je vysrážení bílkoviny o daném izoelektrickém bodu (pI) z roztoku tím, že je přidán roztok o stejném pH jako má daná bílkovina.

Použité roztoky:

Lyzační pufr: 100 mM bis-tris (pH 6,0); 2 mM EDTA (pH 8,0); 100 mM NaCl;
0,1 mM DTT; 1 mM β -merkapt ethanol; 1 mM PMSF

Pufr A: 50 mM bis-tris (pH 6,0); 100 mM NaCl; 0,1 mM DTT;
1 mM β -merkapt ethanol; 1 mM PMSF

Eluční pufr: pufr A + 0,1 - 1 M NaCl; koncentrace stoupá po 0,1 M
750 mM acetát sodný (pH 3,6)

DB-0: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,1 mM DTT

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Provedení:

- Z glycerinové konzervy bylo inokulováno 10 ml LB média s ampicilinem (o finální koncentraci 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a inkubováno za stálého třepání 12 - 16 hodin ve 37 °C.
- Noční kulturou byl zaočkován 1 litr LB média s ampicilinem (o finální koncentraci 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) na $\text{OD}_{600} = 0,03$. Inkubace probíhala ve 37 °C, dokud kultura nedosáhla hodnoty $\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,8$.
- Následovala indukce exprese přidáním IPTG (finální koncentrace 0,8 mM) a inkubace pokračovala další 1,5 hodiny při pokojové teplotě.
- Kultura byla ochlazená (15 minut ve 4 °C) a následně centrifugována při 7 700g, 15 minut při 4 °C. Supernatant byl dokonale odstraněn a pelet byl resuspendován v 15 ml pufru P. Následná centrifugace probíhala za stejných podmínek, supernatant byl opět odstraněn.
- Pelet byl resuspendován ve 20 ml lyzačního pufru.
- Sonikace proběhla 13x po 10 sekund, vždy s minutovou pauzou na ledové lázni.
- Následně byl lyzát centrifugován 16 000g, 15 minut při 4 °C.
- Mezitím byla ekvilibrována vazebná matrix - 1 g prášku DE52 (Whatmann) s 10 ml pufru A. Směs byla promíchána a ekvilibrována 10 minut.
- Ihned po dokončení centrifugace byl supernatant přenesen k ekvilibrované vazebné matrix a bylo přidáno 190 ml pufru A.
- Směs byla jemně promíchávána 5 hodin při 4 °C. Následně byla směs přelita do odměrného válce a ponechána 12 hodin při 4 °C, matrix s navázaným proteinem sedimentovala.

- Většina tekutiny nad sedimentem byla odpipetována a zbylá tekutina byla promíchána s vazebnou matrix. Tato směs byla přenesena na předem promytou PolyPrep kolonku pufrem A.
- Směs na kolonce byla promyta 70 ml pufrem A.
- Eluce probíhala pomocí 10 x 5 ml elučního pufru se vzrůstající koncentrací NaCl. Frakce byly jímány po 1 ml.
- Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích bylo stanoveno metodou Bradfordové.
- K vybraným frakcím obsahující protein byl přidán acetát sodný (50 mM), centrifugován 5 minut při 17 000g, 4 °C.
- Supernatant byl odebrán a k peletu bylo přidáno 10 ml DB-0 pufru. Pelet se rozpouštěl 12 hodin v ledové lázni.
- Protein byl přečištěn pomocí dialýzy v glycerolovém pufru (viz kapitola 6.5.4 na straně 62).

6.5.2 Exprese a izolace RNAP z *B. subtilis*

Izolace RNAP z *B. subtilis* byla provedena na základě afinitní chromatografie. Principem této metody je interakce chelatačního nosiče (Ni^{2+}) s histidinovou kotvou připojenou na protein.

Použité roztoky:

Pufr P: 300 mM NaCl; 50 mM Na_2HPO_4 ; 3 mM β -merkaptoethanol; 5 mM glycerol; H_2O
2 M imidazol

Zásobní roztok chloramfenikolu (10 mg/ml)

Provedení:

- Z glycerinové konzervy bylo inokulováno 10 ml LB média s chloramfenikolem (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a inkubováno za stálého třepání 12 - 16 hodin ve 37 °C.
- Noční kulturou byly zaočkovány 2 litry LB média na $\text{OD}_{600} = 0,03$. Inkubace probíhala ve 37 °C, dokud kultura nezačala přecházet z exponenciální do stacionární fáze ($\text{OD}_{600} = 1 - 1,2$).
- Následovala inkubace 4 hodiny při pokojové teplotě.
- Kultura byla ochlazená (15 minut ve 4 °C) a následně centrifugována při 7 700g, 15 minut při 4 °C. Supernatant byl dokonale odstraněn a pelet byl resuspendován v 15 ml pufru P. Následná centrifugace probíhala za stejných podmínek, supernatant byl opět odstraněn.
- Pelet byl resuspendován ve 30 ml pufru P.
- Sonikace proběhla 20x po 10 sekund, vždy s minutovou pauzou na ledové lázni.
- Následně byl lyzát centrifugován 12 500g 25 minut při 4 °C. Ihned po dokončení byl supernatant přenesen k 1,5 ml nikl-agarózových kuliček (předem promytých pufrem P).

- Směs byla jemně promíchávána 60 minut při 4 °C.
- Mezitím byla připravena PolyPrep kolonka (promyta 5 ml pufru P).
- Na kolonku byla nanášena směs supernatantu a kuliček.
- Kolonka byla promyta 30 ml pufru P a 30 ml pufru P s přidavkem 30 mM imidazolu.
- Eluce byla provedena 10 ml pufru P s přidavkem 400 mM imidazolu. Frakce byly jímány po 1 ml do mikrozku mávek.
- Koncentrace proteinů byla určena metodou měření koncentrace podle Bradfordové a jejich přítomnost byla ověřena na SDS-PAGE (viz kapitola 6.5.6 na straně 63).
- Vybrané frakce byly přečištěny pomocí dialýzy (viz kapitola 6.5.4 na následující straně).

6.5.3 Expres e a izolace proteinů YxbF a YwcC

Izolace těchto proteinů byla provedena na základě afinitní chromatografie. Principem této metody je interakce chelatačního nosiče (Ni^{2+}) s histidinovou kotvou připojenou na protein.

Použit é roztoky:

Pufr P: 300 mM NaCl; 50 mM Na_2HPO_4 ; 3 mM β -merkaptoethanol; 5 mM glycerol; H_2O
100 mM IPTG

2 M imidazol

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Provedení:

- Z glycerinové konzervy bylo inokulováno 10 ml LB média s ampicilinem (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a inkubováno za stálého třepání 12-16 hodin ve 37 °C.
- Noční kulturou byl zaočkován 1 litr LB média s ampicilinem (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) na $\text{OD}_{600} = 0,03$. Inkubace probíhala ve 37 °C, dokud kultura nedosáhla hodnoty $\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,8$.
- Následovala indukce exprese přidáním IPTG (finální koncentrace 0,8 mM) a inkubace pokračovala další 3 hodiny při pokojové teplotě.
- Kultura byla ochlazená (15 minut ve 4 °C) a následně centrifugována při 7 700g, 15 minut při 4 °C. Supernatant byl dokonale odstraněn a pelet byl resuspendován v 15 ml pufru P. Následná centrifugace probíhala za stejných podmínek, supernatant byl opět odstraněn.
- Pelet byl resuspendován ve 30 ml pufru P.
- Sonikace proběhla 20x po 10 sekund, vždy s minutovou pauzou na ledové lázni.
- Následně byl lyzáát centrifugován 12 500g 25 minut při 4 °C. Ihned po dokončení byl supernatant přenesen k 1 ml nikl-agarózových kuliček (předem promytých pufr em P).

- Směs byla jemně promíchávána 60 minut při 4 °C.
- Mezitím byla připravena PolyPrep kolonka (promyta 5 ml pufru P).
- Na kolonku byla nanášena směs supernatantu a kuliček.
- Kolonka byla promyta 30 ml pufru P, 30 ml pufru P s přidavkem 30 mM imidazolu.
- Eluce byla provedena 10 ml pufru P s přidavkem 400 mM imidazolu. Frakce byly jímány po 1 ml do mikrozkušavek.
- Koncentrace proteinů byla určena metodou měření koncentrace podle Bradfordové a čistota proteinů byla ověřena na SDS-PAGE (viz kapitola 6.5.6 na následující straně).
- Vybrané frakce byly přečištěny pomocí dialýzy (viz kapitola 6.5.4).

6.5.4 Dialýza - pročištění proteinového izolátu

Principem dialýzy je selekční velikost pórů dialyzační kazety ve které je umístěn vzorek. Malé molekuly mohou volně procházet, velké nemohou. Díky výměně pufrů byl vzorek pročištěn a rozpuštěn v požadovaném pufru.

Použité roztoky:

glycerolový pufr: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 3 mM β -merkaptoethanol;
50 mM glycerol; H₂O

Provedení:

- Dialyzační kazetu byla hydratována v dialyzačním glycerolovém pufru přibližně 2 minuty.
- Pomocí injekční stříkačky byl do kazety aplikován vzorek a následně byl odsátý přebytečný vzduch.
- Dialýza probíhala při teplotě 4 °C 2 x 6 hodin (s výměnou dialyzačního pufru).
- Vzorek byl následně vyjmut nasátím do injekční stříkačky a umístěn do mikrozkušavky.

6.5.5 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Ke stanovení koncentrace proteinů byla použita metoda podle Bradfordové. Principem této metody je posun absorpčního maxima po vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu. Za použití kalibrační křivky se známou koncentrací proteinu bylo možné určit skutečnou koncentraci neznámého proteinu nebo směsi proteinů.

Použité roztoky:

Bradfordové činidlo: roztok Coomassie Brilliant Blue G-250 (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuštěn v 50 ml ethanolu; 8,5% H₃PO₄; H₂O doplnit do 1 l)

4 μ g/ μ l BSA

Provedení:

- Vzorek bílkoviny byl doplněn iH_2O na objem $100 \mu\text{l}$ a zároveň byla namíchána kalibrační křivka pomocí známých koncentrací BSA.
- Ke všem vzorkům byl přidán 1 ml činidla podle Bradfordové, směs byla promíchána a inkubována 5 minut.
- Všechny vzorky byly měřeny pomocí spektrofotometru při A_{595} a naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel.

6.5.6 Polyakrylamidová elektroforéza proteinů v prostředí SDS (SDS-PAGE)

K elektroforetické analýze proteinů byla použita metoda vertikální polyakrylamidové elektroforézy v denaturačním prostředí SDS (SDS-PAGE). Byl použit zaostřovací gel a separační gel, kde byly proteiny děleny podle jejich molekulové hmotnosti. Pro standardizování metody jsou používány přednalité gely NuPAGE[®] Novex Bis-Tris Mini Gels od firmy Invitrogen.

Použité roztoky:

Vzorkový pufr: NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4x)

NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris Gel

NuPAGE[®] MES SDS Running Buffer (20x)

Coomassie brilliant blue R-250: 25% methanol, 10% kyselina octová

Odbarvovací roztok: 12 % ethanolu 96%; 7 % kyseliny octové; dH_2O

Provedení:

- $10 \mu\text{l}$ vzorku bylo smícháno s příslušným množstvím vzorkového pufru a inkubováno při $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 minut.
- Byla sestavena aparatura X Cell *SureLock*[™] Mini-Cell.
- Po zalití přednalitého gelu pufrem 1x MES SDS Running Buffer, byl odstraněn hřeben, komůrky propláchnuty a vzorky naneseny.
- Elektroforéza obvykle probíhá 35 minut při napětí 200 V.
- Gel byl dále barven Coomassie brilliant blue R-250, následně odbarven odbarvovacím roztokem a převeden do digitální podoby.

6.5.7 Nativní polyakrylamidová elektroforéza proteinů

Tato metoda využívá rozdílné molekulové hmotnosti proteinů a zároveň přirozeného náboje proteinů, díky kterému se různě pohybují v elektrickém poli. Tato elektroforéza probíhá za nedenaturujících podmínek a proto je vhodná např. pro pozorování vazeb mezi proteiny či rozdělení proteinů o stejné molekulové hmotnosti. Opět se používá gel zaostřovací a gel separační.

Použité roztoky:

10x TBE: 0,9 M Tris-HCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 0,9 M kyselina boritá
 30% AA-Bis
 10% APS, TEMED
 NativePAGE™ Sample Buffer (4x) - Invitrogen
 NativePAGE™ Running Buffer (20x) - Invitrogen

Provedení:

- Nejprve byla připravena aparatura pro nalévání gelů. Čistá skla byla omyta 96% ethanolem a byla umístěna do držáku a připevněna do nalévacího stojanu.
- Podle tabulky byly namíchány separační gely o hustotě 4 % (uvedeno pro 2 gely).

Hustota gelů	4%
10 x TBE	1 ml
30% AA-Bis	1,33 ml
dH ₂ O	7,5 ml

- Do roztoku bylo přidáno 35 μ l 10% APS a 4,4 μ l TEMEDu. Promícháno a okamžitě aplikováno mezi skla. Nalité gely byly převrstveny dH₂O a nechány utuhnout.
- Po utužení byla vrstva vody odsáta a namíchán 4% zaostřovací gel (podle následující tabulky).

Hustota gelů	4%
10 x TBE	625 μ l
30% AA-Bis	325 μ l
dH ₂ O	1,52 ml

- Do roztoku bylo přidáno 35 μ l 10% APS a 3,8 μ l TEMEDu. Promícháno, okamžitě aplikováno mezi skla, zasunuty hřebeny a gely nechány utuhnout.
- Po zatuhnutí gelů byla skla vložena do komory pro vlastní elektroforézu, zalita vychlazeným pufrům 1 x TBE, byly vyndány hřebeny.
- Do vzorků byl přidán vzorkový pufr a vzorky naneseny do komůrek.
- Elektroforéza probíhala při napětí 150 V.

6.5.8 Značení proteinů pomocí $[\gamma -^{32} \text{P}] \text{ATP}$ pomocí Protein kinázy A

Tato metoda je založena na přítomnosti 7 AK připojených k proteinu (tzv. Kemptide). K těmto 7 AK má afinitu cAMP-dependentní protein kináza (PKA), která je schopna označit tyto AK pomocí $[\gamma -^{32} \text{P}] \text{ATP}$. Radioaktivní signál byl měřen denzitometricky.

Byly použity kolonky PD SpinTrap™G-25 od firmy GE Healthcare. Tyto kolonky oddělují molekuly s velkou molekulovou hmotností od molekul s malou molekulovou hmotností pomocí gelové filtrace. Používají se pro odsolení, výměnu pufru nebo vyčištění proteinů.

Použité roztoky:

Ekvilibrační pufr: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 12 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 50% glycerol; iH₂O

Pufr pro PKA: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 12 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 25% glycerol

cAMP-dependentní protein kináza (138 U/ μ l)

[γ -³²P] ATP (aktivita 9,25 MBq)

kolonky PD SpinTrapTMG-25

Provedení:

- Jelikož se při experimentu pracuje s β zářičem, je nutné používat ochranné pomůcky (rukavice, brýle, plexisklové štíty) a pracovat ve vyhrazeném prostoru.
- Nejdříve byl namíchán pufr pro PKA a rozdělen do mikrozkuvek, podle počtu proteinů. Ekvilibrační pufr byl také připraven.
- Do jednotlivých mikrozkuvek bylo nanášeno 60 μ l příslušného proteinu, tak aby celkový objem byl 100 μ l.
- Ke směsi bylo přidáno 1,7 μ l PKA a 2 μ l [γ -³²P] ATP, lehce promícháno a inkubováno 30 minut při pokojové teplotě.
- Kolonka PD SpinTran G-25 byla promíchána, její spodek odříznut skalpelem a kolonka umístěna do mikrozkuvky. Centrifugována 1 minutu při 800g.
- Kolonka byla promyta 300 μ l Ekvilibračního pufru, centrifugována 1 minutu při 800g, umístěna do nové mikrozkuvky. Takto promyta byla ještě 4x.
- Kolonka byla umístěna do čisté mikrozkuvky a do jejího středu nanášen radioaktivní vzorek.
- Radioaktivně označený protein byl eluován centrifugací 2 minuty při 800g.

6.6 Transkripční experimenty

Transkripční experimenty byly prováděny s holoenzymem RNAP z *B. subtilis* rekonstituovanou z jádra RNAP *B. subtilis* a z podjednotky σ^A . Holoenzym RNAP byl použit pro transkripci ze dvou plasmidu s různými promotory - *rrnB* P1 a *Pveg*.

Při reakci byl použit radioaktivně značený nukleosid trifosfát - UTP. Radioaktivně označen je jeho α fosfát obsahující ^{32}P . ^{32}P je β zářič s poločasem rozpadu 14,3 dne. Vzniklé záření při rozpadu UTP zabudovaného do řetězce RNA je absorbováno pomocí absorpční folie. Množství produktu transkripční reakce bylo měřeno pomocí phosphoimageru. Vznikající transkripty jsou vždy stejně velké a proto poměr intenzity záření jednotlivých záření odpovídá poměru množství vzniklého transkriptu.

Určování aktivity jednotlivých proteinů na daných promotorech

Transkripce se provádí za zvyšující se koncentrace zkoumaného proteinu rekonstituovaného s RNAP, zatímco koncentrace ostatních reaktantů je konstantní. Množství produktu transkripční reakce přímo odpovídá aktivitě RNAP ovlivněné daným proteinem. Množství produktu se po elektroforéze měří pomocí phosphoimageru. Z relativního poměru množství transkriptu můžeme usoudit, jaký efekt má daný protein na RNAP.

Použité roztoky:

20x koncentrovaný transkripční pufr:	800 mM Tris-HCl (pH 7,9); 20 mM DTT; 200 mM MgCl_2
20 mM ATP, GTP, CTP	
1 mM UTP	
$[\alpha -^{32}\text{P}]$ UTP (aktivita 18,5 Mbq)	
zásobní roztok plasmidu 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$	
10 mg/ml BSA	
1 M KCl	
iH_2O	
zásobní roztok RNAP z <i>B. subtilis</i> (30 nM)	
STOP pufr:	95% formamid; 0,05% bromfenolová modř; 20 mM EDTA (pH 8,0); 0,05% xylene cyanol
10x TBE:	0,9 M Tris-HCl; 0,02 M EDTA pH 8,0; 0,9 M kyselina boritá
7% AA	
10% APS, TEMED	

Provedení:

- Jelikož se při experimentu pracuje s β zářičem, je nutné používat ochranné pomůcky (rukavice, brýle, plexisklové štíty) a pracovat ve vyhrazeném prostoru.
- Nejprve byla namíchána transkripční směs, kromě RNAP. Složení reakční směsi pro 1 reakci je zobrazeno v následující tabulce:

Objem (μl)	Složka směsi
0,45	20x koncentrovaný transkripční pufr
0,1	20 mM ATP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	20 mM CTP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	20 mM GTP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	1 mM UTP (finální koncentrace 10 μM)
0,1	$[\alpha -^{32}\text{P}]\text{UTP}$
1	plasmid (koncentrace zásobního roztoku 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
4,45	iH_2O
0,1	10 mg/ml BSA
1,5	1 M KCl

- Reakční směs byla připravena pro příslušný počet reakcí a následně rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek (8 μl do každé).
- RNAP byla rekonstituována s σ^A v molárním poměru 1:10 tak, aby byla RNAP plně saturována (15 minut při 30 °C).
- RNAP se σ^A byla rekonstituována s testovaným proteinem 15 minut při 30 °C (10 postupně zvyšujících se koncentrací proteinu).
- Zkušavky byly preinkubovány 5 minut při 5 °C. Reakce byly iniciovány 2 μl RNAP (finální koncentrace 30 nM). Celkový objem byl 10 μl .
- Transkripce probíhala 15 minut při teplotě 30 °C a byla ukončena přidáním 10 μl STOP pufru (obsahuje formamid denaturující RNAP a chelatační činidla vychytávající Mg^{2+} ionty potřebné pro transkripci). Směs byla promíchána a uložena na led.
- Produkty transkripce byly separovány pomocí denaturační polyakrylamidové elektroforézy (7% gel, TBE pufr). Gel byl následně usušen a uzavřen do expoziční kazety (obsahuje citlivou folii, která absorbuje záření transkriptů).
- Primárním výsledkem byl obraz gelu se zřetelně ozářenými proužky odpovídající transkriptům. Intenzity jednotlivých signálů byly měřeny pomocí programu Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikovány pomocí programu Bio-Rad Quantity One. Množství signálu bylo určeno po odečtení pozadí.
- Výsledky byly zpracovány a vyneseny do grafu pro názornější zobrazení pozorovaného efektu.

7 Cíle diplomové práce

Cílem mé práce bylo přispět k charakterizaci podjednotky δ RNAP z *B. subtilis*.

- **Hledání vazebných partnerů podjednotky δ RNAP.** Na základě výsledků ze studie vazebných partnerů podjednotky δ RNAP ve *Streptococcus pneumoniae*, byl nalezen protein interagující s δ z tohoto organismu. U *B. subtilis* byly identifikovány proteiny s nejvyšší homologií – YxbF a YwcC. Prvním cílem mé diplomové práce bylo připravit tyto proteiny a zjistit, jestli interagují s podjednotkou δ RNAP v *B. subtilis*. Protože YxbF a YwcC patří mezi transkripční faktory a zároveň podjednotka δ ovlivňuje transkripci, byl rovněž zkoumán vliv těchto proteinů na transkripci *in vitro*.
- **Příprava zkrácených variant podjednotky δ RNAP.** Z teoretické části je patrné, že podjednotka δ je významným faktorem ovlivňujícím transkripci. Přesto není dosud jasný přesný mechanismus efektů, které působí. Podjednotka δ je rozdělena na strukturovanou N-koncovou a flexibilní C-koncovou doménu. Druhým cílem mé diplomové práce bylo připravit kmeny *E. coli*, které nadprodukují fragmenty N-koncové části podjednotky δ . Tyto fragmenty by v budoucnu měly pomoci objasnit, jaká část této domény je nutná pro zachování její funkce a jakou roli hraje N-koncová doména podjednotky δ v iniciaci transkripce.
- **Hledání homologů/analogů proteinu δ v jiných organismech.** Podjednotka δ RNAP se vyskytuje unikátně u gram-pozitivních bakterií. Hledání sekvenčně i strukturně podobných proteinů v jiných organismech by mělo vést k lepšímu pochopení fyziologické funkce δ . Zároveň toto studium pomůže objasnit mechanismus účinku proteinů u různých organismů.

8 Výsledky

8.1 Hledání vazebných partnerů podjednotky δ RNAP z *B. subtilis*

Na základě našeho podmětu, Peter Uetz z J. Craig Venter Institutu (USA) použil dvouhybridní kvasinkový systém (*Yeast two-hybrid system*, Y2H) k analýze interagujících proteinů s δ . K dispozici měl Y2H pro gram-pozitivní bakterii *Streptococcus pneumoniae*. Pomocí tohoto přístupu identifikoval protein SP_2234, který s δ interaguje. Na základě těchto informací byly identifikovány homologní proteiny z *B. subtilis* k proteinu SP_2234. Výsledky hledání homologních proteinů jsou ukázány v tabulce 3.

Tabulka 3: Homologní proteiny z *B. subtilis* k proteinu SP_2234 ze *S. pneumoniae*. Do následujících experimentů byly vybrány 2 s nejvyšší homologií – YxbF a YwcC. Zkratka TR zastupuje transkripční regulátor (*transcriptional regulator*) z TetR/AcrR rodiny.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
<i>B. subtilis</i> 168 BG11356 YxbF : unknown; similar to unknown proteins	44	7e-06
<i>B. subtilis</i> 168 BG10579 YwcC : unknown; similar to unknown proteins	37	5e-04
<i>B. subtilis</i> 168 BG14113 YvkB: unknown; similar to TR	35	0.002
<i>B. subtilis</i> 168 BG12428 YvdT: unknown; similar to TR	35	0.003
<i>B. subtilis</i> 168 BG12146 YdeS: unknown; similar to TR	34	0.006
<i>B. subtilis</i> 168 BG12330 YsiA: unknown; similar to TR	30	0.065

Byly vybrány 2 proteiny s nejvyšší homologií k původnímu proteinu: YxbF a YwcC. Z tabulky je jasně patrné, že homologie těchto proteinů s proteinem SP_2234 je relativně nízká. Přesto jsme se rozhodli ověřit, jestli jsou tyto proteiny vazebnými partnery δ i v *B. subtilis*.

8.1.1 Experimentální strategie

1. Nejprve byly geny *yxbF* a *ywcC* zaklonovány do vybraného vektoru. Připravený vektor byl transformován do buněk *E. coli* DH5 α a vytvořený konstrukt byl ověřen sekvenací.
2. Ověřený vektor byl transformován do expresních buněk *E. coli* BL21. Pomocí těchto buněk se podařilo připravit nadprodukovaný protein YxbF v dostatečné koncentraci a množství pro následné experimenty.
3. Interakce mezi proteiny YxbF a δ byla studována pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy. δ byla radioaktivně označena.
4. Vzhledem k výraznému efektu δ na transkripci a příslušnosti YxbF k rodině transkripčních faktorů, byl rovněž studován vliv proteinu YxbF na transkripci *in vitro*. Experimenty byly prováděny na ribosomálních promotorech *rrnB* P1 a *Pveg*. Byl testován nejen možný přímý vliv proteinu YxbF, ale také jeho efekt v součinnosti podjednotkou δ na transkripci *in vitro*.

8.1.2 Příprava vektoru pro expresi proteinu YxbF a YwcC

Amplifikace genů *yxbF* a *ywcC* byla provedena standardně (viz kapitola 6.4.8 na straně 55) s použitím Expand High Fidelity PCR systému (Roche). Pro amplifikaci genů *yxbF* a *ywcC* byly navrženy následující primery (s ohledem na sekvenci genů zobrazených na obr. 19 a na restrikční místa na plasmidu zobrazeném na obr. 20 na následující straně):

Primery pro gen *yxbF*:

Primer s označením 500 5' tg **ggatcc** gtg ccg gaa tct gcc gaa gc 3'

– primer pro 5' konec genu („Forward“) obsahující restrikční místo pro BamHI (označeno červeně).

Primer s označením 501 3' ccg **ctcgag** aag caa tac aac ctt ata ttt c 5'

– primer pro 3' konec genu („Reverse“) obsahující restrikční místo pro XhoI (označeno zeleně).

Primery pro gen *ywcC*:

Primer s označením 503 5'tg **ggatcc** atg aaa aaa aac aaa ttt caa at 3'

– primer pro 5' konec genu („Forward“) obsahující restrikční místo pro BamHI (označeno červeně).

Primer s označením 504 3'ccg **ctcgag** ctg atg ttc ctc gct ttc tg 5'

– primer pro 3' konec genu („Reverse“) obsahující restrikční místo pro XhoI (označeno zeleně).

Oba geny (*yxbF* i *ywcC*) byly zaklonovány do plasmidu pET22b, který byl vyizolován podle postupu uvedeném v kapitole Midipreparace na straně 49. Tyto geny byly tedy vloženy pod T7 inducibilní promotor a na C-konci byla připojena histidinová kotva pro následnou izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie.

Získaný vektor byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α . Vybrané kolonie rezistentní na ampicilin byly otestovány restrikční analýzou pro jistotu, že do nich byl zaklonován požadovaný gen. Sekvence vloženého genu byla ověřena sekvenací.

Gen *yxbF*:

```

1 - gtg ccg gaa tct gcc gaa gct caa gtg aaa
31 - gag gcg ctg ctg gct tta ttg aaa gat aga
- - - - -
1081 - gtg ctg gcg agg gag ttt ttg cag ttt ttg
1111 - gat gtg aag aaa tat aag gtt gta ttg ctt

```

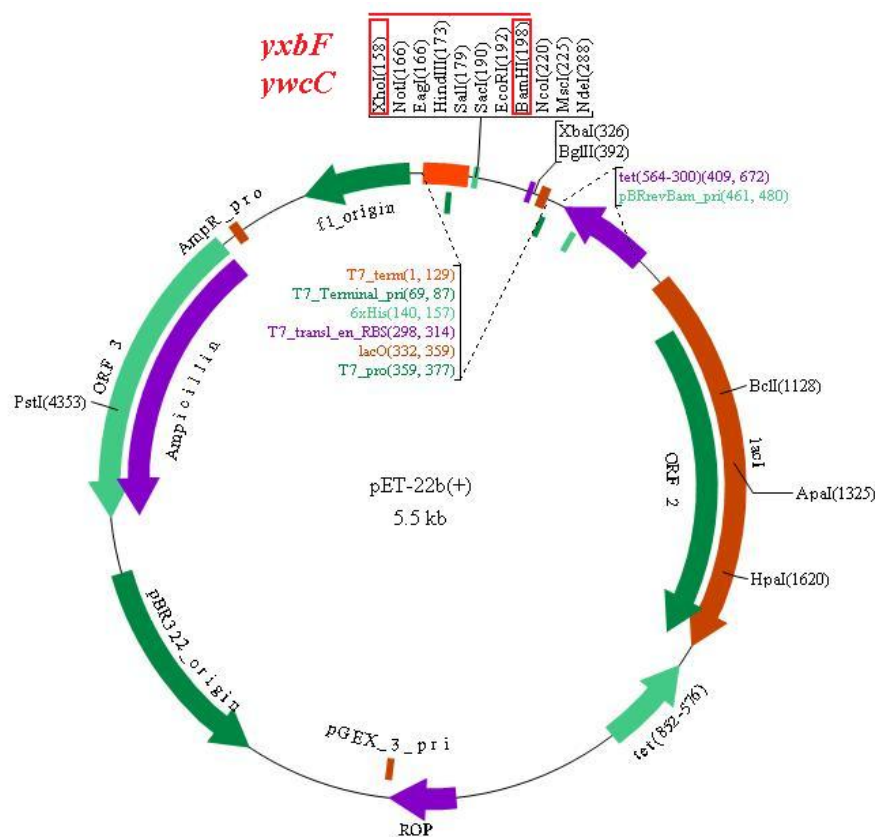
Gen *ywcC*:

```

1 - atg aaa aaa aac aaa ttt caa att aaa aga
31 - gaa gca aca ttt gaa agt ttt ata gac gct
- - - - -
601 - ttt act tta gac aga gag cac gag agg cca
631 - aga att ttg aaa agt ttt tca gaa agc gag
661 - gaa cat cag

```

Obrázek 19: Sekvence genu *yxbF* a *ywcC*. U genu *yxbF* je žlutě zvýrazněna sekvence komplementární k primeru 500, zeleně k primeru 501. U genu *ywcC* je růžově zvýrazněna sekvence komplementární k primeru 503 a modře k primeru 504.



Obrázek 20: Plasmid pET22b s vyznačeným místem pro klonování genů *yxbF* a *ywcC*. Červeně jsou zobrazena restrikční místa pro vložení žádaných genů.

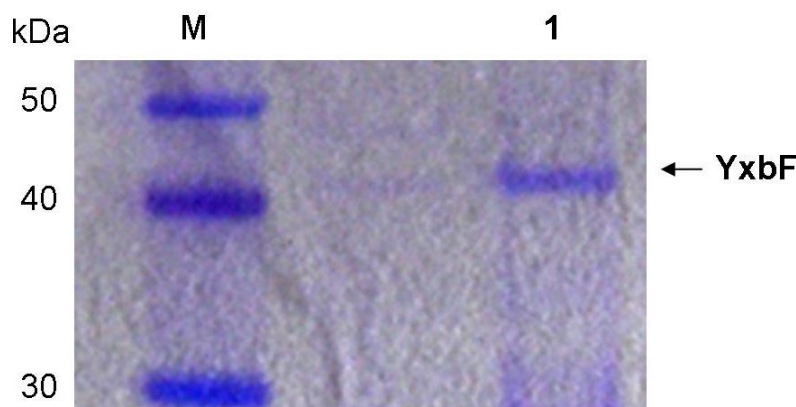
8.1.3 Exprese a purifikace proteinů YxbF a YwcC

Připravený plasmid pET22b nesoucí gen *yxbF* nebo *ywcC* byl transformován do expresních buněk *E. coli* BL21 a byly vytvořeny glycerinové konzervy pro dlouhodobé uchování kmenů (LK840 byl označen pET22b s genem *yxbF* a LK925 byl označen pET22b s genem *ywcC* v *E. coli* BL21).

Z příslušných glycerinových konzerv byl zaočkován 1 litr LB média s ampicilinem a kultury narostly až do $OD_{600} = 0,75$. Poté byly indukovány IPTG a inkubovány další 3 hodiny při pokojové teplotě. Pro izolaci metodou afinitní chromatografie byla využita nikl-agarózová matrix (blíže popsáno v kapitole 6.5.3 na straně 61). Následně eluované frakce byly analyzovány na SDS-PAGE a frakce obsahující požadovaný protein byly přečištěny dialýzou v glycerolovém pufru.

Ani po mnohých pokusech se nepodařilo vyizolovat protein YwcC. Protože má nižší homologii s proteinem SP_2234 ze *S. pneumoniae* než YxbF, nadále bylo pokračováno v experimentech pouze s proteinem YxbF. V případě nalezení interakce mezi YxbF a podjednotkou δ RNAP, by mělo význam dále se zabývat izolací proteinu YwcC.

Úspěšně vyizolovaný protein YxbF je zobrazen na obrázku 21.



Obrázek 21: SDS-PAGE proteinu YxbF. **M** proteinový marker Novex Sharp Pre-strained; **1** protein YxbF o velikosti přibližně 44 kDa.

8.1.4 Radioaktivní naznačení podjednotky δ

Pro následující interakční studie bylo nutné protein označit radioaktivně pomocí $[\gamma -^{32}\text{P}]$ ATP. Toto značení provádí enzym Protein kináza A, která má afinitu k 7 AK připojených k proteinu (PKA doména, tzv. Kemptide). PKA doména byla do vektoru pET22b zaklonována pomocí restričních míst NdeI a BamHI již dříve v naší laboratoři. Tento plasmid byl označen jako pET22b-pPKA (LK403). Protein δ s PKA doménou (kmen LK407) byla předem vyizolována postupem uvedeným v kapitole 6.5.1 na straně 59.

Při radioaktivním značení proteinu δ byly použity kolonky PD SpinTrapTMG-25 od firmy GE Healthcare. Podrobný popis provedení této metody se nachází v kapitole 6.5.8 na straně 64. Postup radioaktivního naznačení podjednotky δ byl již dříve standardizován v naší laboratoři. Protein byl následně analyzován pomocí SDS-PAGE. Gel byl po obarvení vyfocen a

uzavřen do expoziční kazety, která obsahovala citlivou fólii schopnou absorbovat radioaktivní záření. Po naskenování této fólie byly primární výsledky zpracovány pomocí programu Bio-Rad Molecular Imager FX a porovnány s SDS-PAGE obarvené Coomassie brilliant blue R-250. Radioaktivní označení δ bylo provedeno úspěšně.

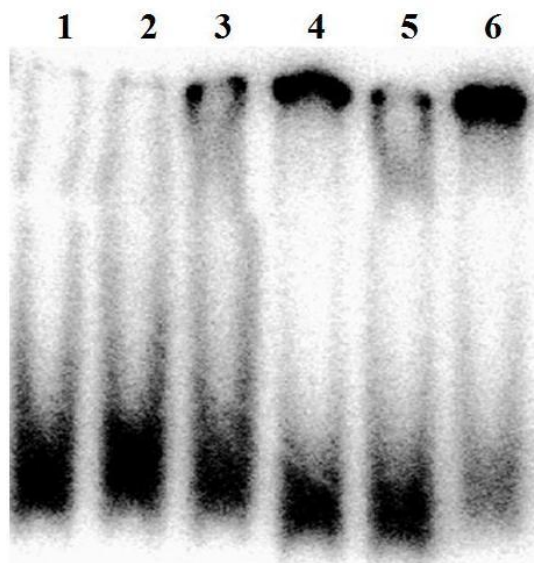
8.1.5 Studium interakce mezi δ a YxbF

Ke studiu interakce mezi δ a YxbF byla použita nativní polyakrylamidová elektroforéza (viz kapitola 6.5.7 na straně 63). V následujících experimentech byla použita pro detekci vazby radioaktivně označená δ . Proteiny o požadované koncentraci byly rozděleny do mikrozkumavek a inkubovány 15 minut při 30 °C, aby mohly být vytvořeny specifické komplexy. Poté byly vzorky s vzorkovým pufrům naneseny na předem připravený 4% nativní gel (separační a zaostřovací gel). Elektroforéza probíhala při 4 °C z důvodů vytvoření podmínek šetrných vůči případným komplexům.

Výsledky tohoto experimentu jsou zobrazeny na obrázku 22 na následující straně. V 1. dráze je vidět samotná δ . Pokud by δ interagovala s YxbF, měl by být vidět posun radioaktivního signálu směrem vzhůru, protože by vytvořily větší a méně kompaktní komplex (dráha 2). Divoký typ (*wild type*, wt) RNAP není plně saturován δ (dráha 3), obdobně jako po přidání proteinu YxbF (dráha 5). Je patrný výrazný rozdíl v množství navázané δ na $\Delta\delta$ RNAP (kde byl gen pro protein δ byl nahrazen kanamycinovou rezistencí, dráha 4) oproti wt RNAP.

Na základě tohoto několikrát opakovaného experimentu lze usoudit, že YxbF se nejspíše na δ neváže (porovnání drah 1 a 2).

Po porovnání drah 4 ($\Delta\delta$ RNAP s δ) a 6 ($\Delta\delta$ RNAP s δ a YxbF) byla vytvořena hypotéza, že protein YxbF by mohl pomáhat δ při vazbě na RNAP.



sloupec	1	2	3	4	5	6
δ	+	+	+	+	+	+
YxbF		+			+	+
wt RNAP			+		+	
$\Delta\delta$ RNAP				+		+

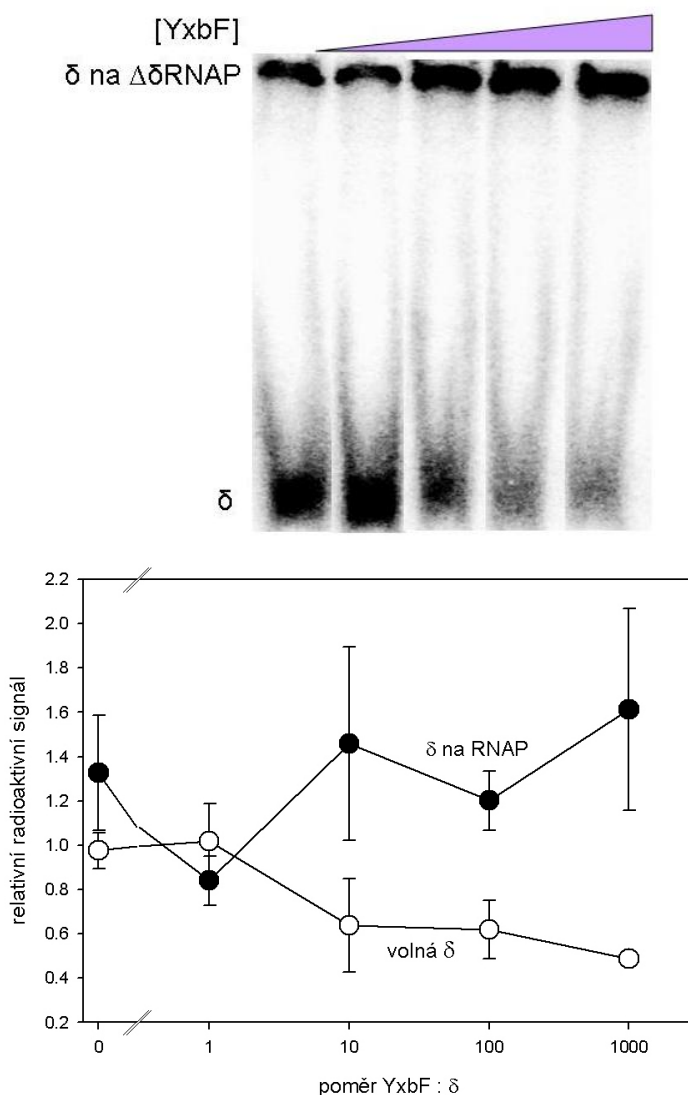
Obrázek 22: Nativní polyakrylamidová elektroforéza s radioaktivně značenou δ . V tabulce pod obrázkem jsou naznačeny složky jednotlivých sloupců. Ve 2. dráze není vidět žádný posun radioaktivně značené δ v porovnání s 1. drahou. Z čehož lze usuzovat, že YxbF nejspíše neinteraguje s δ .

8.1.6 Může YxbF pomáhat δ při interakci s RNAP?

Odpověď na tuto hypotézu byla ověřována opět pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy, která probíhala za stejných podmínek jako v předchozích experimentech. Byly zvoleny stálé koncentrace δ a $\Delta\delta$ RNAP, pouze koncentrace YxbF se postupně zvyšovala.

Vyhodnocení primárních dat probíhalo pomocí programu Bio-Rad Molecular Imager FX, kterým byly měřeny intenzity jednotlivých signálů a následně byly kvantifikovány pomocí programu Bio-Rad Quantity One. Výsledky byly zpracovány a vyneseny do grafu pro názornější zobrazení pozorovaného efektu.

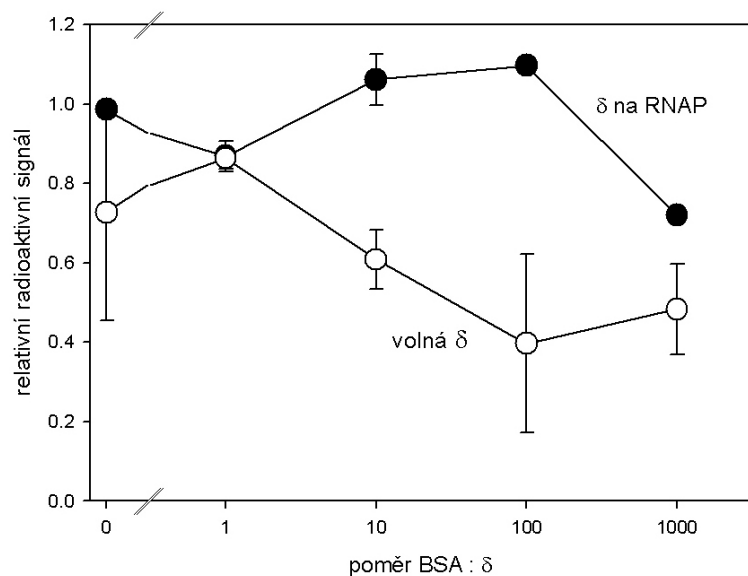
Z primárních dat i z kvantitativního vyhodnocení pomocí grafu (viz obr. 23) je patrné, že se zvyšující se koncentrací YxbF postupně slábne signál nenavázané δ . Zároveň se zvyšuje radioaktivní signál volné δ na $\Delta\delta$ RNAP. Z grafu nelze usoudit, jestli YxbF opravdu pomáhá δ navázat se na RNAP nebo se jedná o nespecifický efekt přidaného proteinu.



Obrázek 23: Efekt zvyšující se koncentrace YxbF na vazbu podjednotky δ na $\Delta\delta$ RNAP. K analýze byla použita nativní polyakrylamidová elektroforéza s radioaktivně značenou δ . Primární data jsou zobrazeny nahoře a kvantitativní vyhodnocení radioaktivního signálu δ ve spodní části. Vyhodnocení vynesené do grafu pochází ze tří provedených opakování. Je patrné, že se zvyšující se koncentrací YxbF postupně slábne signál volné δ a zároveň se zvyšuje radioaktivní signál navázané δ na $\Delta\delta$ RNAP. Koncentrace YxbF je označena jako [YxbF].

Pro lepší ověření, zda se jedná o specifický efekt, byl experiment proveden s použitím proteinu BSA (hovězí sérum albumin) místo YxbF. Po vyhodnocení získaných dat (primární data nejsou ukázána), bylo kvantitativní vyhodnocení opět vyneseno do grafu, který je zobrazen na obrázku 24 na následující straně. Získané výsledky byly porovnány s původním experimentem.

Zmíněné grafy vykazují podobnou tendenci, kdy postupně slábne signál nenavázané δ a zároveň se mírně zvyšuje signál navázané δ na $\Delta\delta$ RNAP. Proto lze usoudit, že pozorovaný efekt není specifický pro protein YxbF a tento protein tedy nepomáhá δ při interakci s RNAP.



Obrázek 24: Efekt zvyšující se koncentrace BSA na vazbu podjednotky δ na $\Delta\delta$ RNAP. K analýze byla použita nativní polyakrylamidová elektroforéza s radioaktivně značenou δ . Graf znázorňuje kvantitativní vyhodnocení radioaktivního signálu δ analogicky jako u předchozího grafu.

8.1.7 Efekt YxbF na transkripci *in vitro*

Praktickým nástrojem pro zkoumání vlivu proteinů na transkripci je transkripce *in vitro* za definovaných podmínek. Transkripce *in vitro* se provádí za zvyšující se koncentrace zkoumaného proteinu rekonstituovaného s RNAP, zatímco koncentrace ostatních reaktantů je konstantní. Množství produktu transkripční reakce (transkriptu) přímo odpovídá aktivitě RNAP. Množství transkriptu je tedy ovlivněno zkoumaným proteinem a poukazuje tak na jeho vliv na RNAP a transkripci.

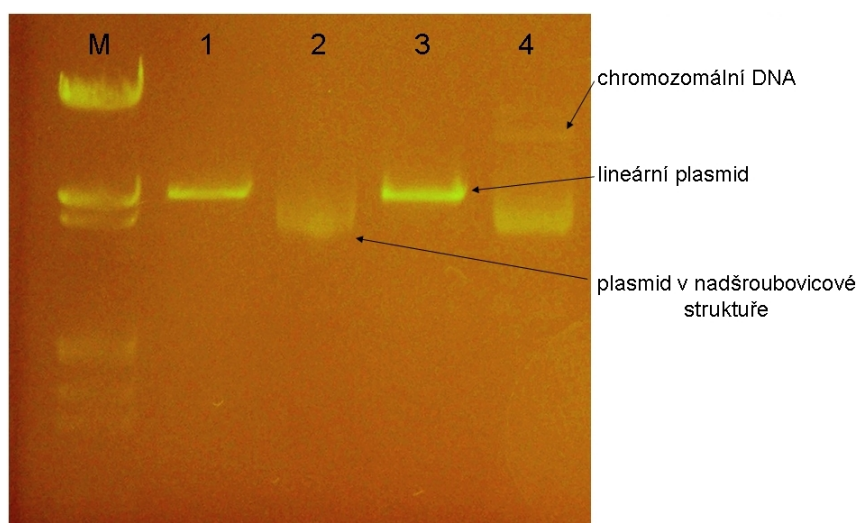
Majoritní část veškeré RNA v buňce je rRNA. Proto jsou rRNA promotory vhodné jako modelové promotory na kterých je zkoumán efekt molekul ovlivňující transkripci. Podjednotka δ má vliv na transkripci z rRNA promotorů (více v kapitole Změna citlivosti RNAP ke koncentraci iNTP na straně 35), proto by mohl být vidět efekt i proteinu YxbF. Jako modelové rRNA promotory jsou používány *rrnB* P1 a *Pveg*. Promotor *rrnB* P1 reprezentuje skupinu iNTP-senzitivních ribosomálních promotorů a promotor *Pveg* zastupuje iNTP-nesenzitivní ribosomální promotory. Obecný mechanismus regulace těchto promotorů je popsán v kapitole Iniciační NTP na straně 29.

Příprava komponent na transkripci *in vitro*

Aby bylo možné transkripci *in vitro* provést, bylo nutné připravit jednotlivé komponenty tohoto experimentu. Následně byl dodržován postup uveden v kapitole 6.6 na straně 66.

Izolace plasmidů Buňky *E. coli* obsahující plasmid p770 s ribosomálním promotorem *rrnB* P1 (**RLG7396**) a buňky *E. coli* obsahující plasmid p770 s promotorem *Pveg* (**RLG7557**) byly inkubovány ve 200 ml LB média ve 37 °C po dobu 16 hodin. Následně byly plasmidy

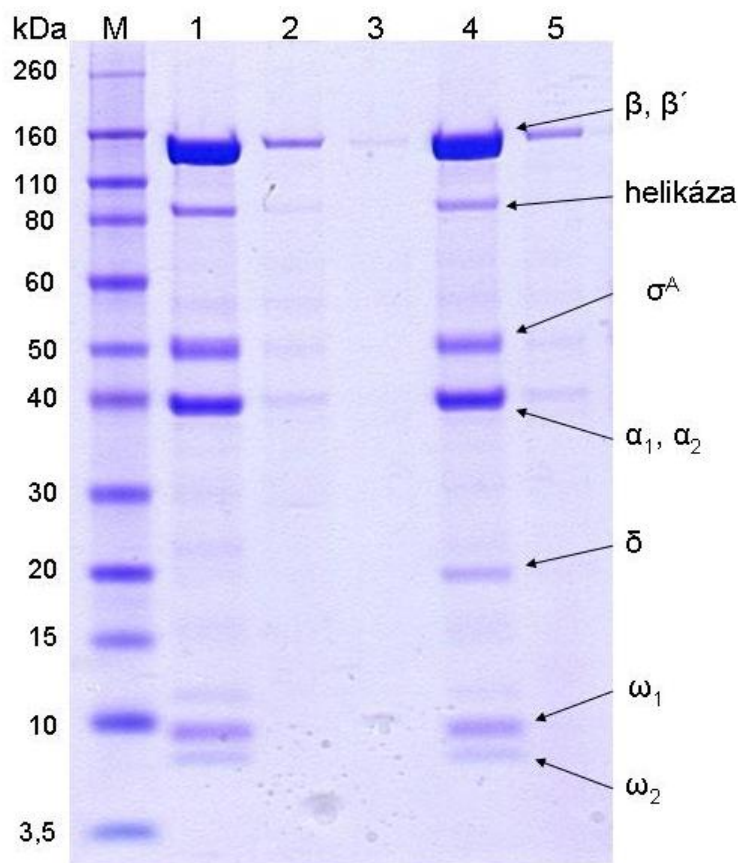
vyizolovány podle protokolů v kapitole Midipreparace na straně 49. Na závěr byly plasmidy přečištěny pomocí fenolace pro odstranění zbytků RNáz. Koncentrace jednotlivých plasmidů byla měřena spektrofotometricky a jejich čistota byla ověřena poměrem jejich A_{260}/A_{280} . Všechny plasmidy měly hodnoty A_{260}/A_{280} v rozmezí 1,7 - 2,0. Čímž byla ověřena požadovaná čistota plasmidů. Kvalita izolace plasmidů byla ověřena pomocí separace na agarózovém gelu (viz obr. 25). Všechny plasmidy byly naředěny tak, aby na agarózový gel bylo nanášeno 0,4 μg . Požadavkem bylo, aby oba plasmidy měly nadšroubovicovou strukturu a obsahovaly minimální množství chromozomální DNA nebo plasmidů s jednovláknovým zlomem, což bylo zjištěno porovnáním se vzorkem naštěpených plasmidů. Oba vyizolované plasmidy vyhovovaly stanoveným kritériím a proto byly použity do transkripce *in vitro*.



Obrázek 25: Ilustrační fotografie separace plasmidů na 1% agarózovém gelu. **M** – marker λ DNA štěpená enzymy HindIII a EcoRI; **1** – lineární plasmid obsahující promotor *Pveg*, štěpen pomocí restriční endonukleázy EcoRI; **2** – plasmid obsahující promotor *Pveg* v nadšroubovicové konformaci; **3** – lineární plasmid obsahující promotor *rrnB* P1, naštěpen pomocí restriční endonukleázy EcoRI; **4** – plasmid obsahující promotor *rrnB* P1 v nadšroubovicové konformaci a minimálním množstvím chromozomální DNA.

Izolace podjednotky δ RNAP Podjednotka δ byla izolována pomocí metody izoelektrické precipitace. Buňky *E. coli* BL21 s plasmidem pFL31 obsahující gen pro podjednotku δ z *B. subtilis* narostly v LB médiu s ampicilinem do optické hustoty $OD_{600} = 0,8$. Poté byla indukována exprese δ přidáním IPTG a kultura byla inkubována 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Buňky byly rozrušeny sonikací a protein byl navázán na 1 g diethylaminoethyl celulózy Whatmann DE52. Celulóza Whatmann DE52 byla sedimentací oddělena od zbylého pufru a nanášena na kolonku. Podjednotka δ byla poté eluována vzrůstajícím gradientem NaCl (pH 3,6) izoelektrickou precipitací. U jímáných frakcí byl měřen obsah proteinů metodou podle Bradfordové. Vybrané frakce byly spojeny a přečištěny dialýzou. Vzorek získaného proteinu byl analyzován na SDS-PAGE a poté byla podjednotka δ použita do dalších experimentů.

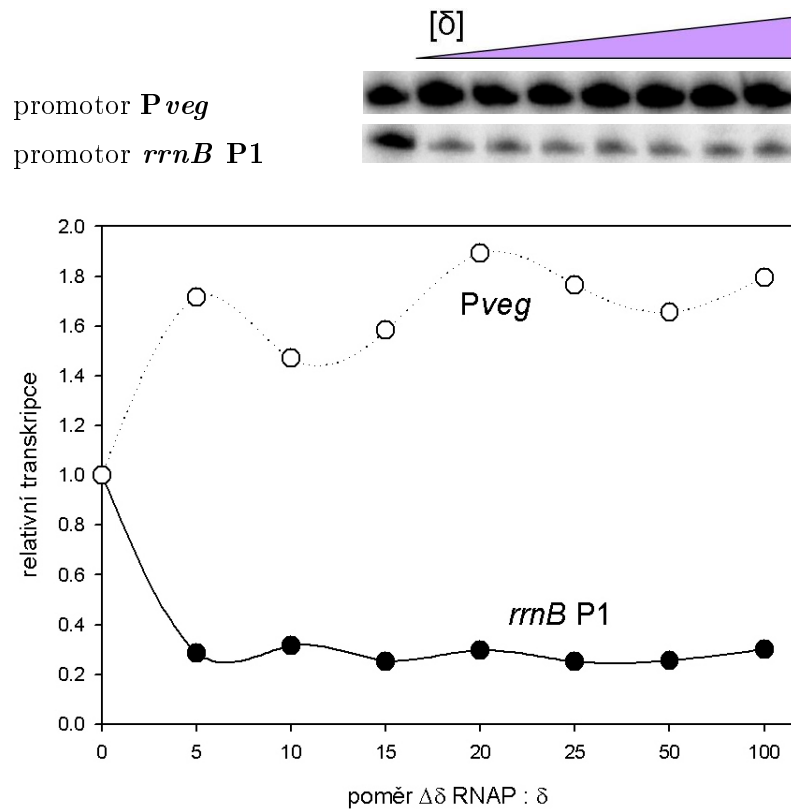
Izolace RNAP z *B. subtilis* Buňky *B. subtilis* se zaklonovanou histidinovou kotvou na podjednotce β' (wt RNAP) a buňky *B. subtilis* bez genu *rpoE* ($\Delta\delta$ RNAP) narostly v LB médiu do přechodu z exponenciální do stacionární fáze ve 37 °C. Metodou afinitní chromatografie přes nikl-agarózovou matrix byly vyizolovány proteiny, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz obr. 26). První frakce byly následně přečištěny dialýzou. Koncentrace proteinů byla měřena metodou podle Bradfordové (viz. kapitola 6.5.5 na straně 62).



Obrázek 26: SDS-PAGE analýza izolovaných frakcí wt RNAP a $\Delta\delta$ RNAP. M – proteinový marker Novex Sharp Pre-strained; 1 – $\Delta\delta$ RNAP 1. frakce; 2 – $\Delta\delta$ RNAP 2. frakce; 3 – $\Delta\delta$ RNAP 3. frakce; 4 – wt RNAP 1. frakce; 5 – wt RNAP 2. frakce.

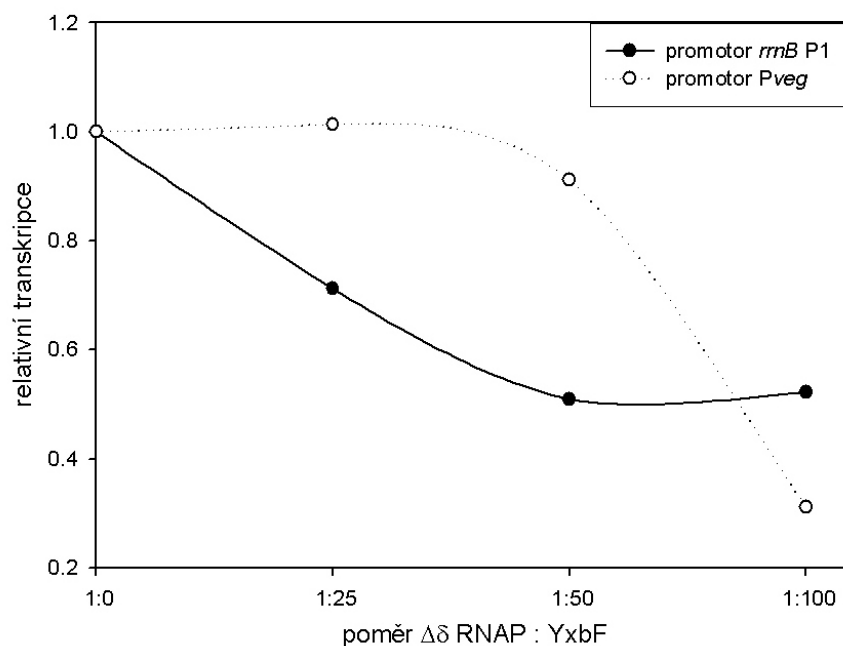
Efekt YxbF na transkripci *in vitro*

Nejprve byla ověřena již dříve pozorovaná skutečnost (popisovaná na straně 35, obr. 27), jaký vliv má podjednotka δ na transkripci *in vitro*. Podjednotka δ vykazuje inhibiční efekt na transkripci z iNTP-senzitivního ribosomálního promotoru *rrnB* P1 a zároveň stimuluje transkripci z iNTP-nesenzitivního ribosomálního promotoru *Pveg*. Provedením tohoto experimentu bylo přispěno získanými výsledky do rukopisu nového článku psaného v naší laboratoři – Rabatinová, rukopis v přípravě.



Obrázek 27: δ ovlivňuje transkripci *in vitro* z promotorů *rrnB* P1 a *Pveg*. Zvyšující se molární koncentrace δ při stálé molární koncentraci RNAP působí stimulačně na promotorovou aktivitu *Pveg*, zatímco transkripce z promotoru *rrnB* P1 se snižuje.

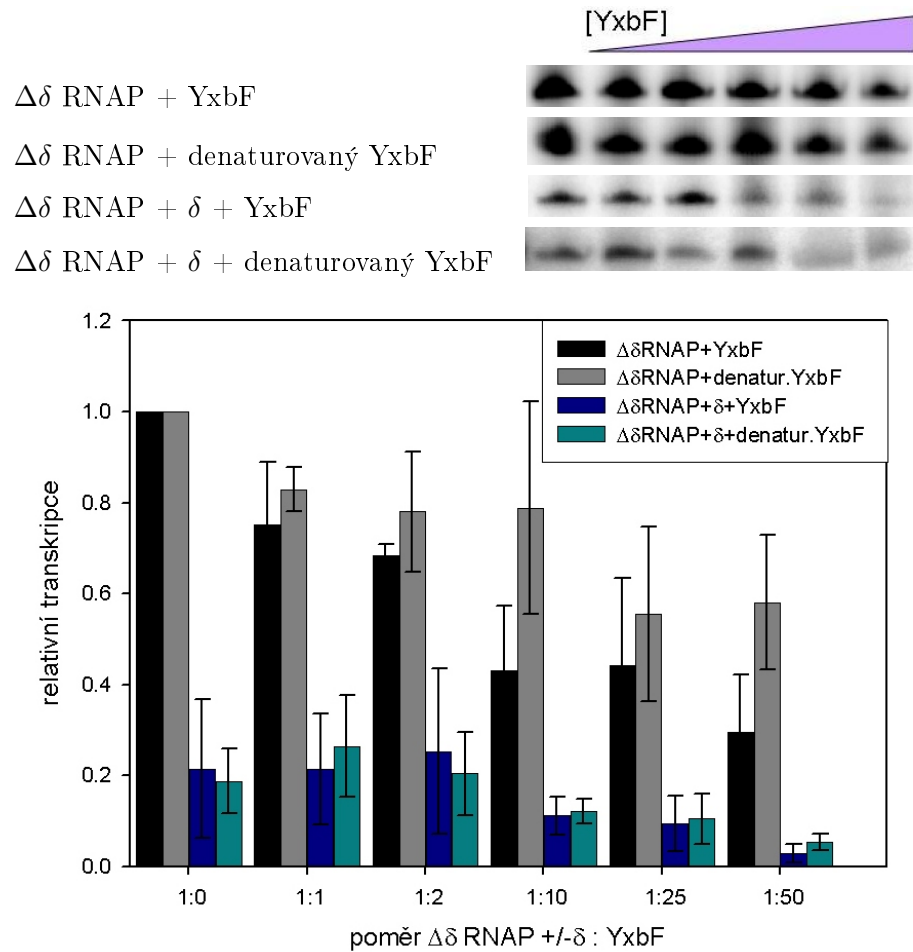
Jako první krok bylo důležité zjistit, zda protein YxbF má nějaký efekt na transkripci *in vitro* z ribosomálních promotorů *rrnB* P1 a *Pveg*. Transkripce proběhla za standardních podmínek a za zvyšující se koncentrace YxbF v přítomnosti $\Delta\delta$ RNAP. $\Delta\delta$ RNAP byla nejprve použita pro to, aby mohl být pozorován případný vliv YxbF na RNAP a efekt na transkripci. Výsledky tohoto experimentu ukazuje obrázek 28. Byla pozorována mírná inhibiční tendence transkripce na promotoru *Pveg*, která se výrazně zvyšovala až při vysoké molární koncentraci YxbF. Na promotoru *rrnB* P1 byla pozorována inhibiční tendence transkripce při nižší molární koncentraci YxbF. Vzhledem k výraznějšímu efektu při nižším a tudíž v buňce reálnějším poměru $\Delta\delta$ RNAP a YxbF na promotoru *rrnB* P1, byl použit tento promotor na hlubší zkoumání efektu YxbF.



Obrázek 28: Efekt YxbF na transkripci *in vitro*. V grafu je vyneseno zhodnocení primárních dat efektu proteinu YxbF na transkripci *in vitro* na ribosomálních promotorech *rrnB* P1 a *Pveg*.

V následujících transkripcích *in vitro* byl studován efekt proteinu YxbF na promotoru *rrnB* P1. Výsledky shrnuje následující graf zobrazený na obrázku 29. Ve všech reakcích byla použita konstantní molární koncentrace $\Delta\delta$ RNAP a zvyšující se koncentrace nativního nebo denaturovaného proteinu YxbF. YxbF byl denaturován po dobu 10 minut při teplotě 99 °C a byl použit pro srovnání pozorovaného efektu s nativním YxbF na transkripci. Při porovnání černých sloupců (zvyšující se koncentrace nativního YxbF) a šedých sloupců (zvyšující se koncentrace denaturovaného YxbF) pozorujeme mírný inhibiční efekt na transkripci. Výrazné chybové úsečky však nedovolují tento efekt označit za specifický.

Transkripci *in vitro* byl zkoumán efekt proteinu YxbF v součinnosti s δ . Na $\Delta\delta$ RNAP byla rekonstituována δ v molárním poměru 1:5, což je plně saturující poměr při kterém se projeví inhibiční efekt na transkripci z použitého promotoru. Opět byl použit nativní protein YxbF (modré sloupce) a denaturovaný protein YxbF (zelené sloupce). Po porovnání modrých a zelených sloupců v grafu nebyl pozorován významný efekt proteinu YxbF na transkripci *in vitro*.

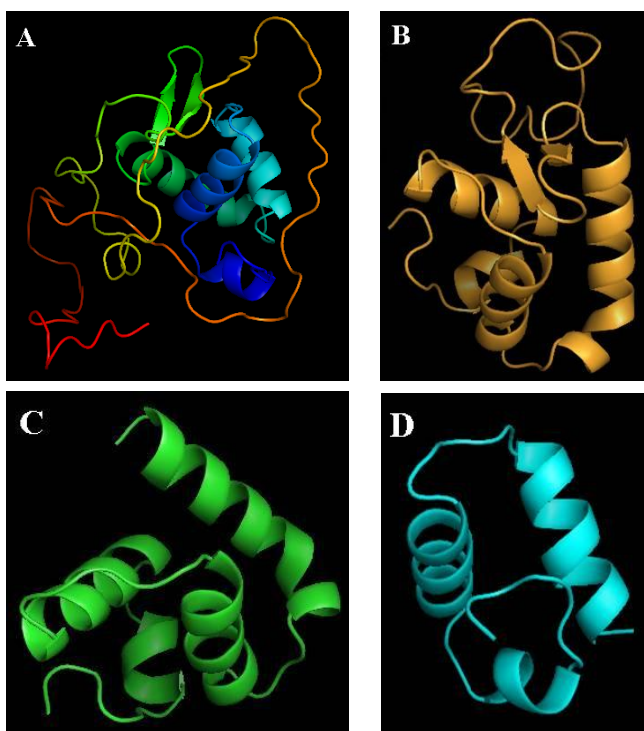


Obrázek 29: Efekt proteinu YxbF na transkripci *in vitro* na promotoru *rrnB* P1. Porovnáním černých sloupců (zvyšující se koncentrace nativního YxbF) a šedých sloupců (zvyšující se koncentrace denaturovaného YxbF) v grafu pozorujeme mírnou inhibici transkripce. Obdobně je tomu tak i ve zbylých sloupcích v grafu, kde je zobrazen efekt zvyšující se koncentrace YxbF za stále koncentrace $\Delta\delta$ RNAP a δ . Opět byl použit nativní protein YxbF (modré sloupce) a denaturovaný protein YxbF (zelené sloupce).

8.2 Příprava zkrácených variant podjednotky δ RNAP z *B. subtilis*

Jak již bylo zmíněno, podjednotka δ je rozdělena na dvě domény, které jsou propojeny 7 - 9 AK sekvencí lysinů. Struktura celého proteinu δ je zobrazena na obrázku 30 A. Větší N-koncová doména je strukturovaná, zatímco C-koncová doména je flexibilní.

Podjednotka δ působí jako regulátor iniciace transkripce. Doposud nebyla objasněna přesná funkce jejích jednotlivých domén. Již dříve byla v naší laboratoři zaklonována do expresního vektoru NTD δ ($N\delta$), jejíž struktura je zobrazena na obr. 30 B. Mým úkolem bylo připravit fragmenty $N\delta$ tak, aby v budoucnu mohli být využity pro zjištění, jaká část tohoto proteinu je pro funkci δ nezbytná (viz obr. 30 C, D).



Obrázek 30: Zobrazení struktury fragmentů podjednotky δ RNAP. Počet aminokyselin je uváděn od N-konce. **A** – Struktura celého proteinu δ (173 AK); **B** – Struktura $N\delta$ (95 AK); **C** – Struktura 3/4 $N\delta$ (65 AK); **D** – Struktura 1/2 $N\delta$ (45 AK).

8.2.1 Příprava vektoru pro expresi fragmentů δ

Na základě předpovídané 2D struktury (v roce 2009 ještě nebyla známá 3D struktura δ) byly navrženy dvě zkrácené varianty $N\delta$. Kratší varianta o délce 45 AK byla označena jako 1/2 $N\delta$ a delší varianta o velikosti 65 AK byla označena jako 3/4 $N\delta$.

Amplifikace 135 bp genu *rpoE* (1/2 $N\delta$) a 195 bp genu *rpoE* (3/4 $N\delta$) byla provedena standardně (viz kapitola 6.4.8 na straně 55) s použitím Expand High Fidelity PCR systému (Roche). Pro amplifikaci těchto částí genu *rpoE* byly navrženy následující primery (s ohledem na sekvenci genů zobrazených na obr. 31 a na restriční místa na plasmidu pET22b zobrazeném na obr. 18 na straně 47):

Primery pro gen 1/2 Nδ:

Primer s označením 185 5' gggccgg **catatg** ggt atc aaa caa tat tca cag 3'
 – primer pro 5' konec genu („Forward“) obsahující restriční místo pro NdeI (označeno růžově).

Primer s označením 320 3' gcccg **ctcgag** gcc gag caa aga tgc gat ttc 5'
 – primer pro 3' konec genu („Reverse“) obsahující restriční místo pro XhoI (označeno zeleně).

Primery pro gen 3/4 Nδ:

Primer s označením 185 5' gggccgg **catatg** ggt atc aaa caa tat tca cag 3'
 – primer pro 5' konec genu („Forward“) obsahující restriční místo pro NdeI (označeno růžově).

Primer s označením 304 3' gcccg **ctcgag** gtc aat gtt taa atc tgt ata 5'
 – primer pro 3' konec genu („Reverse“) obsahující restriční místo pro XhoI (označeno modře).

Gen *rpoE*:

1 - **ttg ggt atc aaa caa tat tca** cag gaa gag
 31 - cta aag gaa atg gct tta gtt gaa atc gct
 61 - cac gaa tta ttt gaa gaa cat aaa aaa cca
 91 - gtt cct ttt cag gag ctt tta aat **gaa atc**
 121 - **gca tct ttg ctc ggc** gtg aaa aaa gaa gag
 151 - ctt gga gac cgc att gct caa ttt **tat aca**
 181 - **gat tta aac att gac**

Obrázek 31: Sekvence části genu *rpoE*. Červeně je zvýrazněna sekvence komplementární k primeru 185, zeleně k primeru 320 a oranžově k primeru 304.

Ke klonování byl použit plasmid pET22b, který byl vyizolován z buněk *E. coli* DH5α (kmen 278) obsahující tento plasmid.

Do plasmidu pET22b byly zaklonovány výše popisované fragmenty genu *rpoE* pomocí restričních endonukleáz NdeI a XhoI. Fragmenty genu *rpoE* byly zaklonovány za T7 inducibilní promotor a na jejich C-konci byla připojena histidinová kotva pro následnou izolaci proteinů pomocí afinitní chromatografie.

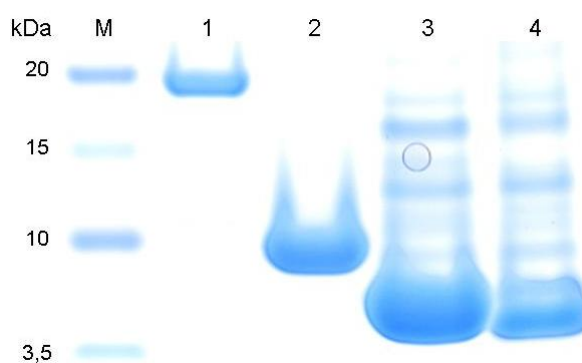
Získané vektory byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* DH5α. Vybrané kolonie rezistentní na ampicilin byly podrobeny koloniové PCR. Sekvenací byla ověřena správnost klonování.

8.2.2 Exprese a purifikace proteinů 1/2 N δ a 3/4 N δ

Připravené plasmidy pET22b nesoucí 1/2 a 3/4 genu *rpoE* byly transformovány do expresních buněk *E. coli* BL21. Byly vytvořeny glycerinové konzervy pro dlouhodobé uchování kmenů (LK743 byl označen kmen pro nadprodukcii 1/2 N δ a LK402 byl označen kmen pro nadprodukcii 3/4 N δ).

Z těchto glycerinových konzerv byl zaočkován 1 litr LB média s ampicilinem a kultury narostly až do OD₆₀₀ = 0,8. Poté byly indukovány IPTG a inkubovány další 4 hodiny při pokojové teplotě. Pro izolaci metodou afinitní chromatografie byla využita nikl-agarózová matrix (analogicky jako v kapitole 6.5.3 na straně 61). Následně jímané frakce byly analyzovány na SDS-PAGE a frakce obsahující požadovaný protein byly přečištěny dialýzou v glycerolovém pufru.

Na obrázku 32 jsou zobrazeny úspěšně vyizolované proteiny δ , N δ , 3/4 N δ a 1/2 N δ na SDS-PAGE.



Obrázek 32: SDS-PAGE fragmentů proteinu δ . **M** – proteinový marker Novex Sharp Pre-strained; **1** - protein δ o velikosti 20,4 kDa; **2** – protein N δ o velikosti 13 kDa; **3** – 3/4 N δ o přibližné velikosti 7,5 kDa; **4** – 1/2 N δ o přibližné velikosti 5 kDa.

8.3 Hledání homologů/analogů proteinu δ v jiných organismech

Podjednotka δ RNAP je unikátní pro kmen *Firmicutes* gram-pozitivních bakterií (Rabatina *et al.*, rukopis v přípravě). Při hledání podobné sekvence k proteinu δ , nebyla nalezena sekvenční podobnost ani u gram-negativních bakterií ani u eukaryotních organismů. Studium struktury $N\delta$ pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) ukázalo, že struktura $N\delta$ se velmi podobá několika eukaryotním proteinům. Tyto proteiny jsou klasifikovány jako 3-helikální svazky vázající DNA/RNA (tzv. SCOP fold), které váží NK pomocí helixu IV. U $N\delta$ nebyl nalezen důkaz o vazbě NK v komplexu RNAP a z důvodů plnění správné biologické funkce pravděpodobně nemůže být $N\delta$ asociována s NK (Motackova *et al.*, 2010).

CTD δ je výrazně bohatá na kyselé AK a podobá se NK (podrobně popsáno v části Recyklace jádra RNAP na straně 35). Hledali jsme podobné kyselé oblasti v proteinech jiných organismů. Pro toto hledání byla vybrána sekvence 20 AK z CTD δ (viz obr. 33). Výsledky hledání jsou zobrazeny v tabulce 4. Byly nalezeny proteiny se sekvencí bohatou na kyselé AK dlouhé až 88 AK. Vysoké procento nalezených proteinů patří mezi nukleoproteiny. Relativně dlouhá sekvence kyselých AK může být doménou, která napodobuje nukleovou kyselinu (*nucleic acid mimic domain*, NAMd). NAMd by mohla soutěžit o vazbu proteinu s nukleovou kyselinou a tím zvyšovat specifitu proteinu pro jeho cílovou sekvenci.

protein δ [*Bacillus subtilis*]

```
1 mgikqysqee lkemalveia helfeehkvp vpfqellnei asllgvkkee lgdriaqfyt
61 dlnidgrfla lsdqtwglrs wpyydqld ee tqptvkakkk kakkaveedl dldefeide
121 dldldldevee eldleaddfd eedldedddd leleediide ddedyddeee eik
```

myelin transcription factor 1-like protein [*Homo sapiens*]

```
1 mevdteekrh rtrskgvrvp vepaiqelfs ctpgpcdgsg hvsgkyarhr svygcplakk
61 rktqdkqpqe papkrkpfav kadsssvdec ddsdgtedmd ekeedegeeey sedndepgde
121 deedeegdre eeeeieede dddedgedve deeeeeeeee eeeeeened hqmnchntri
181 mqdtekddnn ndeydnydel vaksllnlgk iaedaayrar tesemsnsts nsleddsdkn
241 enlgrksels ldlstdvvre tvdslkllaq ghgvvlsemn ndrnyadsms qqdsrnmnyv
```

YTH domain-containing protein 1 [*Homo sapiens*]

```
61 kpsvhsrqlv skplsssvsn nkrivstgkq sateykneey qrsernkrlld adrkiirlsss
121 asrepyknqp ektevrkrdp erraksptpd gseriglevd rrasrssi qss keevnseeyg
181 sdhetgssgs sdeqgnnten eeegveedve edeeveedae edeevedge eeeeeeeee
241 eeeeeeeeey eqderdqkee gndydrsea sdsqsesvsf tdgsvrsgsg tdgsdekkke
301 rkrargispi vfdrrsgssas esyadqtskl kyvlqdarff liksnhenv slakagvws
```

transcription elongation factor SPT5 [*Homo sapiens*]

```
1 msdsedsnfs eedserssdy geeaevdeer rsaagskee epedeeeeee eeeydeeeee
61 eddrppkpkp rhggfildea dvddeyeded qwedgaedil ekasnidnvv ldedrsgarr
121 lqnlwrdrqre eelgeyymkk yakssvgetv yggsdelsdd itqqllpgv kdpnlwtvkc
181 kigeeratai slmrkfiayq ftdtplqiks vvapehvkgy iyveaykqth vkqaiiegvgv
241 lrlgywnqqm vpikemtavl kvvkevanlk pkswvrlkrg iykddiaqv d yvepsqntis
```

Obrázek 33: Ukázka částí sekvence domény napodobující nukleovou kyselinu u vybraných proteinů. Červeně jsou zvýrazněny kyselé aminokyseliny. Šedě je vyznačena sekvence, která byla použita při hledání záporně nabitých sekvencí.

Tabulka 4: Vybrané proteiny analogní k 20 AK z C-koncové domény δ . *Homo sapiens* – člověk rozumný; *Mus musculus* – Myš domácí; *Oryza sativa* – Rýže setá; *Danio rerio* – Dánio pruhované (zebrička); E – Kyselina glutamová; D – Kyselina asparagová; NAMd – doména napodobující nukleovou kyselinu. Názvy proteinů jsou uvedeny v originálu.

Název proteinu	Organismus	NAMd délka / obsah E a D [%]
δ subunit of RNAP	<i>B. subtilis</i>	66/71
myelin transcription factor 1-like protein	<i>Homo sapiens</i>	80/76
myelin transcription factor 1	<i>Homo sapiens</i>	75/73
nucleolin	<i>Homo sapiens</i>	87/72
nucleolar transcription factor 1	<i>Homo sapiens</i>	71/73
transcription initiation factor IIA subunit 1	<i>Homo sapiens</i>	38/68
nucleophosmin	<i>Homo sapiens</i>	69/53
zinc finger and BTB domain-containing protein 7C	<i>Homo sapiens</i>	39/89
acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	<i>Homo sapiens</i>	83/69
transcription elongation factor SPT5	<i>Homo sapiens</i>	54/69
death domain-associated protein 6	<i>Homo sapiens</i>	52/80
YTH domain-containing protein 1	<i>Homo sapiens</i>	54/81
proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	<i>Homo sapiens</i>	73/89
transcription initiation factor TFIID subunit 7-like	<i>Homo sapiens</i>	33/90
nucleolin	<i>Mus musculus</i>	84/70
ribosomal biogenesis protein LAS1L	<i>Mus musculus</i>	88/75
zinc finger and BTB domain-containing protein 7C	<i>Mus musculus</i>	36/92
transcription initiation factor IIA subunit 1	<i>Mus musculus</i>	46/65
Os12g0136200	<i>Oryza sativa</i>	56/79
Os03g0588200	<i>Oryza sativa</i>	49/84
transcription elongation factor SPT5	<i>Danio rerio</i>	43/67

9 Diskuze

9.1 Hledání vazebných partnerů podjednotky δ RNAP

Prvotní hledání proteinů interagujících s podjednotkou δ RNAP bylo provedeno pomocí dvou-hybridního kvasinkového systému (Miller and Stagljar, 2004). K tomuto hledání byla využita podjednotka δ RNAP ze *Streptococcus pneumoniae*. Zmíněná metoda identifikovala protein SP_2234 ze *S. pneumoniae* jako vazebného partnera podjednotky δ (Uetz, 2002). Protože v naší laboratoři již dříve byla zkoumána podjednotka δ RNAP u modelového organismu gram-pozitivních bakterií *B. subtilis*, byly identifikovány homologní proteiny k proteinu SP_2234.

Proteiny s nejvyšší homologií byly identifikovány jako transkripční represory rodiny Tet^R – YxbF a YwcC (Ramos *et al.*, 2005). Tyto proteiny vykazovaly velmi nízkou homologii s původním proteinem.

Jediná zmínka v literatuře o genu *yxbF* z *B. subtilis* je spojena s katabolickou represí. Tento gen byl identifikován jako reprimovaný glukózou při katabolické represí a zároveň jako CcpA-nezávislý (Yoshida *et al.*, 2001).

Protein YwcC reprimuje expresi genu *slrA*, tudíž YwcC inhibuje syntézu proteinu SlrA. Protein SlrA působí inhibičně na tvorbu bičíku bakterií a podporuje tvorbu biofilmu. I když o přesném mechanismu této dráhy nepanuje shoda, role proteinu YwcC byla potvrzena opakovaně (Kobayashi, 2008; Chai *et al.*, 2009).

Pro studium interakcí těchto proteinů s δ z *B. subtilis*, byly připraveny expresní vektory v buňkách *E. coli*, kde byly geny *yxbF* a *ywcC* zaklonovány za indukibilní promotor. Na C-koncové domény byla připojena histidinová kotva pro izolaci proteinů metodu afinitní chromatografie. Protein YwcC se nepodařilo připravit ani po několika pokusech, zatímco protein YxbF byl připraven v dostatečném množství a čistotě pro další experimenty (viz 21 na straně 72).

Podjednotka δ byla radioaktivně označena [γ -³²P] ATP pomocí Protein kinázy A a analyzována pomocí SDS-PAGE. Interakce mezi δ a YxbF byla pozorována pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy. Pro detekci vazby byla použita radioaktivně naznačená δ a nativní protein YxbF. Na základě výsledku zobrazeného na obrázku 22, nebyla detekována interakce mezi těmito proteiny. Za daných podmínek se tedy YxbF neváže na podjednotku δ RNAP.

Na základě výsledků zmiňovaného experimentu byla vytvořena hypotéza, zda by YxbF nemohl pomáhat δ s vazbou na RNAP. Tato hypotéza byla studována pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy za stejných podmínek jako v předchozích experimentech. Při zvyšující se koncentraci YxbF postupně slábl signál volné δ a narůstal signál δ navázané na RNAP (obr. 23 na straně 75). Pro lepší vyhodnocení pozorovaného efektu, byl experiment analogicky zopakován s použitím proteinu BSA, který nevytváří žádné specifické interakce

s δ ani s RNAP. Získaná data byla porovnána. Na základě kvantitativního vyhodnocení radioaktivního signálu v obou případech byly vytvořeny grafy, které se svou tendencí nápadně podobaly.

Vzhledem k tomu, že BSA vykazoval podobný efekt jako YxbF, jednalo se nejspíše o efekt nespecifický. Protein YxbF tedy nepomáhá podjednotce δ navázat se na RNAP. Je pravděpodobné, že se zvyšující se koncentrací proteinů v určitém objemu, dochází k zmenšení vzdálenosti mezi proteiny. Tím by mohla být stimulována vazba přirozených vazebných partnerů, v tomto případě δ s RNAP.

Protože protein YxbF patří do rodiny transkripčních regulátorů (repressorů) je zřejmé, že ovlivňuje transkripci. U podjednotky δ byl vliv na transkripci již mnohokrát popsán (více v kapitole 5.3.1 na straně 34). Proto byl zkoumán vliv těchto proteinů na transkripci *in vitro*.

Za definovaných podmínek byla zvyšována koncentrace zkoumaného proteinu (YxbF) a koncentrace ostatních komponent transkripce *in vitro* byla konstantní. Experimenty byly prováděny s použitím plasmidové DNA obsahující ribosomální promotory: iNTP senzitivní *rrnB* P1 a iNTP nesenzitivní *Pveg* (Sojka *et al.*, 2011).

YxbF vykazoval mírný inhibiční efekt transkripce *in vitro* na obou promotorech. Na promotoru *Pveg*, se výrazně projevovала inhibice až při vysoké koncentraci YxbF na rozdíl od transkripce na promotoru *rrnB* P1, která byla inhibována při nižších koncentracích proteinu.

Inhibiční efekt by mohl být vysvětlen příslušností YxbF k proteinové rodině repressorů Tet^R. Charakteristickou pro Tet^R rodinu repressorů je DNA-vazebná doména, která interaguje s DNA, pokud není přítomný induktor (Ramos *et al.*, 2005). Experiment s denaturovaným YxbF však vedl ke stejnému výsledku. Při denaturaci by měla být zničena nativní konformace DNA-vazebné domény tohoto proteinu. Je možné, že za inhibiční efekt nezodpovídá DNA-vazebná doména charakteristická pro Tet^R rodinu repressorů nebo byla schopna znovu zaujmout původní konformaci, což se zdá být velice nepravděpodobné.

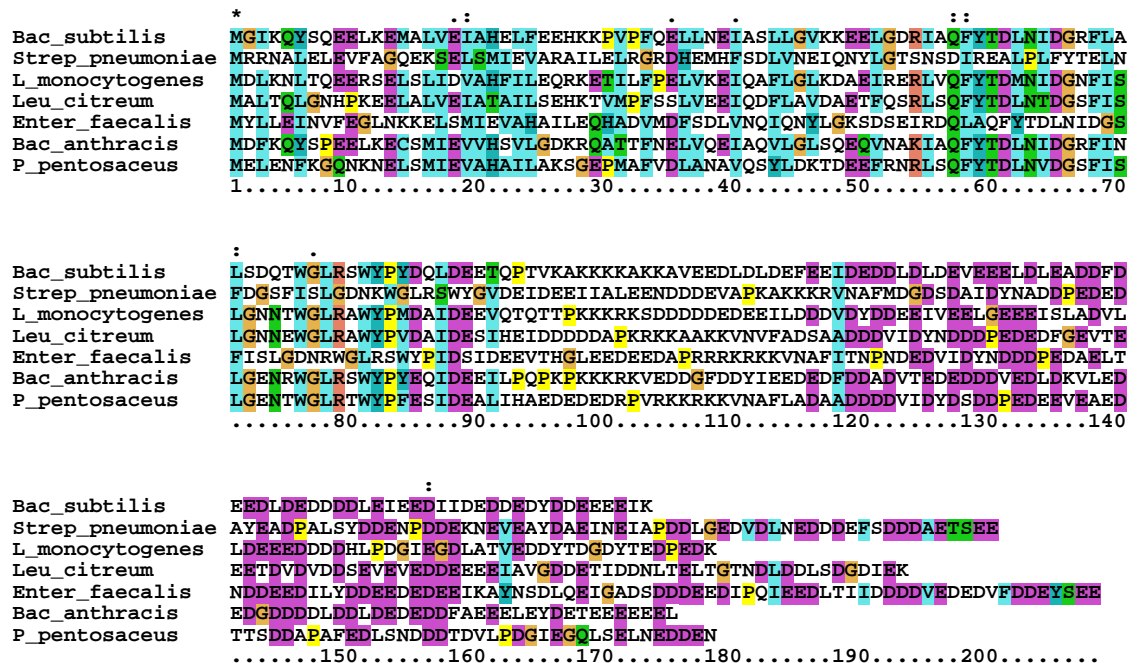
Protein YxbF z *B. subtilis* neinteraguje s podjednotkou δ RNAP z tohoto organismu. Interakce mezi podjednotkou δ RNAP a proteinem SP_2234 by mohla být specifická pro *S. pneumoniae*, kde může hrát regulační roli. Homologie mezi YxbF a SP_2234 je relativně nízká, což může vysvětlovat absenci interakce YxbF a δ .

K ověření pozorované skutečnosti by bylo přínosné ověřit interakci pomocí dvouhybridního kvasinkového systému s použitím obou proteinů z *B. subtilis*. Vzhledem k časové a finanční náročnosti zavedení a standardizování této metody do laboratoře nebylo v našich prioritách s tímto projektem dále pokračovat. Podle dosavadních výsledků by byl výsledek toho experimentu krajně nejistý. Na druhou stranu by mohl vést k objevení nových vazebných partnerů podjednotky δ RNAP z *B. subtilis*.

9.2 Příprava zkrácených variant podjednotky δ RNAP

Podjednotka δ RNAP je v bakteriální buňce potřeba pro správnou a přesnou práci molekulárního aparátu, i když její přesná fyziologická funkce není zatím plně objasněna. Podjednotka δ RNAP výrazně ovlivňuje iniciaci transkripce a to tím, že zvyšuje specifitu vazby RNAP k promotorové sekvenci a zároveň snižuje stabilitu otevřeného komplexu RNAP na promotoru *in vitro* (Achberger *et al.*, 1982a; Hilton and Whiteley, 1985; Juang and Helmann, 1994a; Spiegelman *et al.*, 1978). Přesto mutanty v genu *rpoE* nevykazují výrazný fenotyp ani sníženou životaschopnost. Byla pozorována prodloužená lag fáze růstu a odlišná morfologie buněk mutantů na začátku exponenciální fáze (de Saro *et al.*, 1999). Mutanty v genu *rpoE* nejsou schopny reagovat na změny růstových podmínek stejně rychle jako divoký kmen a tudíž prohrávají při kompetici s jinými buňkami (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě). Mutanty v genu *rpoE* snížily svou virulenci u *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans* a *Staphylococcus aureus* (Watson *et al.*, 1998; Seepersaud *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010).

Podjednotka δ RNAP se unikátně vyskytuje pouze u kmene *Firmicutes* gram-pozitivních bakterií (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě). Struktura δ se dělí na strukturovanou N-koncovou doménu (NTD) o velikosti 95 AK, složenou ze čtyř α -helixů a jednoho antiparalelního β -listu a na flexibilní C-koncovou doménu (CTD) složenou z 69 AK u *B. subtilis*. Tyto domény jsou spojeny oblastí několika lysinů (de Saro *et al.*, 1995; Motackova *et al.*, 2010). NTD δ je na rozdíl od CTD vysoce konzervovaná u gram-pozitivních bakterií, jak dokládá srovnání aminokyselinových sekvencí δ na obrázku 34 u vybraných bakterií.



Obrázek 34: Srovnání aminokyselinových sekvencí podjednotky δ RNAP u vybraných bakterií. ★100 % shoda AMK, : AMK téměř shodné, . AMK s podobným nábojem. Bac – *Bacillus*, Strep – *Streptococcus*, L – *Listeria*, Leu – *Leuconostoc*, Enter – *Enterococcus*, P – *Pediococcus*.

Podle rozdílnosti jednotlivých domén δ je pravděpodobné, že každá z domén by mohla působit na iniciaci transkripce rozdílným mechanismem. Proto byly připraveny fragmenty NTD δ , které by v budoucnu měly pomoci objasnit funkci této domény a její minimální strukturu pro zachování funkce.

Kratší fragment NTD δ byl označen jako $1/2 N\delta$ a delší fragment byl označen jako $3/4 N\delta$. Příslušné vektory se zaklonovanými částmi genu *rpoE* byly transformovány do expresních buněk *E. coli*. Následně byly tyto proteiny vyizolovány metodou afinitní chromatografie. Pro další experimenty byly připraveny proteiny: $1/2 N\delta$, $3/4 N\delta$, $N\delta$ a celý protein δ .

Experimenty objasňující funkci NTD a CTD budou v budoucnu nejprve zkoumány pomocí transkripce *in vitro*. Bude zkoumán vliv na stabilitu otevřeného komplexu RNAP, efekt na specifitu vazby RNAP k DNA a efekt na recyklaci. Efekt jednotlivých domén nebo jejich částí *in vivo* bude studován pomocí kompetičního fenotypu.

9.3 Hledání homologů/analogů proteinu δ v jiných organismech

Sekvenční homologie celého proteinu δ nebyla nalezena ani u gram-negativních bakterií ani u eukaryotních organismů (Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě). Ačkoliv strukturně podobné eukaryotické proteiny k $N\delta$ byly nalezeny, jejich funkce se ukázaly jako rozdílné (Motackova *et al.*, 2010). Při hledání sekvenční podobnosti CTD δ s proteiny z jiných organismů byla použita 20 AK sekvence z CTD δ . Do následného zkoumání byly vybrány pouze ty proteiny, které obsahují sekvenci bohatou na kyselé AK (aspartát, glutamát) dlouhou minimálně 30 AK a obsahující alespoň 50 % kyselých AK. Tato doména bohatá na kyselé AK byla označena jako doména napodobující nukleovou kyselinu (*nucleic acid mimic domain*, NAMd). Při hledání v krystalografických strukturních databázích proteinů se ukázalo, že obecně vysoce kyselé oblasti proteinů se vyskytují v nestrukturované formě, tedy i v hypotetických NAMd (RNDr. Ivan Barvík, Ph.D., ústní sdělení).

Všechny nalezené proteiny se známou identitou obsahující NAMd patří mezi proteiny interagující s NK, tedy nukleoproteiny. Ve skupině nukleoproteinů se vyskytují zejména transkripční faktory. Tyto proteiny byly nalezeny u modelových organismů – Rýže seté (*Oryza sativa*), Dánia pruhovaného nazývaného zebříčka (*Danio rerio*), Myši domácí (*Mus musculus*) i u člověka (*Homo sapiens*).

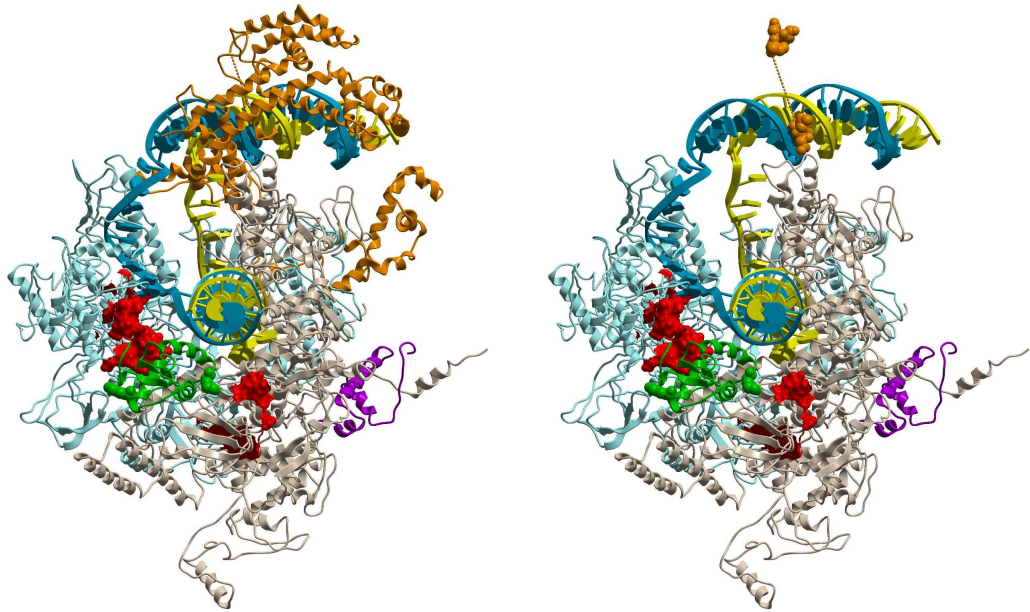
Transkripční iniciační faktor IIA (*Transcription initiation factor IIA*) pomáhá RNAP II k efektivnějšímu vytvoření iniciačního komplexu na určitých genech (DeJong *et al.*, 1995), což by mohlo být přirovnáno k funkci proteinu δ , která zvyšuje afinitu RNAP k promotorovým oblastem (Hilton and Whiteley, 1985). Podobně na promotorovou selektivitu působí i transkripční iniciační faktor IID (*transcription initiation factor TFIID*) (Pointud *et al.*, 2003), u kterého jsme rovněž našli kyselou oblast.

Nově popsaná strukturovaná doména YTH v proteinu *YTH domain-containing protein 1* byla identifikována jako vazebný partner krátkých sekvenčních motivů RNA (Zhang *et al.*, 2010). Doména YTH se neshoduje s oblastí, kde byla námi nalezená NAMd.

Lidský transkripční elongační faktor SPT5 (*transcription elongation factor SPT5*) reprimuje i stimuluje transkripci (Chen *et al.*, 2009). Je možné, že stimulační efekt je založen na stimulaci recyklace transkripce, na které se podílí NAMd.

Lopéz de Saro (1999) označil podjednotku δ ve spolupráci se σ^A u gram-pozitivních bakterií jako hypoteticky funkčně homologní k σ^{70} gram-negativních bakterií (více v kapitole Možná funkční homologie podjednotek δ a σ^{70} na straně 35). V sekvenci σ^{70} bylo nalezena oblast záporně nabitých AK, která se výrazně podobá CTD δ . Tato oblast se rozkládá mezi D189 až D213 a je nestrukturovaná. Na obr. 35 vlevo je oranžově zobrazena kompletní podjednotka σ^{70} , na obr. 35 vpravo pouze již zmíněná kyselá oblast, která je nestrukturovaná a proto pouze schematicky naznačena prostřednictvím teček (RNDr. Ivan Barvík, Ph.D., ústní sdělení; Rabatinova *et al.*, rukopis v přípravě).

Kyselé části proteinů SPT5 a σ tak mohou sdílet některé funkce s kyselou CTD podjednotky δ při transkripci.



Obrázek 35: Model interakce podjednotky σ s iniciačním komplexem RNAP. Podjednotky RNAP jsou zobrazeny: β světle modře, β' šedě, σ oranžově, ω černě, NTD δ zeleně, místa interakce NTD δ s RNAP červeně, templátové vlákno DNA žlutě a netemplátové vlákno DNA tyrkysově. Vlevo je zobrazena kompletní podjednotka σ^{70} , vpravo pouze kyselá oblast podjednotky σ^{70} , která je nestrukturovaná a proto pouze schematicky naznačena prostřednictvím teček (RNDr. Ivan Barvík, Ph.D., nepublikovaná data).

V budoucnu by bylo zajímavé ověřit funkční homologii proteinů SPT5 a δ porovnáním jejich efektu na transkripci. Bylo by možné připravit konstrukty N δ fúzované s kyselou doménou SPT5. Tento postup by bylo možné použít i pro ostatní identifikované proteiny.

10 Shrnutí

Byla studována podjednotka δ RNAP z *B. subtilis*. Byli studováni možní interakční partneři podjednotky δ RNAP z *B. subtilis*, byly připraveny zkrácené varianty podjednotky δ RNAP pro budoucí objasnění role jednotlivých domén tohoto proteinu a byla hledána sekvenční a strukturní podobnost podjednotky δ s proteiny z jiných organismů.

Proteiny interagující s δ byly identifikovány na základě dvouhybridního kvasinkového systému ve *Streptococcus pneumoniae*. Následně byly vytvořeny expresní kmeny *E. coli*, které obsahovaly vektor s genem *yxbF* nebo *ywcC*. Protein YwcC se ani po mnoha pokusech připravit nepodařilo. Protein YwcC byl protein s menší homologií s původním proteinem ze *S. pneumoniae*, proto v izolaci YwcC dále nebylo pokračováno. Následně se podařilo připravit protein YxbF v dostatečném množství a čistotě pro další experimenty metodou afinitní chromatografie.

Ke studiu interakce mezi δ a YxbF byla použita nativní polyakrylamidová elektroforéza. Pro detekci vazby byla použita radioaktivně naznačená δ a nativní YxbF. Bylo zjištěno, že za daných podmínek se YxbF neváže na podjednotku δ RNAP.

K ověření hypotézy, jestli YxbF pomáhá δ při vazbě RNAP byla použita nativní polyakrylamidová elektroforéza. Bylo provedeno srovnání mezi experimentem se zvyšující se koncentrací YxbF a experimentem se zvyšující se koncentrací referenčního proteinu BSA. Oba proteiny vykazovaly podobný efekt na vazbu δ na RNAP. Bylo prokázáno, že pozorovaný efekt proteinu YxbF je nejspíše nespecifický. Protein YxbF tedy nepomáhá podjednotce δ navázat se na RNAP.

Protein YxbF vykazoval mírný inhibiční efekt transkripce *in vitro* na ribosomálních promotorech *rrnB* P1 a *Pveg*. Na promotoru *Pveg*, se výrazně projevovala inhibice až při vysoké koncentraci YxbF na rozdíl od transkripce na promotoru *rrnB* P1, která byla mírně inhibována při nižších koncentracích proteinu. Po porovnání efektu na transkripci na promotoru *rrnB* P1 nativního a denaturovaného YxbF bylo zjištěno, že pozorovaný efekt není specifický pro nativní protein YxbF.

Stejně tak bylo potvrzeno, že za přítomnosti podjednotky δ RNAP není rozdíl mezi efektem nativního a denaturovaného YxbF na transkripci *in vitro* na promotoru *rrnB* P1.

Má práce přispěla k objevu, že na rozdíl od nalezené interakce podjednotky δ RNAP a proteinu SP_2234 ve *S. pneumoniae* nebyla nalezena interakce mezi podjednotkou δ RNAP s homologním proteinem YxbF z *B. subtilis*. Homologie mezi YxbF a SP_2234 byla relativně nízká, což může být příčina pozorovaného jevu. Nicméně ve *S. pneumoniae* tato interakce může hrát zatím neznámou roli, k jejíž objasnění bude potřeba dalšího studia.

Podařilo se připravit expresní kmen *E. coli*, který obsahoval fragmenty genu *rpoE*. Připravené proteiny o délce 65 AK a 45 AK N-koncové části podjednotky δ byly získány v dostatečném množství a čistotě pro další experimenty. V budoucnu budou použity pro charakterizaci funkce jednotlivých domén podjednotky δ RNAP.

Bylo provedeno bioinformatické hledání homologů proteinu δ . Hledání sekvenční a strukturní podobnosti podjednotky δ a její N-koncové části nepřineslo významné objevy pro objasnění molekulárního mechanismu působení tohoto proteinu v buňce. Při porovnání záporně

nabitě části sekvence C-koncové domény podjednotky δ byly nalezeny podobné oblasti u nukleoproteinů eukaryotních organismů. Nalezené sekvence bohaté na kyselé AK mohou působit jako specifické domény napodobující nukleovou kyselinu. Tím pravděpodobně soutěží s nukleovou kyselinou o vazbu proteinu, čímž zvyšují specifitu vazby proteinu.

Má práce přispěla k identifikaci nového obecného typu proteinové domény, který bude v budoucnu charakterizován.

Seznam citované literatury

- Achberger, E. C., Hilton, M. D., Whiteley, H. R., May 1982a. The effect of the delta subunit on the interaction of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with bases in a SP82 early gene promoter. *Nucleic Acids Res* 10 (9), 2893–2910.
- Achberger, E. C., Tahara, M., Whiteley, H. R., May 1982b. Interchangeability of delta subunits of RNA polymerase from different species of the genus *Bacillus*. *J Bacteriol* 150 (2), 977–980.
- Achberger, E. C., Whiteley, H. R., Dec 1980. The interaction of *Escherichia coli* core RNA polymerase with specificity-determining subunits derived from unmodified and SP82-modified *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J Biol Chem* 255 (24), 11957–11964.
- Achberger, E. C., Whiteley, H. R., Jul 1981. The role of the delta peptide of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase in promoter selection. *J Biol Chem* 256 (14), 7424–7432.
- Adekambi, T., Drancourt, M., Raoult, D., Jan 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* 17 (1), 37–45.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>
- Ara, K., Ozaki, K., Nakamura, K., Yamane, K., Sekiguchi, J., Ogasawara, N., Mar 2007. *Bacillus minimum* genome factory: effective utilization of microbial genome information. *Biotechnol Appl Biochem* 46 (Pt 3), 169–178.
URL <http://dx.doi.org/10.1042/BA20060111>
- Aramaki, H., Yagi, N., Suzuki, M., Dec 1995. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng* 8 (12), 1259–1266.
- Artsimovitch, I., Svetlov, V., Anthony, L., Burgess, R. R., Landick, R., Nov 2000. RNA polymerases from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* differ in recognition of regulatory signals in vitro. *J Bacteriol* 182 (21), 6027–6035.
- Bai, U., Mandic-Mulec, I., Smith, I., Jan 1993. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Dev* 7 (1), 139–148.
- Bar-Nahum, G., Nudler, E., Aug 2001. Isolation and characterization of sigma(70)-retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*. *Cell* 106 (4), 443–451.
- Belogurov, G. A., Mooney, R. A., Svetlov, V., Landick, R., Artsimovitch, I., Jan 2009. Functional specialization of transcription elongation factors. *EMBO J* 28 (2), 112–122.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.268>
- Borukhov, S., Lee, J., Laptenko, O., Mar 2005. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol Microbiol* 55 (5), 1315–1324.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04481.x>

- Borukhov, S., Severinov, K., Nov 2002. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res Microbiol* 153 (9), 557–562.
- Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R., Sep 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (20), 11621–11626.
URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191384198>
- Brown, K. L., Hughes, K. T., May 1995. The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* 16 (3), 397–404.
- Browning, D. F., Busby, S. J., Jan 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* 2 (1), 57–65.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro787>
- Burgess, R. R., Nov 1969. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem* 244 (22), 6168–6176.
- Burrows, P. C., Severinov, K., Ishihama, A., Buck, M., Wigneshweraraj, S. R., Aug 2003. Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element. *J Biol Chem* 278 (32), 29728–29743.
URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M303596200>
- Cabrera, J. E., Jin, D. J., Oct 2001. Growth phase and growth rate regulation of the *rapA* gene, encoding the RNA polymerase-associated protein RapA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183 (20), 6126–6134.
URL <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.20.6126-6134.2001>
- Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M. L., Darst, S. A., Mar 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* 9 (3), 527–539.
- Campbell, E. A., Pavlova, O., Zenkin, N., Leon, F., Irschik, H., Jansen, R., Severinov, K., Darst, S. A., Feb 2005. Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *EMBO J* 24 (4), 674–682.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600499>
- Cayuela, M. L., Elias-Arnanz, M., Penalver-Mellado, M., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., Jun 2003. The *Stigmatella aurantiaca* homolog of *Myxococcus xanthus* high-mobility-group A-type transcription factor CarD: insights into the functional modules of CarD and their distribution in bacteria. *J Bacteriol* 185 (12), 3527–3537.
- Chai, Y., Kolter, R., Losick, R., Nov 2009. Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 74 (4), 876–887.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06900.x>
- Chen, H., Contreras, X., Yamaguchi, Y., Handa, H., Peterlin, B. M., Guo, S., 2009. Repression of RNA polymerase II elongation in vivo is critically dependent on the C-terminus of Spt5. *PLoS One* 4 (9), e6918.
URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006918>

- Chen, J., Darst, S. A., Thirumalai, D., Jul 2010. Promoter melting triggered by bacterial RNA polymerase occurs in three steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (28), 12523–12528.
URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1003533107>
- Ciampi, M. S., Sep 2006. Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* 152 (Pt 9), 2515–2528.
URL <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28982-0>
- Condon, C., Jun 2003. RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (2), 157–74, table of contents.
- Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., Squires, C. L., Jul 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J Bacteriol* 177 (14), 4152–4156.
- Connolly, L. E., Cox, J. S., Jul 2009. CarD tricks and magic spots: mechanisms of stringent control in mycobacteria. *Cell Host Microbe* 6 (1), 1–2.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.07.001>
- de Hoon, M. J. L., Makita, Y., Nakai, K., Miyano, S., Aug 2005. Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Comput Biol* 1 (3), e25.
URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010025>
- de Saro, F. J. L., Woody, A. Y., Helmann, J. D., Sep 1995. Structural analysis of the *Bacillus subtilis* delta factor: a protein polyanion which displaces RNA from RNA polymerase. *J Mol Biol* 252 (2), 189–202.
- de Saro, F. J. L., Yoshikawa, N., Helmann, J. D., May 1999. Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 274 (22), 15953–15958.
- Debarbouille, M., Martin-Verstraete, I., Kunst, F., Rapoport, G., Oct 1991. The *Bacillus subtilis* sigL gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (20), 9092–9096.
- deHaseth, P. L., Zupancic, M. L., Record, M. T., Jun 1998. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J Bacteriol* 180 (12), 3019–3025.
- DeJong, J., Bernstein, R., Roeder, R. G., Apr 1995. Human general transcription factor TFIIA: characterization of a cDNA encoding the small subunit and requirement for basal and activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (8), 3313–3317.
- Deutscher, M. P., 2006. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res* 34 (2), 659–666.
URL <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj472>
- Dobinson, K. F., Spiegelman, G. B., Dec 1987. Effect of the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase on initiation of RNA synthesis at two bacteriophage phi 29 promoters. *Biochemistry* 26 (25), 8206–8213.

- Doherty, G. P., Fogg, M. J., Wilkinson, A. J., Lewis, P. J., Dec 2010. Small subunits of RNA polymerase: localization, levels and implications for core enzyme composition. *Microbiology* 156 (Pt 12), 3532–3543.
URL <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.041566-0>
- Dubnau, D., Losick, R., Aug 2006. Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* 61 (3), 564–572.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05249.x>
- Durand, J. M., Bjork, G. R., Kuwae, A., Yoshikawa, M., Sasakawa, C., Sep 1997. The modified nucleoside 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenosine in tRNA of *Shigella flexneri* is required for expression of virulence genes. *J Bacteriol* 179 (18), 5777–5782.
- Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., Sep 2010. The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: a bacterial enhanceosome? *FEMS Microbiol Rev* 34 (5), 764–778.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00235.x>
- Emilsson, V., Naslund, A. K., Kurland, C. G., Sep 1992. Thiolation of transfer RNA in *Escherichia coli* varies with growth rate. *Nucleic Acids Res* 20 (17), 4499–4505.
- Fujita, Y., Feb 2009. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73 (2), 245–259.
- Gaal, T., Bartlett, M. S., Ross, W., Turnbough, C. L., Gourse, R. L., Dec 1997. Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science* 278 (5346), 2092–2097.
- Gao, H., Aronson, A. I., Jun 2004. The delta subunit of RNA polymerase functions in sporulation. *Curr Microbiol* 48 (6), 401–404.
URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-003-4229-8>
- Garcia-Moreno, D., Abellon-Ruiz, J., Garcia-Heras, F., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., Elias-Arnanz, M., Aug 2010. CdnL, a member of the large CarD-like family of bacterial proteins, is vital for *Myxococcus xanthus* and differs functionally from the global transcriptional regulator CarD. *Nucleic Acids Res* 38 (14), 4586–4598.
URL <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq214>
- Gentry, D. R., Burgess, R. R., Mar 1989. rpoZ, encoding the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, is in the same operon as spoT. *J Bacteriol* 171 (3), 1271–1277.
- Gentry, D. R., Burgess, R. R., Oct 1993. Cross-linking of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. *Biochemistry* 32 (41), 11224–11227.
- Goldman, S. R., Ebright, R. H., Nickels, B. E., May 2009. Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo. *Science* 324 (5929), 927–928.
URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1169237>

- Gourse, R. L., Ross, W., Gaal, T., Aug 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol* 37 (4), 687–695.
- Gruber, T. M., Gross, C. A., 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57, 441–466.
URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090913>
- Haugen, S. P., Ross, W., Gourse, R. L., Jul 2008a. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol* 6 (7), 507–519.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1912>
- Haugen, S. P., Ross, W., Manrique, M., Gourse, R. L., Mar 2008b. Fine structure of the promoter-sigma region 1.2 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (9), 3292–3297.
URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709513105>
- Hilton, M. D., Whiteley, H. R., Jul 1985. UV cross-linking of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase to DNA in promoter and non-promoter complexes. *J Biol Chem* 260 (13), 8121–8127.
- Hsu, L. M., Vo, N. V., Chamberlin, M. J., Dec 1995. *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (25), 11588–11592.
- Ibba, M., Söll, D., Dec 1999. Quality control mechanisms during translation. *Science* 286 (5446), 1893–1897.
- Ishihama, A., 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 54, 499–518.
URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.499>
- Jones, A. L., Needham, R. H. V., Rubens, C. E., Jul 2003. The Delta subunit of RNA polymerase is required for virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 71 (7), 4011–4017.
- Juang, Y. L., Helmann, J. D., May 1994a. 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), 1–14.
URL <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1346>
- Juang, Y. L., Helmann, J. D., Feb 1994b. A promoter melting region in the primary sigma factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic amino acids. *J Mol Biol* 235 (5), 1470–1488.
URL <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1102>
- Klumpp, S., Hwa, T., Dec 2008. Growth-rate-dependent partitioning of RNA polymerases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (51), 20245–20250.
URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804953105>

Kobayashi, K., Sep 2008. SlrR/SlrA controls the initiation of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 69 (6), 1399–1410.

URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06369.x>

Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Coq, D. L., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F. M. L., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H. B., Vagner, V., van Dijl, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., Ogasawara, N., Apr 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (8), 4678–4683.

URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0730515100>

Krasny, L., Gourse, R. L., Nov 2004. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J* 23 (22), 4473–4483.

URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600423>

Krasny, L., Tiserova, H., Jonak, J., Rejman, D., Sanderova, H., Jul 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 (1), 42–54.

URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06256.x>

Lampe, M., Binnie, C., Schmidt, R., Losick, R., Jul 1988. Cloned gene encoding the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Gene* 67 (1), 13–19.

Lewis, P. J., Doherty, G. P., Clarke, J., Jul 2008. Transcription factor dynamics. *Microbiology* 154 (Pt 7), 1837–1844.

URL <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/018549-0>

Lopez, J. M., Dromerick, A., Freese, E., May 1981. Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* 146 (2), 605–613.

MacLellan, S. R., Guariglia-Oropeza, V., Gaballa, A., Helmann, J. D., Dec 2009. A two-subunit bacterial sigma-factor activates transcription in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (50), 21323–21328.

URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0910006106>

- Maeda, H., Fujita, N., Ishihama, A., Sep 2000. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 28 (18), 3497–3503.
- Mallik, P., Paul, B. J., Rutherford, S. T., Gourse, R. L., Osuna, R., Aug 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 (16), 5775–5782.
URL <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00276-06>
- Mathew, R., Chatterji, D., Oct 2006. The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol* 14 (10), 450–455.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2006.08.002>
- Miller, J., Stagljar, I., 2004. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods Mol Biol* 261, 247–262.
URL <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-762-9:247>
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., Severinov, K., Jan 2001. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (3), 892–897.
URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.98.3.892>
- Mitchell, J. E., Zheng, D., Busby, S. J. W., Minchin, S. D., Aug 2003. Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 31 (16), 4689–4695.
- Motackova, V., Sanderova, H., Zidek, L., Novacek, J., Padrta, P., Svenkova, A., Korelusova, J., Jonak, J., Krasny, L., Sklenar, V., May 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 (7), 1807–1810.
URL <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22708>
- Mukhamedyarov, D., Makarova, K. S., Severinov, K., Kuznedelov, K., 2011. *Francisella* RNA polymerase contains a heterodimer of non-identical α subunits. *BMC Mol Biol* 12, 50.
URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-12-50>
- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O., Darst, S. A., May 2002. Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* 296 (5571), 1285–1290.
URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069595>
- Murray, H. D., Schneider, D. A., Gourse, R. L., Jul 2003. Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. *Mol Cell* 12 (1), 125–134.
- Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C.-S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., Tozawa, Y., Jan 2008. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp

- synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 67 (2), 291–304.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06018.x>
- Nickels, B. E., Dove, S. L., Oct 2011. NanoRNAs: a class of small RNAs that can prime transcription initiation in bacteria. *J Mol Biol* 412 (5), 772–781.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.015>
- Ochi, K., Jun 2007. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci Biotechnol Biochem* 71 (6), 1373–1386.
- Paul, B. J., Berkmen, M. B., Gourse, R. L., May 2005. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (22), 7823–7828.
URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501170102>
- Pemberton, I. K., Muskhelishvili, G., Travers, A. A., Buckle, M., Jun 2000. The G+C-rich discriminator region of the *tyrT* promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *J Mol Biol* 299 (4), 859–864.
URL <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.3780>
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., Vassylyev, D. G., Aug 2004. Regulation through the secondary channel–structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* 118 (3), 297–309.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.030>
- Pero, J., Nelson, J., Fox, T. D., Apr 1975. Highly asymmetric transcription by RNA polymerase containing phage-SP01-induced polypeptides and a new host protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (4), 1589–1593.
- Piggot, P. J., Hilbert, D. W., Dec 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 7 (6), 579–586.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Pointud, J.-C., Mengus, G., Brancorsini, S., Monaco, L., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., Davidson, I., May 2003. The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci* 116 (Pt 9), 1847–1858.
- Qi, Y., Hulett, F. M., Jun 1998. PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *Mol Microbiol* 28 (6), 1187–1197.
- Rabatinova, A., Papouskova, V., Sanderova, H., Matejkova, J. J., Korelusova, J., Sojka, L., Barvik, I., Novak, P., Sklenar, V., Zidek, L., Krasny, L., rukopis v přípravě. The delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase: non-essential protein that is indispensable.
- Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., Tobes, R., Jun 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (2), 326–356.
URL <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005>

- Revyakin, A., Ebright, R. H., Strick, T. R., Apr 2004. Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (14), 4776–4780.
URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307241101>
- Ross, W., Ernst, A., Gourse, R. L., Mar 2001. Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev* 15 (5), 491–506.
URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.870001>
- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R. L., Nov 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262 (5138), 1407–1413.
- Rutherford, S. T., Lemke, J. J., Vrentas, C. E., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R. L., Mar 2007. Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *J Mol Biol* 366 (4), 1243–1257.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.013>
- Saier, M. H., Chauvaux, S., Cook, G. M., Deutscher, J., Paulsen, I. T., Reizer, J., Ye, J. J., Feb 1996. Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 142 (Pt 2), 217–230.
- Schwartz, E. C., Shekhtman, A., Dutta, K., Pratt, M. R., Cowburn, D., Darst, S., Muir, T. W., Oct 2008. A full-length group 1 bacterial sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding. *Chem Biol* 15 (10), 1091–1103.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.09.008>
- Seepersaud, R., Needham, R. H. V., Kim, C. S., Jones, A. L., Mar 2006. Abundance of the delta subunit of RNA polymerase is linked to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* 188 (6), 2096–2105.
URL <http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.6.2096-2105.2006>
- Sevim, E., Gaballa, A., Belduz, A. O., Helmann, J. D., Jan 2011. DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* and *Aeribacillus pallidus* AC6 sigmaD proteins. *J Bacteriol* 193 (2), 575–579.
URL <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01193-10>
- Shoji, S., Walker, S. E., Fredrick, K., Feb 2009. Ribosomal translocation: one step closer to the molecular mechanism. *ACS Chem Biol* 4 (2), 93–107.
URL <http://dx.doi.org/10.1021/cb8002946>
- Sojka, L., Kouba, T., Barvik, I., Sanderova, H., Maderova, Z., Jonak, J., Krasny, L., Jun 2011. Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*

39 (11), 4598–4611.

URL <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr032>

Spiegelman, G. B., Hiatt, W. R., Whiteley, H. R., Mar 1978. Role of the 21,000 molecular weight polypeptide of *Bacillus subtilis* RNA polymerase in RNA synthesis. *J Biol Chem* 253 (6), 1756–1765.

Srivatsan, A., Wang, J. D., Apr 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol* 11 (2), 100–105.

URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.001>

Stallings, C. L., Stephanou, N. C., Chu, L., Hochschild, A., Nickels, B. E., Glickman, M. S., Jul 2009. CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell* 138 (1), 146–159.

URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.041>

Stebbins, C. E., Borukhov, S., Orlova, M., Polyakov, A., Goldfarb, A., Darst, S. A., Feb 1995. Crystal structure of the GreA transcript cleavage factor from *Escherichia coli*. *Nature* 373 (6515), 636–640.

URL <http://dx.doi.org/10.1038/373636a0>

Stein, T., May 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56 (4), 845–857.

URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>

Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jager, J., Joyce, C. M., Dec 1994. A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* 266 (5193), 2022–2025.

Sukhodolets, M. V., Cabrera, J. E., Zhi, H., Jin, D. J., Dec 2001. RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription. *Genes Dev* 15 (24), 3330–3341.

URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.936701>

Sukhodolets, M. V., Jin, D. J., Jul 2000. Interaction between RNA polymerase and RapA, a bacterial homolog of the SWI/SNF protein family. *J Biol Chem* 275 (29), 22090–22097.

URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M000056200>

Svetlov, V., Belogurov, G. A., Shabrova, E., Vassilyev, D. G., Artsimovitch, I., 2007. Allosteric control of the RNA polymerase by the elongation factor RfaH. *Nucleic Acids Res* 35 (17), 5694–5705.

URL <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm600>

Sweetser, D., Nonet, M., Young, R. A., Mar 1987. Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (5), 1192–1196.

Tjian, R., Losick, R., Pero, J., Hinnebush, A., Mar 1977. Purification and comparative properties of the delta and sigma subunits of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 74 (1), 149–154.

- Torres, M., Condon, C., Balada, J. M., Squires, C., Squires, C. L., Jul 2001. Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *EMBO J* 20 (14), 3811–3820.
URL <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.14.3811>
- Turnbough, C. L., Jul 2008. Regulation of bacterial gene expression by the NTP substrates of transcription initiation. *Mol Microbiol* 69 (1), 10–14.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06272.x>
- Uetz, P., Feb 2002. Two-hybrid arrays. *Curr Opin Chem Biol* 6 (1), 57–62.
- Vassylyev, D. G., Dec 2009. Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks. *Curr Opin Struct Biol* 19 (6), 691–700.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2009.10.004>
- Vassylyev, D. G., ichi Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M. N., Borukhov, S., Yokoyama, S., Jun 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417 (6890), 712–719.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature752>
- Vrentas, C. E., Gaal, T., Berkmen, M. B., Rutherford, S. T., Haugen, S. P., Vassylyev, D. G., Ross, W., Gourse, R. L., Mar 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 (2), 551–564.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.042>
- Vrentas, C. E., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R. H., Gourse, R. L., Oct 2005. Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev* 19 (19), 2378–2387.
URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1340305>
- Wassarman, K. M., Sep 2007. 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol Microbiol* 65 (6), 1425–1431.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05894.x>
- Watson, S. P., Antonio, M., Foster, S. J., Nov 1998. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* starvation-induced, stationary-phase mutants defective in survival or recovery. *Microbiology* 144 (Pt 11), 3159–3169.
- Westblade, L. F., Campbell, E. A., Pukhrambam, C., Padovan, J. C., Nickels, B. E., Lamour, V., Darst, S. A., Dec 2010. Structural basis for the bacterial transcription-repair coupling factor/RNA polymerase interaction. *Nucleic Acids Res* 38 (22), 8357–8369.
URL <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq692>
- Wigneshweraraj, S. R., Fujita, N., Ishihama, A., Buck, M., Jun 2000. Conservation of sigma-core RNA polymerase proximity relationships between the enhancer-independent and enhancer-dependent sigma classes. *EMBO J* 19 (12), 3038–3048.
URL <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.12.3038>

- Xue, X., Li, J., Wang, W., Sztajer, H., Wagner-Dobler, I., Jan 2012. The global impact of the delta subunit RpoE of the RNA polymerase on the proteome of *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 158 (Pt 1), 191–206.
URL <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.047936-0>
- Xue, X., Sztajer, H., Buddruhs, N., Petersen, J., Rohde, M., Talay, S. R., Wagner-Dobler, I., 2011. Lack of the delta subunit of RNA polymerase increases virulence related traits of *Streptococcus mutans*. *PLoS One* 6 (5), e20075.
URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020075>
- Xue, X., Tomasch, J., Sztajer, H., Wagner-Dobler, I., Oct 2010. The delta subunit of RNA polymerase, RpoE, is a global modulator of *Streptococcus mutans* environmental adaptation. *J Bacteriol* 192 (19), 5081–5092.
URL <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00653-10>
- Yang, X., Lewis, P. J., 2010. The interaction between bacterial transcription factors and RNA polymerase during the transition from initiation to elongation. *Transcription* 1 (2), 66–69.
URL <http://dx.doi.org/10.4161/trns.1.2.12791>
- Yang, X., Molimau, S., Doherty, G. P., Johnston, E. B., Marles-Wright, J., Rothnagel, R., Hankamer, B., Lewis, R. J., Lewis, P. J., Sep 2009. The structure of bacterial RNA polymerase in complex with the essential transcription elongation factor NusA. *EMBO Rep* 10 (9), 997–1002.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2009.155>
- Yang, X., Price, C. W., Oct 1995. Streptolydigin resistance can be conferred by alterations to either the beta or beta' subunits of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J Biol Chem* 270 (41), 23930–23933.
- Yang, X.-J., Gregoire, S., Jun 2007. Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nepsilon - and O-acetylation. *EMBO Rep* 8 (6), 556–562.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400977>
- Yeh, H.-Y., Chen, T.-C., Liou, K.-M., Hsu, H.-T., Chung, K.-M., Hsu, L.-L., Chang, B.-Y., Feb 2011. The core-independent promoter-specific interaction of primary sigma factor. *Nucleic Acids Res* 39 (3), 913–925.
URL <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq911>
- Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C. M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T., Fujita, Y., Feb 2001. Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 29 (3), 683–692.
- Yuzenkova, Y., Tadigotla, V. R., Severinov, K., Zenkin, N., 2011. A new basal promoter element recognized by RNA polymerase core enzyme. *EMBO J* 30 (18), 3766–3775.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.252>

Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S. A., Sep 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98 (6), 811–824.

Zhang, Z., Theler, D., Kaminska, K. H., Hiller, M., de la Grange, P., Pudimat, R., Rafalska, I., Heinrich, B., Bujnicki, J. M., Allain, F. H.-T., Stamm, S., May 2010. The YTH domain is a novel RNA binding domain. *J Biol Chem* 285 (19), 14701–14710.
URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.104711>