

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Michal Sýkora**

Charakterizace transkripčního aparátu lineárních plasmidů kvasinky  
*Kluyveromyces lactis*

Characterization of transcription apparatus encoded by the linear plasmids  
of the yeast *Kluyveromyces lactis*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2013

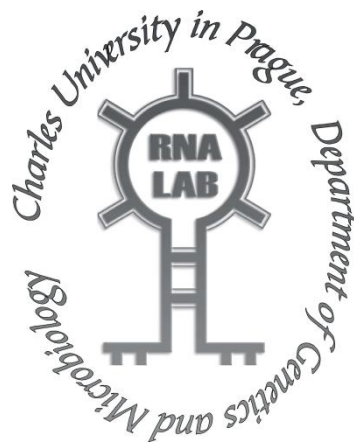
### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8. 2013



.....  
Michal Sýkora



## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji především mému školiteli Mgr. Václavovi Vopálenskému, Ph.D. za vše, co mě naučil, a za trpělivost, kterou se mnou měl, když bylo třeba mě něco naučit opakovaně. Další dík patří RNDr. Martinu Pospíškovi, Ph.D., že mě přijal do své laboratoře a přidělil k tak vstřícnému školiteli. Také bych rád poděkoval ostatním členům Laboratoře biochemie RNA, jmenovitě Josefu Novákovi, Silvii Mrvové, Elišce Kročové, Lucii Holáskové a Jakubovi Zemanovi za vytvoření příjemné atmosféry pro bádání a cenné rady leccjakého charakteru. Moje poděkování patří i Vlastě Pelechové a Petře Studničkové za poctivou laborantskou práci. V neposlední řadě patří dík také mojí rodině za podporu během celého studia.

Tato práce byla vypracována v letech 2009–2013 za podpory grantového projektu P305/12/G034 Grantové agentury České republiky.

## ABSTRAKT

Transkripce je zásadním krokem exprese genetické informace. Tento proces závisí na proteinovém komplexu vícepodjednotkových RNA polymeráz, které jsou mimořádně konzervované mezi všemi buněčnými organismy. Tyto enzymy, spolu s RNA dependentními RNA polymerázami podílejícími se na umlčování genů, tvoří monofyletickou proteinovou rodinu, jejíž členové obsahují ve svém aktivním centru dva *double- $\psi$   $\beta$ -barrel* strukturní motivy. Do této rodiny patří také skupina převážně *in silico* predikovaných nekanonických DNA dependentních RNA polymeráz, které se od vícepodjednotkových RNA polymeráz odlišují redukovaným složením. Předpokládaná nekanonická RNA polymeráza, skládající se ze dvou podjednotek, je kódována také lineárními cytoplasmatickými plasmidy kvasinky *Kluyveromyces lactis* a velmi pravděpodobně přepisuje geny těchto plasmidů. Charakterizace unikátního transkripčního aparátu plasmidů *Kluyveromyces lactis*, s hlavním důrazem na nekanonickou RNA polymerázu, se stala cílem této práce.

Bioinformatická analýza *in silico* byla použita k prověření důkazů vedoucích k předpokladu existence specifické RNA polymerázy. Následné genetické a biochemické metody byly použity pro: 1) produkci podjednotek předpokládané RNA polymerázy v několika expresních systémech; 2) testování interakce mezi některými komponentami transkripčního aparátu; 3) značení epitopu velké podjednotky RNA polymerázy rekombinací *in vivo*.

Tato práce rozšířila sekvenční podobnost aminokyselin předpokládané RNA polymerázy s vícepodjednotkovými RNA polymerázami. Také se podařilo produkovat a částečně purifikovat podjednotky předpokládané RNA polymerázy.

**Klíčová slova:** transkripce, vícepodjednotková RNA polymeráza, izolace, charakterizace, pGKL plasmidy

## ABSTRACT

Transcription is an essential step in the expression of genetic information. This process depends on protein complex of multisubunit RNA polymerases that are exceptionally conserved among all cellular organisms. These enzymes together with eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases involved in gene silencing form a monophyletic protein family whose members contain two double- $\psi$   $\beta$ -barrel structural motifs in their active center. This family also includes a group of mainly *in silico* predicted non-canonical DNA-dependent RNA polymerases which differ from multisubunit RNA polymerases in reduced composition. Putative non-canonical RNA polymerase consisting of two subunits is also encoded by cytoplasmic linear plasmids of the yeast *Kluyveromyces lactis* and highly likely transcribes genes of these plasmids. Characterization of a unique transcription machinery of *Kluyveromyces lactis* plasmids with major emphasis on non-canonical RNA polymerase has become the aim of this work.

Bioinformatic analysis *in silico* was used to examine the evidence leading to an assumption of existence of specific RNA polymerase. Subsequent genetic and biochemical methods were used for: 1) production of putative RNA polymerase subunits in several expression systems; 2) testing interaction between several components of transcription apparatus; 3) epitope tagging of large subunit of RNA polymerase by recombination *in vivo*.

This work extended amino acid sequence similarity between putative RNA polymerase and other multisubunit RNA polymerases. Production and partial purification of putative RNA polymerase subunits was also achieved.

**Keywords:** transcription, multisubunit RNA polymerase, isolation, characterization, pGKL plasmids

# Obsah

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
1 ÚVOD.....	11
2 PŘEHLED LITERATURY.....	12
2.1 Proteiny z rodiny <i>two-barrel</i> RNA polymeráz.....	12
2.1.1 Kanonické vícepodjednotkové DNA dependentní RNA polymerázy.....	15
2.1.1.1 RNA polymerázy bakterií a plastidů.....	15
2.1.1.2 RNA polymerázy eukaryot a <i>Archaea</i> .....	17
2.1.1.3 RNA polymerázy nukleocytoplasmatických virů.....	21
2.1.2 Konzervované oblasti kanonických vícepodjednotkových RNA polymeráz.....	23
2.1.2.1 Konzervované oblasti $\beta$ podjednotky.....	24
2.1.2.2 Konzervované oblasti $\beta'$ podjednotky.....	26
2.1.3 Nekanonické vícepodjednotkové DNA dependentní RNA polymerázy.....	30
2.1.3.1 RNA polymerázy virů <i>Baculoviridae</i> , <i>Nudiviridae</i> a <i>Hytrosaviridae</i> .....	30
2.1.3.2 RNA polymerázy fágů bakterií rodu <i>Pseudomonas</i> a <i>Yersinia</i> .....	32
2.1.3.3 RNA polymerázy typu NCgl1702.....	32
2.1.3.4 RNA polymerázy lineárních plasmidů kvasinek.....	33
2.2 Cytoplasmatické lineární plasmidy kvasinky <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	35
2.2.1 Transkripční aparát lineárních plasmidů.....	36
2.2.1.1 RNA polymeráza (ORF6-pGKL2 a ORF7-pGKL2).....	37
2.2.1.2 Helikáza (ORF4-pGKL2).....	38
2.2.1.3 <i>Capping</i> enzym (ORF3-pGKL2).....	38
3 CÍLE PRÁCE.....	41
4 MATERIÁL A METODY.....	42
4.1 Materiál.....	42
4.1.1 Chemikálie.....	42
4.1.2 Roztoky.....	44
4.1.2.1 Pufry pro purifikaci proteinů a imunoprecipitaci.....	45
4.1.3 Komerční pufry a roztoky nezahrnuté v soupravách.....	46
4.1.4 Enzymy.....	47

4.1.5 Komerční soupravy .....	47
4.1.6 Standardy molekulových hmotností .....	48
4.1.7 Vektory .....	48
4.1.8 Oligonukleotidové primery .....	49
4.1.9 Protilátky .....	51
4.1.10 Bakteriální kmeny .....	51
4.1.11 Kvasinkové kmeny .....	52
4.1.12 Kultivační média .....	52
4.1.12.1 Bakteriální kultivační média .....	52
4.1.12.2 Kvasinková kultivační média .....	53
<b>4.2 Metody</b> .....	<b>54</b>
4.2.1 Práce s mikroorganismy .....	54
4.2.1.1 Kultivace bakterií .....	54
4.2.1.2 Kultivace kvasinek .....	54
4.2.1.3 Skladování bakteriálních a kvasinkových kmenů .....	54
4.2.1.4 Měření růstu mikroorganismů.....	54
4.2.1.5 Testování auxotrofních požadavků kvasinkových kmenů.....	55
4.2.1.6 Indukce bakteriálního Tac promotoru.....	55
4.2.1.7 Příprava kvasinkových buněk pro měření na průtokovém cytometru .....	55
4.2.2 Práce s DNA .....	56
4.2.2.1 Izolace DNA.....	56
4.2.2.2 Měření koncentrace DNA.....	63
4.2.2.3 Agarosová elektroforéza DNA.....	63
4.2.2.4 Modifikace DNA .....	64
4.2.2.5 Vnášení DNA do mikroorganismů .....	66
4.2.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvenování .....	68
4.2.3 Práce s proteiny .....	70
4.2.3.1 Příprava bakteriálních lyzátů .....	70
4.2.3.2 Purifikace proteinů s GST-epitopem z bakteriálních a kvasinkových lyzátů.....	70
4.2.3.3 Produkce proteinů v bezbuněčném <i>in vitro</i> translačním systému .....	72
4.2.3.4 Purifikace proteinů s HIS-epitopem z <i>in vitro</i> translačního systému .....	72
4.2.3.5 Příprava kvasinkových lyzátů .....	73
4.2.3.6 Imunoprecipitace proteinů z kvasinek.....	75
4.2.3.7 Imunoprecipitace proteinů s GFP-epitopem z kvasinkových lyzátů.....	77



4.2.3.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou s kyselinou bicinchoninovou.....	78
4.2.3.9 Polyakrylamidová proteinová elektroforéza SDS-PAGE.....	79
4.2.3.10 <i>Western blot</i> .....	80
4.2.3.11 Chemiluminiscenční detekce.....	81
4.2.3.12 Barvení polyakrylamidových gelů.....	82
4.2.3.13 Sušení polyakrylamidových gelů.....	84
4.2.3.14 Odstranění protilátek z již analyzované <i>Western blot</i> membrány .....	84
4.2.3.15 Semikvantitativní analýza exprese pomocí <i>Western blot</i> .....	85
4.2.4 Práce s obrazovými daty .....	85
4.2.5 Bioinformatické analýzy.....	86
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>88</b>
<b>5.1 Bioinformatická charakterizace transkripčního aparátu lineárních plasmidů</b> .....	<b>88</b>
5.1.1 Sekvenční analýza RNA polymerázy (ORF6-pGKL2 a ORF7-pGKL2).....	88
5.1.2 Sekvenční analýza <i>capping</i> enzymu (ORF3-pGKL2).....	91
5.1.3 Model terciální struktury RNA polymerázy.....	93
5.1.4 Model terciální struktury methyltransferázy <i>capping</i> enzymu.....	97
5.1.5 Fylogenetická analýza RNA polymerázy.....	98
<b>5.2 Produkce RNA polymerázy v bakteriálním expresním systému</b> .....	<b>101</b>
5.2.1 Příprava vektorů.....	101
5.2.2 Purifikace a detekce rekombinantních proteinů.....	104
<b>5.3 Produkce RNA polymerázy v kvasinkovém expresním systému</b> .....	<b>106</b>
5.3.1 Příprava vektorů a kontrola integrace v recipientních buňkách .....	106
5.3.2 Purifikace a detekce rekombinantních proteinů.....	110
<b>5.4 Testování případné interakce RNA polymerázy a <i>capping</i> enzymu v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému</b> .....	<b>112</b>
5.4.1 Příprava vektorů.....	112
5.4.2 Detekce interakce mezi jednotlivými proteiny .....	115
<b>5.5 Produkce velké podjednotky RNA polymerázy v <i>in vitro</i> translačním systému</b> .....	<b>117</b>
<b>5.6 Příprava rekombinantních plasmidů pGKL2 kódujících velkou podjednotku RNA polymerázy se značkou</b> .....	<b>119</b>
5.6.1 Plasmid pGKL2 ORF6-FLAG.....	119
5.6.1.1 Příprava plasmidu .....	119
5.6.2 Plasmid pGKL2 FLAG-ORF6.....	122
5.6.2.1 Příprava plasmidu .....	122

5.6.2.2	Detekce a imunoprecipitace proteinu FLAG-ORF6.....	124
5.6.3	Plasmid pGKL2 EGFP-ORF6.....	125
5.6.3.1	Příprava plasmidu .....	125
5.6.3.2	Detekce a semikvantitativní analýza exprese proteinu EGFP-ORF6.....	128
5.6.3.3	Imunoprecipitace proteinu EGFP-ORF6.....	130
5.7	<b>Příprava rekombinantního plasmidu pGKL2 s mutovaným předpokládaným SAM vazebným místem proteinu ORF6.....</b>	<b>133</b>
6	<b>DISKUZE.....</b>	<b>134</b>
6.1	Bioinformatická charakterizace transkripčního aparátu lineárních plasmidů.....	134
6.2	Produkce RNA polymerázy v expresních systémech a <i>in vitro</i> translačním systému	137
6.3	Testování případné interakce RNA polymerázy a <i>capping</i> enzymu v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému.....	138
6.4	Příprava rekombinantních plasmidů pGKL2 kódujících velkou podjednotku RNA polymerázy se značkou .....	139
7	<b>SOUHRN.....</b>	<b>142</b>
8	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>143</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>Å</b>	Ångström (10 <sup>-10</sup> m)	Ångström (10 <sup>-10</sup> m)
<b>aRNAP</b>	archaeal RNA polymerase	RNA polymeráza u <i>Archaea</i>
<b>BiFC</b>	bimolecular fluorescence complementation	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
<b>bp(s)</b>	base pairs	páry bází
<b>bRNAP</b>	bacterial RNA polymerase	bakteriální RNA polymeráza
<b>DPBB</b>	double-psi β-barrel	<i>double-psi β-barrel</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EGFP</b>	enhanced green fluorescent protein	posílený zelený fluorescenční protein
<b>eRNAP</b>	eukaryotic RNA polymerase	eukaryotická RNA polymeráza
<b>FL2</b>	fork loop 2	vidličková smyčka 2
<b>GFP</b>	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
<b>IFO</b>	Institute for Fermentation, Osaka	Institut pro fermentaci, Osaka
<b>IP</b>	immunoprecipitation	imunoprecipitace
<b><i>K. lactis</i></b>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<b>kDa</b>	kilodalton (1,66 × 10 <sup>-24</sup> kg)	kilodalton (1,66 × 10 <sup>-24</sup> kg)
<b>mRNA</b>	messenger RNA	mediátorová RNA
<b>NPH I</b>	nucleosidetriphosphate phosphohydrolase I	nukleosidtrifosfátfosfohydroláza I
<b>NTP</b>	ribonucleoside-5'-triphosphate	ribonukleosid-5'-trifosfát
<b>OD</b>	optical density	optická denzita
<b>ORF</b>	open reading frame	otevřený čtecí rámec
<b>PAGE</b>	polyacrylamide gel electrophoresis	polyakrylamidová gelová elektroforéza
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
<b>pRNAP</b>	plastid RNA polymerase	plastidová RNA polymeráza
<b>RdRP</b>	RNA dependent RNA polymerase	RNA dependentní RNA polymeráza
<b>RNAP</b>	RNA polymerase	RNA polymeráza
<b>S</b>	Svedberg unit (10 <sup>-13</sup> s)	Svedbergova jednotka (10 <sup>-13</sup> s)
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SAM</b>	S-adenosyl-L-methionine	S-adenosyl-L-methionin
<b>SAP</b>	Shrimp Alkaline Phosphatase	alkalická fosfatáza izolovaná z krevet
<b>SBHM</b>	sandwich barrel hybrid motif	<i>sandwich barrel hybrid motif</i>
<b>UCS</b>	upstream conserved sequence	konzervovaná sekvence proti směru transkripce
<b>UV</b>	ultraviolet	ultrafialové záření
<b>VETF</b>	very early transcription factor	velmi časný transkripční faktor
<b>vRNAP</b>	viral RNA polymerase	virová RNA polymeráza
<b>VTF</b>	viral termination factor	virový terminační faktor

<b>yEGFP3</b>	yeast enhanced green fluorescent protein 3	kvasinkový posílený zelený fluorescenční protein 3
$\varrho^-$		rozsáhlé delece v mitochondriální DNA
$\varrho^0$		absence mitochondriální DNA

### Použité zkratky aminokyselin

<b>A</b>	alanin	<b>I</b>	isoleucin	<b>R</b>	arginin
<b>C</b>	cystein	<b>K</b>	lysin	<b>S</b>	serin
<b>D</b>	aspartát	<b>L</b>	leucin	<b>T</b>	threonin
<b>E</b>	glutamát	<b>M</b>	methionin	<b>V</b>	valin
<b>F</b>	fenylalanin	<b>N</b>	asparagin	<b>W</b>	tryptofan
<b>G</b>	glycin	<b>P</b>	prolin	<b>Y</b>	tyrozin
<b>H</b>	histidin	<b>Q</b>	glutamin	<b>x</b>	jakákoliv

### Použité zkratky nukleotidů

<b>A</b>	adenin	<b>C</b>	cytosin	<b>G</b>	guanin
<b>T</b>	thymin	<b>N</b>	jakýkoliv		

Všeobecně známé zkratky (například jednotky SI a jednotky od nich odvozené) zde nejsou vypsány. Zkratky použité v textu pouze jednou u obrázků zde také nejsou vypsány. Použité zkratky některých chemikálií jsou uvedeny v jiné kapitole této práce.

# 1 ÚVOD

Transkripce je hlavním kontrolním bodem genové exprese a DNA dependentní RNA polymeráza (RNAP) patří k zásadním enzymům v tomto procesu. Od objevení RNA polymerázy roku 1959 v krysích játrech bylo vynaloženo značné úsilí na pochopení mechanismů její funkce a regulace rozličnými faktory. Prvotní výzkum, zejména nepřímými metodami, byl zaměřen na RNA polymerázu bakterie *Escherichia coli*. Z této bakterie se také poprvé podařilo RNAP izolovat. Navzdory velké snaze se v začátcích strukturně-funkčních studií nepodařilo získat krystaly tohoto enzymu z *E. coli* pro určení trojrozměrné struktury rentgenovou krystalografií. Proto se od roku 1999 naprostá většina strukturních studií, které jsou nutné pro širší pochopení a interpretaci získaných genetických, biochemických a biofyzikálních dat, zaměřuje na RNA polymerázu II kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a RNAP termofilních bakterií rodu *Thermus*.

V 80. letech, když se staly dostupnými aminokyselinové sekvence velkých podjednotek RNAP z různých organismů, začalo být patrné, že jsou tyto enzymy homologní. Toto pozorování bylo potvrzeno vyřešením trojrozměrných struktur pro RNAP z každé buněčné větve života. RNA polymerázy všech buněčných organismů sdílejí evolučně konzervované jádro enzymu, které je tvořené pěti podjednotkami. Tyto polymerázy jsou klasifikovány jako vícepodjednotkové RNA polymerázy s pravděpodobně společným předkem. Obdobná RNA polymeráza je přítomna i u některých DNA virů, které ji pravděpodobně získaly od svých eukaryotických hostitelů. Před cca 10 lety bylo zjištěno, že vícepodjednotkové RNA polymerázy jsou vzdáleně příbuzné s buněčnými RNA dependentními RNA polymerázami, které se u eukaryot podílí na vzniku interferujících RNA. Tyto dvě skupiny RNA polymeráz odlišných rolí a velmi odlišných struktur tak patří do společné proteinové rodiny, která se v poslední době díky bioinformatickým studiím značně rozrůstá.

Již delší dobu je také známa existence nekanonických vícepodjednotkových DNA dependentních RNA polymeráz které, na rozdíl od buněčných transkripčních enzymů, obsahují menší část konzervovaného jádra, většinou omezenou pouze na dvě největší podjednotky nebo některé jejich úseky. Zjednodušená kompozice nekanonických RNAP může být způsobena značnou redukcí kanonických RNAP nebo jejich časným oddělením v evoluci od kanonických RNAP. Jedná se o skupinu takřka neprobádaných a až na jeden případ pouze *in silico* predikovaných RNA polymeráz.

Nekanonická RNAP je kódována i cytoplasmatickými lineárními plasmidy kvasinky *Kluyveromyces lactis*, kde je předpokládána součástí jejich unikátního transkripčního aparátu. Charakterizace tohoto transkripčního aparátu s důrazem na RNA polymerázu pomocí genetických, biochemických a bioinformatických metod se stala cílem této práce.

## 2 PŘEHLED LITERATURY

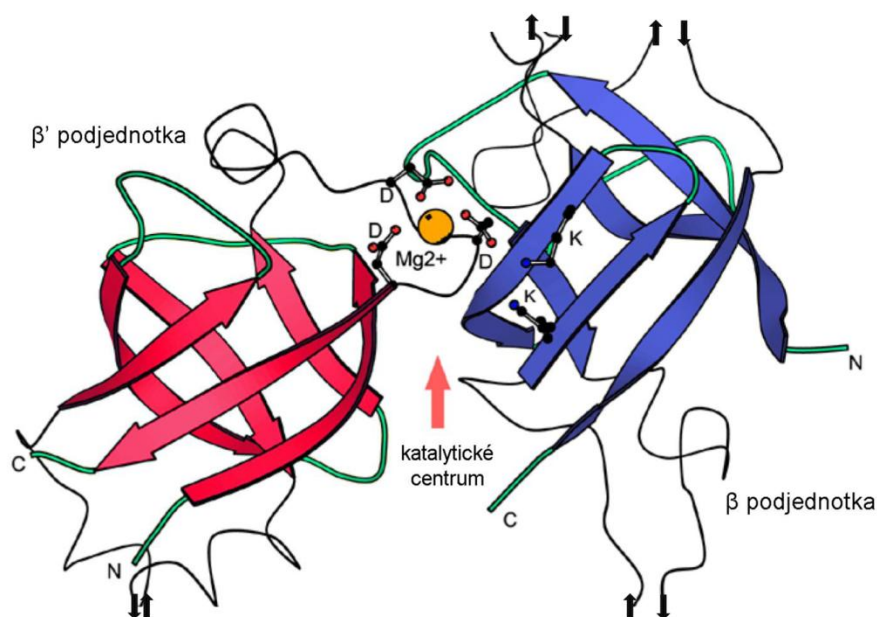
### 2.1 Proteiny z rodiny *two-barrel* RNA polymeráz

Polymerace ribonukleosidtrifosfátů (NTP) je nezbytná pro mnoho zásadních biologických procesů zahrnujících transkripci, replikaci DNA, posttranskripční modifikace RNA, editaci RNA, replikaci RNA virů a umlčování genů pomocí RNA interference (IYER *et al.* 2003). Enzymy zajišťující polymeraci NTP se liší v tom, zda pro svoji aktivitu vyžadují či nevyžadují templát. Na templátu závislé RNA polymerázy se dělí na DNA dependentní, zahrnující primázy a transkriptázy buněčných a virových genů, a RNA dependentní, které se podílejí na transkripci a replikaci RNA virů a na umlčování genů pomocí RNA interference. Skupina na templátu nezávislých RNAP, často označovaných jako nukleotidyltransferázy, obsahuje poly(A) polymerázy, oligo(A) syntetázy, uridyltransferázy a enzymy přidávající CCA na konce transferových RNA.

Všechny známé polymerázy obsahují aktivní místo, které váže kovové ionty potřebné pro katalýzu (STEITZ 1998). Navzdory této základní biochemické podobnosti sekvenční a strukturální porovnání všech výše zmíněných typů RNA polymeráz značí, že tyto enzymy patří do pěti evolučně nepříbuzných proteinových rodin (IYER *et al.* 2003). RNA polymerázová aktivita se zřejmě v evoluci objevila vícekrát nezávisle na sobě. DNA dependentní RNA polymerázy, které přepisují DNA, se dělí do dvou nestejnorodých skupin – jednopodjednotkových a vícepodjednotkových RNAP (CERMAKIAN *et al.* 1997). Mezi jednopodjednotkové RNA polymerázy patří RNAP bakteriofágů čeledi *Podoviridae*, mitochondriální RNAP většiny eukaryot, RNAP chloroplastů vyšších fotosyntetických rostlin a RNAP kódované některými mitochondriálními lineárními plasmidy hub a rostlin (CERMAKIAN *et al.* 1997).

Vícepodjednotkové RNA polymerázy obsahují dvě *double-ψ β-barrel* (DPBB) strukturální domény charakteristické pro celou rodinu příbuzných RNA polymeráz, které tak dostaly název *two-barrel* RNA polymerázy (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). DPBB je strukturální motiv, jenž se skládá ze šesti β-listů, zaujímajících tvar barelu. Každá z obou trojic paralelních β-listů tvoří jednu strukturu podobnou řeckému písmenu ψ (CASTILLO *et al.* 1999). U vícepodjednotkových RNAP jsou dvě DPBB domény umístěny na dvou největších podjednotkách (podjednotky β a β' podle bakteriálního názvosloví přejatého v této práci), které se označují jako katalytické podjednotky (IYER *et al.* 2003). DPBB katalytických podjednotek jsou těsně přiložené k sobě a každá z nich poskytuje klíčové zbytky aminokyselin orientované do aktivního místa enzymu (viz Obrázek 1). DPBB β' podjednotky obsahuje invariantní RXP motiv ve smyčce mezi třetím a čtvrtým β-listem, jehož argininový zbytek

interaguje s O4' kyslíkem substrátového NTP a 2'-OH skupinou předchozího nukleotidu zařazeného do vznikajícího vlákna RNA. Dále obsahuje DxDxD motiv ve smyčce mezi pátým a šestým  $\beta$ -listem, kde absolutně konzervované aspartátové zbytky koordinují jeden ze dvou hořečnatých iontů, označený jako Mg-A, nutných pro katalýzu (CRAMER *et al.* 2001; VASSYLYEV *et al.* 2007b). DPBB  $\beta$  podjednotky obsahuje invariantní aspartátový zbytek ve smyčce mezi prvním a druhým  $\beta$ -listem, který interaguje s hořečnatým iontem Mg-B. Dále zahrnuje dva konzervované lysinové zbytky ve třetím a čtvrtém  $\beta$ -listu, které interagují s negativně nabitými fosfáty páteře vznikající molekuly RNA (CRAMER *et al.* 2001). Výše zmíněných osm evolučně konzervovaných aminokyselinových zbytků, a tudíž zřejmě i struktura dvou DPBB domén, je zatím to jediné, co spojuje všechny známé i předpokládané členy rodiny *two-barrel* RNA polymeráz (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Hlavně díky výraznému DxDxD motivu DPBB  $\beta'$  podjednotky byla nalezena sekvenční podobnost mezi vícepodjednotkovými RNAP a buněčnými RNA dependentními RNA polymerázami (RdRP) eukaryot fungujícími v RNA interferenci (IYER *et al.* 2003). Přítomnost obou DPBB domén v eukaryotických RdRP byla potvrzena získanou strukturou RdRP QDE-1 houby *Neurospora crassa*, kde se DPBB  $\beta$  i  $\beta'$  podjednotky vyskytuje v rámci jednoho polypeptidu (SALGADO *et al.* 2006).



**Obrázek 1:** Struktura katalytického centra tvořeného dvěma interagujícími DPBB doménami  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky.  $\beta$ -listy DPBB domény  $\beta'$  podjednotky vyznačeny červeně.  $\beta$ -listy DPBB domény  $\beta$  podjednotky vyznačeny modře. Tři konzervované aspartáty DxDxD motivu  $\beta'$  podjednotky, stejně jako dva konzervované lysiny  $\beta$  podjednotky jsou vyobrazeny prostorovým rozložením svých atomů. Žlutě vyznačen hořečnatý iont Mg-A. Založeno na PDB ID: 1IW7. Upraveno podle (IYER *et al.* 2003).

Geny pro buněčné RNA dependentní RNA polymerázy se nacházejí v jedné nebo více kopiích u celé řady eukaryot od jednoduchých prvoků po mnohobuněčné organismy, čítající houby, rostliny i živočichy (AHLQUIST 2002). Předpokládá se, že „původní“ RdRP mohla být kódována v genomu společného předka všech dnešních eukaryot, i když gen pro RdRP není přítomen u hmyzu, obratlovců a některých kvasinek (IYER *et al.* 2003). Buněčné RdRP mají DPBB doménu odpovídající DPBB  $\beta$  podjednotce na svém N-konci a DPBB doménu odpovídající DPBB  $\beta'$  podjednotce na svém C-konci (SALGADO *et al.* 2006). Podobné fúzní uspořádání DPBB domén ve stejném pořadí do jednoho proteinu můžeme nalézt i u některých vícepodjednotkových DNA dependentních RNAP.

Bioinformatickou analýzou byly nalezeny vzdálené homology buněčných RdRP u bakteriofágů vložených v genomech bakterií *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens*, které dostaly označení *YonO-like* proteiny, a to díky prvnímu objevenému proteinu YonO bakteriofága SP $\beta$ c2 bakterie *Bacillus subtilis* (IYER *et al.* 2003). V dnešní době je známo okolo padesáti proteinů tohoto typu kódovaných různými fágy bakterií kmene *Firmicutes*, genomy bakterií kmenů *Firmicutes*, *Cyanobacteria* a *Bacteroidetes* (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Všechny *YonO-like* proteiny jsou příbuzné buněčným RdRP polymerázám a mají výše zmíněných osm konzervovaných aminokyselin charakteristických pro dva DPBB motivy, což je ovšem prozatím jediný shodný znak zjištěný mezi nimi (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Polymerační aktivita *YonO-like* proteinů zatím nebyla prokázána a o jejich možné biologické roli se nic neví, neboť prokaryota nedisponují stejnou dráhou umlčování genů pomocí RNA jako eukaryota. Na základě analýzy okolí genů *YonO-like* proteinů se zdá, že většina těchto genů je součástí sobeckých mobilních genetických elementů. Role *YonO-like* proteinů by mohla spočívat v syntéze RNA primeru pro replikaci těchto elementů (IYER a ARAVIND 2012). Homology buněčných RdRP zatím nebyly objeveny u *Archaea* (IYER *et al.* 2003), což může být způsobeno menším množstvím dostupných sekvencí genomů těchto organismů, stejně jako nedostupností sekvencí jejich virů.

Předpokládá se, že DPBB domény  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky mohou mít shodný původ, který pravděpodobně sahá až do RNA světa (IYER *et al.* 2003). Původně mohly být DPBB součástí homodimerního RNA vazebného proteinu, který sloužil jako proteinový kofaktor ribozymu katalyzujícího polymeraci RNA. Homodimer se posléze vyvinul v heterodimer získáním výše zmíněných osmi aminokyselinových zbytků, katalytická aktivita se přenesla na protein a závislost na templátu se změnila z RNA na DNA (IYER *et al.* 2003). Vícepodjednotkové RNAP jsou stále schopny za výjimečných podmínek využít RNA jako templát, například při replikaci viroidů (RACKWITZ *et al.* 1981). Detailnější popis anatomie vícepodjednotkových RNA polymeráz bude podán v následujících podkapitolách.



## 2.1.1 Kanonické vícepodjednotkové DNA dependentní RNA polymerázy

Heterodimerní protein obsahující DPBB domény  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky se získáním dalších domén a podjednotek vyvinul ve vícepodjednotkové RNA polymerázy, tak jak je známe dnes (IYER *et al.* 2003). Transkripce všech dnešních buněčných organismů je zajišťována RNAP s minimálně pěti podjednotkami, které dohromady tvoří přibližně 400-500 kDa velké katalytické jádro enzymu, jehož struktura i funkce je evolučně konzervována (ZHANG *et al.* 1999; CRAMER *et al.* 2001; HIRATA *et al.* 2008).

### 2.1.1.1 RNA polymerázy bakterií a plastidů

Bakteriální RNA polymeráza (bRNAP) se skládá z velkých podjednotek  $\beta$  a  $\beta'$ , dimeru podjednotky  $\alpha$  a podjednotky  $\omega$ . Detailní struktura bRNAP je kromě bakterií rodu *Thermus* od letošního roku známa také pro bRNAP *E. coli* (MURAKAMI 2013). Většina bakterií má jeden gen pro každou z podjednotek RNAP, ale existují jisté výjimky. U některých  $\epsilon$ -proteobakterií rodu *Helicobacter* a *Wolinella*, stejně jako u  $\gamma$ -proteobakterií rodu *Wolbachia* došlo, patrně nezávisle na sobě, k fúzi  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek (LANE a DARST 2010a). Protože geny  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek u většiny bakterií leží v genomu v těsné blízkosti a jsou přepisovány jako jeden polycistronní transkript, bylo navrženo, že fúze  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek vznikla mutací s posunem čtecího rámce a vzniklý fúzní protein zvyšuje *fitness* těchto patogenních a parazitických bakterií (DAILIDIENE *et al.* 2007). Uměle vytvořený fúzní protein  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky bRNAP *E. coli* se uspořádává do funkční RNA polymerázy *in vivo* i *in vitro* (SEVERINOV *et al.* 1997). Bakterie rodu *Francisella* kódují dvě různé  $\alpha$  podjednotky –  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ , a jejich bRNAP zřejmě převážně obsahují orientovaně umístěný heterodimer  $\alpha_1\alpha_2$ , menší frakce bRNAP možná obsahuje homodimer  $\alpha_1\alpha_1$  (MUKHAMEDYAROV *et al.* 2011). U bakterií kmene *Chloroflexi* a některých symbiotických a parazitických bakterií s degenerovaným genomem zatím nebyla detekována  $\omega$  podjednotka (IYER a ARAVIND 2012). RNA polymeráza grampozitivních bakterií navíc obsahuje druhou  $\omega$  podjednotku a podjednotku  $\delta$  (ACHBERGER a WHITELEY 1980). Tato druhá  $\omega$  podjednotka není sekvenčně podobná evolučně konzervované „klasické“  $\omega$  podjednotce a neváže se v rámci bRNAP na stejné místo (DOHERTY *et al.* 2010). *In vitro* experimenty naznačují, že  $\delta$  podjednotka hraje roli ve specifitě transkripce a recyklaci RNAP (LÓPEZ DE SARO *et al.* 1999). Ačkoliv je delta podjednotka neesenční, má pozitivní vliv na *fitness* buněk (RABATINOVÁ *et al.* 2013).

Podjednotky  $\alpha$  jádra enzymu dimerizují přes svoje N-koncové domény a interagují s velkými podjednotkami RNAP, přičemž jedna  $\alpha$  podjednotka ( $\alpha I$ ) utváří kontakty převážně s DPBB  $\beta$  podjednotky a druhá  $\alpha$  podjednotka ( $\alpha II$ ) utváří kontakty převážně s  $\beta'$  podjednotkou (ZHANG *et al.* 1999). Ačkoliv  $\alpha$  podjednotky nepřispívají přímo ke katalytické aktivitě, jsou

potřebné pro uspořádání jádra enzymu z jednotlivých podjednotek a iniciaci a elongaci transkripce. Podjednotka  $\omega$  interaguje s DPBB doménou  $\beta'$  podjednotky a dalšími doménami  $\beta'$  podjednotky, dimerem  $\alpha$  podjednotek a  $\sigma$  faktorem (VASSYLYEV *et al.* 2002). U bRNAP byla prokázána role  $\omega$  podjednotky v zabránění agregace  $\beta'$  podjednotky. Tím  $\omega$  podjednotka napomáhá uspořádání  $\beta'$  podjednotky do jádra enzymu (MATHEW a CHATTERJI 2006). Podobnou roli by mohly mít orthology  $\omega$  podjednotky i u eukaryot a *Archaea*. Pouze u bakterií je  $\omega$  podjednotka navíc cílem stringentní odpovědi, neboť zprostředkovává citlivost bRNAP ke guanosintetrafosfátu a guanosinpentafosfátu. Podjednotka  $\omega$  je partnerně schopna tyto metabolity vázat (MATHEW a CHATTERJI 2006).  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky jsou největší podjednotky RNAP, každá má základní velikost okolo 1000 aminokyselin. Do této velikosti narostl původní heterodimerní protein obsahující DPBB  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky získáním dalších domén po stranách DPBB domény a insertů v rámci DPBB motivu, které se staly evolučně konzervovanými (IYER *et al.* 2003). Kromě toho  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky získaly inserty specifické pro jednotlivé bakteriální linie a linie eukaryot a *Archaea*, které mohou značně zvětšovat celkovou velikost těchto proteinů a které jsou v dnešní době, alespoň u bRNAP, poměrně dobře zmapované (LANE a DARST 2010a; IYER a ARAVIND 2012). U bakterií byla nejmenší kombinovaná velikost  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky detekována u některých bakterií kmene *Firmicutes*, třídy *Clostridia* s velikostí přibližně 2250 aminokyselin; největší kombinovaná velikost  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky byla detekována u bakterií kmene *Nitrospirae* s maximální velikostí 3300 aminokyselin (LANE a DARST 2010a). Inserty bRNAP specifické pro jednotlivé bakteriální linie se v naprosté většině případů nachází na vnějším povrchu RNA polymerázy a pravděpodobně mají roli ve zprostředkování interakcí s transkripčními regulátory (LANE a DARST 2010a). Orthology podjednotek  $\beta$ ,  $\beta'$  a  $\alpha$  bakteriální RNAP a faktoru  $\sigma^{70}$  jsou kódovány mitochondriálními genomy prvoků čeledi *Jakobidae* a *Malamimonanidae* (LANG *et al.* 1997; GRAY *et al.* 2004). Genomy mitochondrií všech ostatních eukaryot jsou pravděpodobně přepisovány jaderně kódovanou jednopodjednotkovou RNA polymerázou.

Plastidová RNA polymeráza (pRNAP) je uspořádána podobně jako bakteriální RNA polymeráza většiny bakterií kmene *Cyanobacteria*. Obsahuje podjednotky  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta'$  a dvě podjednotky  $\alpha$  (bRNAP u *Cyanobacteria* obsahuje ještě  $\omega$  podjednotku). Bylo zjištěno, že  $\gamma$  a  $\beta'$  podjednotky těchto RNAP odpovídají N- a C-terminální části  $\beta'$  podjednotky ostatních bakteriálních RNAP a mají stejný původ (BERGSLAND a HASELKORN 1991). Podjednotky pRNAP jsou kódovány plastidovým genomem,  $\sigma$ -faktory jsou kódovány jaderně (HAJDUKIEWICZ *et al.* 1997). Plastidy vyšších fotosyntetických rostlin obsahují ještě druhou, jaderně kódovanou jednopodjednotkovou RNAP. Většina plastidových genů je přepisována oběma typy RNA polymeráz, nicméně některé takzvané *housekeeping* geny a geny pro  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\beta'$

podjednotku pRNAP jsou přepisovány pouze jednopodjednotkovou RNAP, zatímco některé fotosyntetické geny jsou přepisovány pouze pRNAP (HAJDUKIEWICZ *et al.* 1997). Kromě organel je pRNAP kódována ještě kruhovými DNA plasmidy parazitických prvků rodu *Plasmodium* a *Toxoplasma* (HOWE 1992; KOHLER *et al.* 1997).

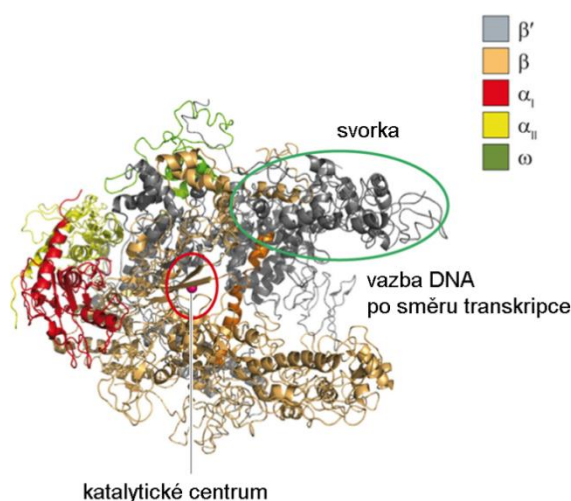
### 2.1.1.2 RNA polymerázy eukaryot a *Archaea*

Jaderné eukaryotické RNA polymerázy (eRNAP) jsou v buňkách zastoupeny minimálně třemi třídami: eRNAP I přepisuje geny ribozomální RNA, eRNAP II vykonává syntézu mediátorové RNA a podmnožiny malých nekódujících RNA, eRNAP III syntetizuje transferovou RNA, 5S RNA a většinu malých nekódujících RNA. Eukaryotické RNA polymerázy se skládají z 12 podjednotek, i když pro eRNAP I a eRNAP III se dříve v literatuře uváděl údaj 14 a 17 podjednotek (tyto další podjednotky eRNAP I a III jsou dnes často chápány spíše jako transkripční faktory), a obsahují vždy pět podjednotek orthologních s podjednotkami jádra enzymu bRNAP (MINAKHIN *et al.* 2001; REAM *et al.* 2009). Zbylé podjednotky eRNAP mimo jádro enzymu jsou označovány jako přídatné podjednotky. Některé z nich mohou být sdílené všemi třídami eukaryotických RNAP. Přítomnost většiny těchto přídatných podjednotek eRNAP je nutná pro životaschopnost buněk, ale nemá přímý vliv na katalytickou aktivitu enzymu (WERNER a GROHMANN 2011). Umístění některých přídatných podjednotek eRNAP II vzhledem k jádru enzymu viz Obrázek 2. Přídatné podjednotky mohou zprostředkovat interakce mezi jinými podjednotkami RNAP, mezi transkripčními faktory a RNAP, interagovat s DNA templátem nebo interagovat se vznikající molekulou RNA. Geny pro eRNAP IV byly zatím nalezeny u vyšších rostlin *Embryobionta* a zelených řas řádu *Charales*, geny pro eRNAP V byly nalezeny pouze u krytosemenných rostlin *Magnoliophyta* (LUO a HALL 2007; MARCUSSEN *et al.* 2010). RNA polymerázy IV a V jsou odvozené od eRNAP II a mají roli v umlčování genů. Eukaryotická RNAP IV je potřebná pro biogenezi malých interferujících RNA a transkripty eRNAP V jsou potřebné pro cílenou tvorbu heterochromatinu pomocí malých interferujících RNA (REAM *et al.* 2009; HAAG a PIKAARD 2011). Aktivita eRNAP IV a eRNAP V *in vitro* nebyla navzdory několika pokusům ještě prokázána, nicméně místně specifickou mutagenezí tří konzervovaných aspartátových zbytků DPBB domény  $\beta'$  podjednotky<sup>1</sup> eRNAP IV a V, a konzervovaného aspartátového zbytku DPBB domény  $\beta$  podjednotky společné pro eRNAP IV a V, bylo docíleno narušení biologických funkcí těchto eRNAP *in vivo* (HAAG *et al.* 2009).

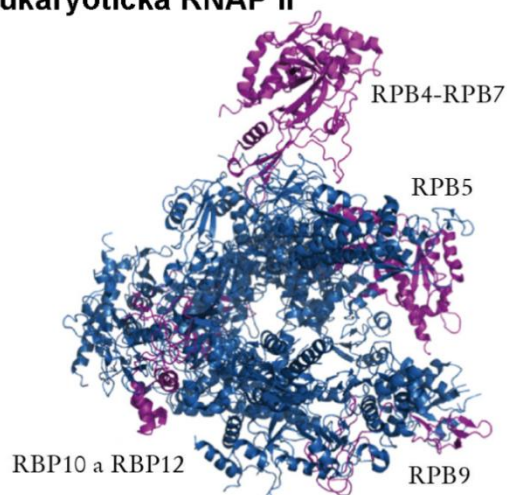
---

<sup>1</sup> Pro specifické názvosloví podjednotek RNA polymeráz eukaryot a *Archaea* viz Tabulka 1.

### a) bakteriální RNAP



### b) eukaryotická RNAP II



**Obrázek 2:** Pohled na struktury vícepodjednotkových RNA polymeráz shora – prostorová orientace definována podle (CRAMER *et al.* 2000): **a)** Bakteriální RNA polymeráza *Thermus aquaticus* (PDB ID: 1I6V). Jednotlivé podjednotky barevně odlišeny viz legenda u obrázku. Hořečnatý iont Mg-A vyznačen růžově, mostový helix  $\beta'$  podjednotky vyznačen oranžově. **b)** Eukaryotická RNA polymeráza II *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 1NT9). Modře vybarveno pět podjednotek konzervovaného jádra enzymu. Přídavné podjednotky vybarveny fialově. Podjednotky Rpb4 a Rpb7 tvoří nápadný stoněk. Umístění podjednotky Rpb8 není z tohoto úhlu pohledu patrné. Upraveno podle (WERNER a GROHMANN 2011).

Bakterie bRNAP	Archaea aRNAP	Eukaryota				
		eRNAP I	eRNAP II	eRNAP III	eRNAP IV	eRNAP V
$\beta'$	A' (Rpo1N) + A" (Rpo1C) *	Rpa190	Rpb1	Rpc160	NRPD1	NRPE1
$\beta$	B (Rpo2) °	Rpa135	Rpb2	Rpc128	NRPD/E2	NRPD/E2
$\alpha I$	D (Rpo3)	Rpc40	Rpb3	Rpc40	Rpb3 [1]	Rpb3 [1]
$\alpha II$	L (Rpo11)	Rpc19	Rpb11	Rpc19	Rpb11	Rpb11
$\omega$	K (Rpo6)	Rpb6	Rpb6	Rpb6	Rpb6 [1]	Rpb6 [1]
	H (Rpo5)	Rpb5	Rpb5	Rpb5	Rpb5 [3]	NRPE5
	G (Rpo8) §	Rpb8	Rpb8	Rpb8	Rpb8 [1]	Rpb8 [1]
	N (Rpo10)	Rpb10	Rpb10	Rpb10	Rpb10	Rpb10
	P (Rpo12)	Rpb12	Rpb12	Rpb12	Rpb12	Rpb12
	F (Rpo4)	Rpa14	Rpb4	Rpc17	NRPD/E4	NRPD/E4
	E (Rpo7)	Rpa43	Rpb7	Rpc25	NRPD7 [1]	NRPE7
		Rpa12	Rpb9	Rpc11	NRPD9b	Rpb9
	Rpo13 §					

**Tabulka 1:** Podjednotky RNA polymeráz buněčných organismů. V řádcích jsou uvedeny názvy orthologních podjednotek. Čárou jsou odděleny přídavné podjednotky. V kulatých závorkách uvedeny alternativní názvy. Čísla v hranatých závorkách udávají počet orthologních genů pro danou podjednotku u eRNAP IV a eRNAP V. \* U některých *Archaea* jsou tyto podjednotky spojeny v jednu. ° U některých *Archaea* je tato podjednotka rozdělena na dvě. § Podjednotky nalezené pouze u některých *Archaea*. Upraveno podle (KWAPISZ *et al.* 2008; WERNER a GROHMANN 2011).

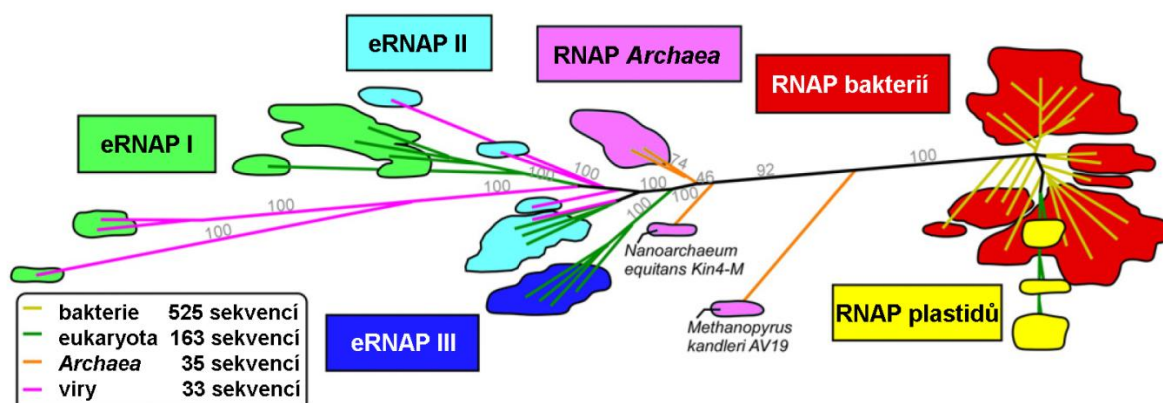
Nejnápadnější strukturální rozdíl mezi RNA polymerázou bakterií a eukaryot je přítomnost heterodimeru podjednotek Rpb4 a Rpb7<sup>2</sup> a jejich orthologů, který tvoří takzvaný stonek (v originále *stalk* viz Obrázek 2). Tento heterodimer je schopen vázat jednovláknovou DNA i RNA. Navíc může stonek od RNAP disociovat, což činilo problémy při prvních krystalizacích eRNAP II *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), takže první krystalografické struktury tyto podjednotky neobsahovaly (CRAMER *et al.* 2000). Bylo ukázáno, že heterodimer podjednotek Rpb4 a Rpb7 má roli ve všech fázích transkripce a jeho funkce sahá dokonce za její hranice. Například má roli v exportu a degradaci mRNA, při opravách DNA a při translaci [pro přehled viz (SHARMA a KUMARI 2012)]. Přídavné podjednotky Rpb10 a Rpb12 tvoří stabilní komplex a asociují s dvěma podjednotkami orthologními k homodimeru  $\alpha$  podjednotek bRNAP, přičemž jejich hlavní role je zřejmě v uspořádávání a stabilitě RNAP (WERNER *et al.* 2000). Přídavná podjednotka Rpb5 interaguje s C-koncem podjednotek orthologních k  $\beta'$  podjednotce, může interagovat s DNA po směru transkripce a interaguje s některými transkripčními faktory (ZAROS *et al.* 2007). Přídavná podjednotka Rpb8 interaguje převážně s podjednotkami orthologními k  $\beta'$  podjednotce poblíž sekundárního kanálu a je schopná vazby jednovláknové DNA *in vitro* (KANG *et al.* 2006). Přídavná podjednotka Rpb9 interaguje s orthology  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek. Její role je v regulaci přesnosti transkripce a interakci s transkripčními faktory (WALMACQ *et al.* 2009). Bylo zjištěno, že orthology Rpb9 u eRNAP III, a velmi pravděpodobně i u eRNAP I, jsou zodpovědné za výraznější vnitřní nukleolytickou aktivitu těchto polymeráz oproti eRNAP II. Ortholog podjednotky Rpb9 eRNAP III má C-terminální doménu, která může zasahovat skrz sekundární kanál do aktivního centra a stimulovat štěpení vznikajícího transkriptu RNA. U Rpb9 eRNAP II je tato doména přítomna na jiném proteinu – difuzibilním transkripčním faktoru TFIIS (RUAN *et al.* 2011).

*Archaea* přepisují svoje geny pouze jedinou RNA polymerázou (aRNAP), která je strukturálně podobná eukaryotickým RNA polymerázám (HIRATA *et al.* 2008). Dostupné jsou krystalografické struktury aRNAP druhů *Sulfolobus shibatae* a *Sulfolobus solfataricus* z kmene *Crenarchaeota*. RNA polymeráza *Archaea* obsahuje v závislosti na druhu 10 až 13 podjednotek, které jsou až na jednu výjimku orthologní k 12 podjednotkám eRNAP. Kromě zástupců kmenů *Nanoarchaeota* a *Thaumarchaeota* mají všechny *Archaea* rozdělený ortholog  $\beta'$  podjednotky na dvě části (KWAPISZ *et al.* 2008), toto rozdělení je ale v jiném místě než rozdělení  $\beta'$  podjednotky u pRNAP a bRNAP u *Cyanobacteria*. Většina zástupců kmene *Euryarchaeota* má rozdělený i ortholog  $\beta$  podjednotky (KWAPISZ *et al.* 2008). Rozdělení  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek na více částí nemá vliv na funkci a strukturu těchto podjednotek, což bylo ukázáno rozdělením  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky bakteriální RNAP v místech, kde se tato rozdělení nachází u aRNAP, a dále arteficiálním

---

<sup>2</sup> Pro přídavné podjednotky jsou v této práci použity názvy podjednotek eRNAP II *Saccharomyces cerevisiae*.

spojením rozdělených orthologů  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky aRNAP (SEVERINOV *et al.* 1996; WERNER a GROHMANN 2011). Zřejmě pouze zástupci kmenů *Crenarchaeota* a *Korarchaeota* mají orthology Rpb8 podjednotky (KOONIN *et al.* 2007). *Archaea* obsahují i protein homologní k orthologům Rpb9 podjednotky eRNAP I a III, tj. protein se stejným doménovým složením, jehož C-koncová doména je schopná stimulovat štěpení vznikajícího transkriptu aRNAP (RUAN *et al.* 2011). Tento protein však není přímou součástí RNA polymerázy. Díky některým jeho vlastnostem podobným eukaryotickému transkripčnímu faktoru TFIIS dostal název TFS (HAUSNER *et al.* 2000). Některé druhy z kmene *Crenarchaeota* a *Korarchaeota* obsahují podjednotku Rpo13, která se pravděpodobně nachází výlučně u *Archaea*. Tato podjednotka interaguje s orthologem  $\beta'$  podjednotky a Rpb5 podjednotky, svým C-koncem dokáže vázat dvouvláknovou DNA nezávisle na její sekvenci. Role této podjednotky bude zřejmě ve stabilizaci komplexu RNA polymerázy s DNA (WOJTAS *et al.* 2012). Další specialitou dosud krystalizovaných aRNAP je přítomnost železo-sírného komplexu v orthologu  $\alpha$ I podjednotky, který by mohl hrát roli v uspořádání enzymu (HIRATA *et al.* 2008). Sekvenční, strukturní i funkční podobnost mezi aRNAP a eukaryotickými RNA polymerázami vedla k domněnce, že předek, z něhož se eRNAP vyvinuly, nápadně připomínal dnešní aRNAP zástupců kmene *Crenarchaeota* (KWAPISZ *et al.* 2008; WERNER 2008). Pro fylogenetickou příbuznost velkého množství vícepodjednotkových RNA polymeráz různých organismů a nukleocytoplasmatických virů podle aminokyselinových sekvencí konzervovaných domén jejich katalytických podjednotek viz Obrázek 3.



**Obrázek 3:** Fylogenetický strom příbuznosti aminokyselinových sekvencí katalytických podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNA polymeráz. Strom vznikl na základě sloučení sekvencí  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek od stejného druhu a následného porovnání všech sekvencí pouze podle sekvence konzervovaných oblastí. Díky velkému počtu sekvencí jsou ukázány pouze okraje každé skupiny listů stromu a barevně vybarveny podle tříd: bRNAP červeně, pRNAP žlutě, eRNAP I zeleně, eRNAP II tyrkysově, eRNAP III modře, aRNAP fialově. Větve každého listu jsou vybarveny podle taxonomie: bakterie žlutě, eukaryota zeleně, *Archaea* oranžově, nukleocytoplasmatické viry fialově. Šedá čísla značí hodnoty podporující dané větve. Černá čísla značí počet nenadbytečných sekvencí konzervovaných oblastí použitých pro srovnání a následnou tvorbu stromu. Upraveno podle (LANE a DARST 2010a).

### 2.1.1.3 RNA polymerázy nukleocytoplasmatických virů

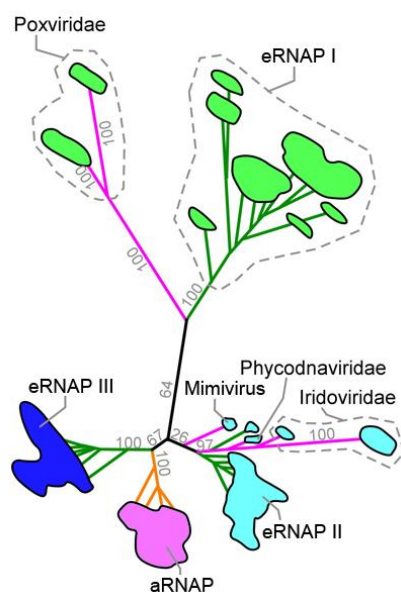
Další kanonické vícepodjednotkové RNA polymerázy se nacházejí u nukleocytoplasmatických velkých dvouvláknových DNA virů. Jedná se o skupinu monofyletických eukaryotických virů s velkými genomy, které infikují širokou škálu hostitelů. Protože ne všechny viry této skupiny splňují kritérium vyplývající z názvu, jako například viry čeledi *Poxviridae*, které jsou po celou část životního cyklu v buňce pouze v cytoplasmě, byl nově navržen název *Megavirales* pro řád, který by všechny tyto viry zahrnoval (COLSON *et al.* 2012). Do tohoto řádu patří čeledi *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Mimiviridae*, *Phycodnaviridae*, *Iridoviridae* (nyní děleny na *Iridoviridae* a *Ascoviridae*) a nově navržené čeledi *Marseilleviridae* a *Megaviridae* (ARSLAN *et al.* 2011; COLSON *et al.* 2013). Nukleocytoplasmatické viry všech čeledí kódují virovou RNA polymerázu (vRNAP) obsahující minimálně tři podjednotky orthologní k  $\beta$  podjednotce,  $\beta'$  podjednotce a Rpb5 podjednotce. Geny pro vRNAP byly patrně získány z genů kódujících eRNAP ancestrálních eukaryotických hostitelů těchto virů, přičemž původní vRNAP zřejmě obsahovala ještě ortholog Rpb10 podjednotky (IYER *et al.* 2006). Pro známé a predikované podjednotky vRNAP nukleocytoplasmatických virů viz Tabulka 2. Virová RNA polymeráza spolu s transkripčními faktory a dalšími enzymy metabolismu RNA, kódovanými virovým genomem, slouží k transkripci virových genů v cytoplasmatické části životního cyklu viru. Výjimku tvoří většina virů čeledi *Phycodnaviridae*, které ztratily geny kódující vRNAP a transkripcce jejich genů probíhá pouze v jaderné části jejich životního cyklu činností hostitelského transkripčního aparátu (IYER *et al.* 2006).

eRNAP II	Rpb1	Rpb2	Rpb3	Rpb11	Rpb6	Rpb5	Rpb8	Rpb10	Rpb12	Rpb4	Rpb7	Rpb9
<i>Poxviridae</i>	Rpo147	Rpo132			Rpo19	Rpo22		Rpo7			Rpo18	
<i>Asfarviridae</i>	+	+	+		+	+		+			+	
<i>Mimiviridae</i>	+	+	+	+	+	+		+				+
<i>Megaviridae</i>	+	+	+	+		+		+				
<i>Phycodnaviridae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Asco-/Iridoviridae</i>	+	+			+	+						
<i>Marseilleviridae</i>	+	+				+						

**Tabulka 2:** Podjednotky vRNAP nukleocytoplasmatických virů orthologické k podjednotkám eukaryotních RNAP. Ve sloupcích jsou uvedeny podjednotky orthologní k vyznačeným podjednotkám eRNAP II. Řádky udávají známé nebo predikované podjednotky nalezené alespoň u některých zástupců dané čeledi. Speciální názvosloví podjednotek vyvinuto pouze u *Poxviridae*, viru *Vaccinia*. Většinou pouze předpokládaná přítomnost podjednotek virů jiných čeledí je označena znaménkem +. Sestaveno podle (KNUTSON a BROYLES 2008; BOYER *et al.* 2009; RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010; ARSLAN *et al.* 2011; COLSON *et al.* 2011; HUANG *et al.* 2012; NISSIMOV *et al.* 2012; RODRÍGUEZ a SALAS 2013).

Nejvíce studovanou vRNAP je RNA polymeráza viru *Vaccinia*, která obsahuje 8 podjednotek, z nichž 6 podjednotek je orthologních k podjednotkám eRNAP a jedna

podjednotka je orthologní k eukaryotickému transkripčnímu faktoru TFIIS (KNUTSON a BROYLES 2008). Osmá podjednotka s názvem Rpo35 nevykazuje žádnou signifikantní podobnost se sekvencemi proteinů v dostupných databázích (KNUTSON a BROYLES 2008). Někdy bývá mezi podjednotku vRNAP viru *Vaccinia* řazen i protein Rap94, který je těsně spojený s vRNAP izolovanou z virionů a jeho přítomnost je nezbytná pro transkripci časných genů životního cyklu viru (AHN *et al.* 1994). RNA polymeráze viru *Vaccinia* chybí zjevné orthology  $\alpha$  podjednotek, což by značilo výraznou změnu v architektuře a uspořádání jádra enzymu. Zároveň se však nedá vyloučit, že roli těchto podjednotek zajišťuje podjednotka Rpo35 (KNUTSON a BROYLES 2008). Na základě srovnání aminokyselinových sekvencí konzervovaných domén orthologů  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek některých vRNAP, aRNAP a eRNAP I-III bylo pozorováno, že RNAP virů čeledi *Poxviridae* se jeví fylogeneticky příbuznější eRNAP I, zatímco RNAP virů čeledi *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* a *Iridoviridae* se jeví příbuznější eRNAP II, viz Obrázek 4 (LANE a DARST 2010a). Navzdory zjevné monofylii nukleocytoplasmatických virů jsou vzájemné příbuzenské vztahy mezi jednotlivými čeledmi dosti komplikovanou záležitostí (YUTIN a KOONIN 2012). Ukázalo se, že z 50 genů, které byly považovány za monofyletické a tudíž přítomné ve společném předkovi všech nukleocytoplasmatických virů jich většina měla složitou evoluční historii (YUTIN a KOONIN 2012). Zdá se, že ortholog  $\beta'$  podjednotky vRNAP má původ v eRNAP I, přičemž někdy blíže v historii byl tento gen nahrazen genem pro příslušnou podjednotku eRNAP II u *Mimiviridae* a eRNAP I u *Asfarviridae* (YUTIN a KOONIN 2012). Jaký byl původ prvotního orthologu  $\beta$  podjednotky vRNAP se neví, ale *Poxviridae* a *Asfarviridae* mají tuto podjednotku nejpodobnější eRNAP I, u zbylých čeledí je tato podjednotka nejpodobnější eRNAP II. U *Mimiviridae* byl pravděpodobně tento gen někdy blíže v historii nahrazen genem pro příslušnou podjednotku eRNAP II (YUTIN a KOONIN 2012).



**Obrázek 4:** Fylogenetický strom příbuznosti aminokyselinových sekvencí katalytických podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNA polymeráz. Strom vznikl na základě sloučení sekvencí  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek od stejného druhu a následného srovnání všech sekvencí pouze podle sekvencně konzervovaných oblastí. Díky velkému počtu sekvencí jsou ukázány pouze okraje každé skupiny listů stromu a barevně vybarveny podle tříd: eRNAP I zeleně, eRNAP II tyrkysově, eRNAP III modře, aRNAP fialově. Větve každého listu jsou vybarveny podle taxonomie: eukaryota zeleně, *Archaea* oranžově, nukleocytoplasmatické viry fialově. Šedá čísla značí hodnoty podporující dané větve. Upraveno podle (LANE a DARST 2010a).

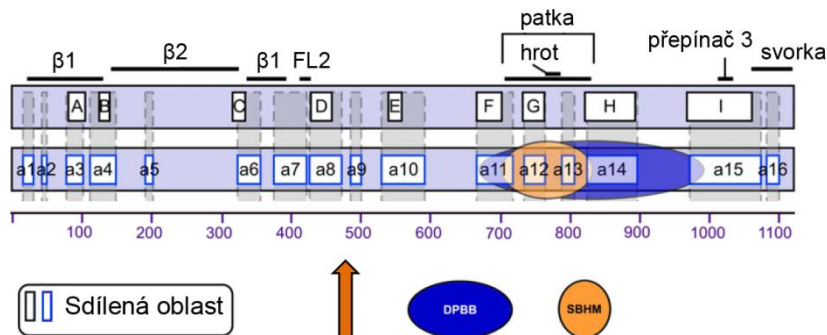


## 2.1.2 Konzervované oblasti kanonických vícepodjednotkových RNA polymeráz

Již v roce 1986 začalo být na základě analýzy aminokyselinových sekvencí orthologů  $\beta'$  podjednotek patrné, že RNAP bakterií, eukaryot a virů čeledi *Poxviridae* jsou statisticky významně podobné (BROYLES a MOSS 1986). Pilotními analýzami několika málo dostupných aminokyselinových sekvencí  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek v následujících letech byly určeny evolučně konzervované oblasti katalytických podjednotek. Pro  $\beta$  podjednotku a její orthology jsou to oblasti A-I, pro  $\beta'$  podjednotku a její orthology oblasti A-H (SWEETSER *et al.* 1987; JOKERST *et al.* 1989). Na základě recentních analýz s použitím víc jak tisíce sekvencí byly nalezeny některé dosud přehlížené konzervované oblasti, hranice některých známých konzervovaných oblastí byly rozšířeny a v jednom případě dokonce byla již definovaná konzervovaná oblast zrušena (LANE a DARST 2010a). Nové členění konzervovaných oblastí katalytických podjednotek všech kanonických vícepodjednotkových RNAP, přejaté v této práci, obsahuje oblasti  $\beta$ a1-a16 pro  $\beta$  podjednotku a její orthology a  $\beta'$ a1-a20 pro  $\beta'$  podjednotku a její orthology (LANE a DARST 2010a). Projekce konzervovaných oblastí na známou strukturu elongačního komplexu bRNAP *Thermus thermophilus* spolu se znalostmi funkce některých těchto oblastí at' už u bRNAP nebo eRNAP II přispěla k pochopení společných mechanismů katalytické aktivity a elongace vícepodjednotkových RNA polymeráz (LANE a DARST 2010b).

### 2.1.2.1 Konzervované oblasti $\beta$ podjednotky

Schematické znázornění konzervovaných oblastí  $\beta$  podjednotky je uvedeno na Obrázku 5. Podrobnější popis viz následující text.



**Obrázek 5:** Schematické zobrazení sdílených oblastí  $\beta$  podjednotek a jejich orthologů mezi všemi kanonickými vícepodjednotkovými RNA polymerázami. Původně definované oblasti podle (SWEETSER *et al.* 1987) zobrazeny v černých obdélnících. Nově definované oblasti podle (LANE a DARST 2010a) zobrazeny v modrých obdélnících. Číselná osa zobrazuje primární sekvenci bRNAP *Thermus thermophilus*. Nahoře vyznačeny důležité strukturální prvky. Oranžová šipka značí místo rozdělení na 2 podjednotky u některých *Archaea*. DPBB: *double-psi beta-barrel*, SBHM: *sandwich barrel hybrid motif*, FL2: vidličková smyčka 2. Upraveno podle (LANE a DARST 2010a).

#### 2.1.2.1.1 Konzervované oblasti $\beta$ a1-a7: domény $\beta$ 1 a $\beta$ 2

Oblasti  $\beta$ a1-a7 tvoří domény  $\beta$ 1 a  $\beta$ 2, které se u eRNAP II nazývají výčnělek a lalok (v originále *protrusion* a *lobe*) (LANE a DARST 2010b).  $\beta$ 1 doména kryje DNA:RNA hybridní molekulu v aktivním centru a  $\beta$ 2 doména kryje dvouvláknovou DNA po směru transkripce. Mezi těmito doménami se nachází kanál, kterým je vedeno netemplátové vlákno DNA během transkripce (LANE a DARST 2010b).  $\beta$ 2 doména se sekvenčně značně liší mezi bRNAP a eRNAP (LANE a DARST 2010b). U eRNAP II *S. cerevisiae* interaguje výčnělek s Rpb12 podjednotkou a lalok interaguje s Rpb9 podjednotkou (CRAMER *et al.* 2001).

#### 2.1.2.1.2 Konzervované oblasti $\beta$ a7-a9: vidličková smyčka 2

Oblast  $\beta$ a7 elongačního komplexu pojmá RNA transkript mezi pozicemi  $-3$  až  $-6$  (pozice  $+1$  je 3' koncový nukleotid RNA v katalytickém  $i+1$  místě pretranslokovaného elongačního komplexu, předchozí nukleotidy se číslují směrem k 5' konci vzrůstajícími zápornými čísly) (LANE a DARST 2010b). Inhibitory bRNAP rifamyciny interagují převážně s  $\beta$ a7 oblastí a stericky blokují cestu rostoucímu transkriptu (CAMPBELL *et al.* 2001). Vidličková smyčka 2 (FL2) je flexibilní smyčka se 14 aminokyselinovými zbytky tvořená částí  $\beta$ a7 a  $\beta$ a8

oblasti (LANE a DARST 2010b). Pouze bakteriální RNAP obsahují ve FL2 insert o čtyřech aminokyselinových zbytcích, které interagují s inhibítozem bRNAP streptolydiginem (VASSYLYEV *et al.* 2007b). Funkce FL2 je ve sterickém bránění průniku dvouvláknové DNA do aktivního místa polymerázy, čímž FL2 udržuje konstantní velikost transkripční bubliny po směru transkripce (VASSYLYEV *et al.* 2007a). Vidličková smyčka 2 (další synonyma jsou  *$\beta$ DloopI* nebo *streptolydigin-binding loop*) má také hlavní roli v alosterickém modelu translokace elongačního komplexu, kde tvoří pravděpodobné NTP vazebné alosterické místo  $i+2$  (HOLMES a ERIE 2003).

#### 2.1.2.1.3 Konzervované oblasti $\beta$ a10-a14: DPBB, katalytické centrum, patka

Oblasti  $\beta$ a10-a14 tvoří aktivní centrum a patku (v originále *flap*), oblast  $\beta$ a14 vytváří důležité interakce s  $\alpha$ I podjednotkou a jejími orthology (LANE a DARST 2010b). DPBB  $\beta$  podjednotky je rozdělen vloženými doménami na 3 části, přičemž 2  $\beta$ -listy se nachází v  $\beta$ a11 oblasti, 3  $\beta$ -listy se nachází v  $\beta$ a14 oblasti a 1  $\beta$ -list se nachází v  $\beta$ a15 oblasti (LANE a DARST 2010b). Hlavní doménou vloženou do DPBB je *sandwich barrel hybrid motif* tvořící patku (u eRNAP II označována jako zed'), což je flexibilní nezávislá doména, která tvoří jednu stěnu kanálu, kterým odchází vznikající RNA (VASSYLYEV *et al.* 2007a). Helix na hrotu patky (v originále *flap-tip helix*) je strukturní element mezi  $\beta$ a12 a  $\beta$ a13 oblastmi, který je specifický pouze pro bRNAP. Má roli v iniciaci i terminaci transkripce – může interagovat se  $\sigma$ -faktory i s RNA vlásenkou vznikajícího transkriptu (LANE a DARST 2010b). Oblasti  $\beta$ a10-a14 celkem obsahují 15 invariantních aminokyselinových zbytků. Některé z nich interagují se substrátem, DPBB motivem  $\beta'$  podjednotky a RNA transkriptem na mnoha pozicích (LANE a DARST 2010b).

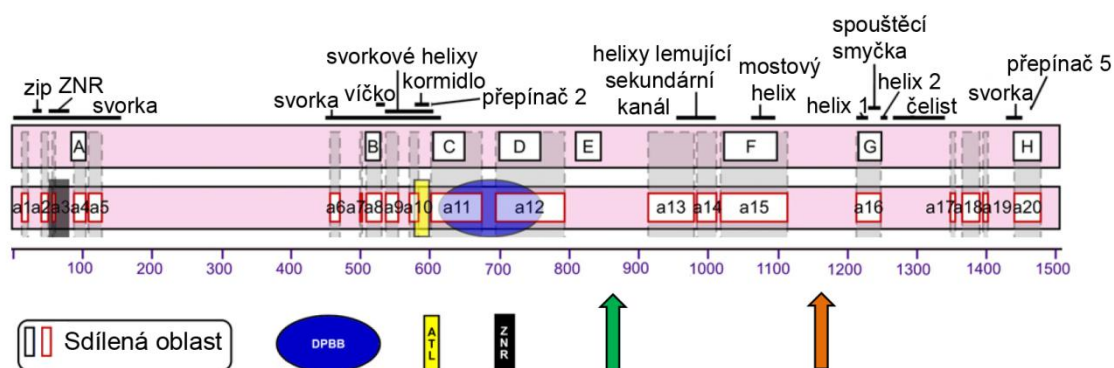
#### 2.1.2.1.4 Konzervované oblasti $\beta$ a15-a16: interakce s DNA:RNA hybridní molekulou, odchodný kanál RNA a svorka

Oblast  $\beta$ a15 začíná poblíž zadní části RNAP, kde se podílí na interakcích s  $\alpha$ I podjednotkou a jejími orthology a dále tvoří strukturní prvky za aktivním místem enzymu (LANE a DARST 2010b). Tato oblast obsahuje invariantní zbytky histidinu a lysinu, které míří směrem k DNA:RNA hybridní molekule a pravděpodobně interagují s RNA transkriptem (LANE a DARST 2010b). Oblast  $\beta$ a15 pak přechází na  $\beta'$  stranu enzymu, kde tvoří přepínač 3 (v originále *switch 3*), který tvoří odchodný kanál RNA a interaguje s první dislokovanou bází RNA v DNA:RNA hybridní molekule (VASSYLYEV *et al.* 2007a; LANE a DARST 2010b). Dále přepínač 3 lemuje cestu templátovému vláknu DNA v pozicích  $-3$  až  $-4$ . Oblast za přepínačem 3 ohraničuje cestu templátovému řetězci DNA v pozici  $-2$  a interaguje s templátovým vláknem DNA v pozici  $-1$  (LANE a DARST 2010b). Přepínačových domén je celkem 5, všechny byly

identifikovány na základě struktury prvního elongačního komplexu eRNAP II (GNATT *et al.* 2001). Obecně se jedná o domény, které zaujímaly v elongačním komplexu jinou konformaci než ve struktuře volné eRNAP II bez nukleových kyselin. Bylo navrženo, že zprostředkovávají konformační přepnutí enzymu, které signalizuje vstup enzymu do stabilní elongační fáze (GNATT *et al.* 2001). C-konec oblasti  $\beta$ a15 a oblast  $\beta$ a16 na  $\beta'$  straně enzymu vytváří četné interakce s  $\beta'$  podjednotkou a podílí se na tvorbě strukturního prvku svorky (LANE a DARST 2010b).

### 2.1.2.2 Konzervované oblasti $\beta'$ podjednotky

Schematické znázornění konzervovaných oblastí  $\beta'$  podjednotky je uvedeno na Obrázku 6. Podrobnější popis viz následující text.



**Obrázek 6:** Schematické zobrazení sdílených oblastí  $\beta'$  podjednotek a jejich orthologů mezi všemi kanonickými vícepodjednotkovými RNA polymerázami. Původně definované oblasti podle (JOKERST *et al.* 1989) zobrazeny v černých obdélnících. Nově definované oblasti podle (LANE a DARST 2010a) zobrazeny v červených obdélnících. Číselná osa zobrazuje primární sekvenci bRNAP *Thermus thermophilus*. Nahoře vyznačeny důležité strukturní prvky. Oranžová šipka značí místo rozdělení na 2 podjednotky u některých *Archaea*. Zelená šipka značí místo rozdělení na 2 podjednotky u bRNAP *Cyanobacteria* a plastidových RNAP. DPBB: *double-psi beta-barrel*, ALT: *AT-hook-like motif*, ZNR: *zinc ribbon*. Upraveno podle (LANE a DARST 2010a).

#### 2.1.2.2.1 Konzervované oblasti $\beta'$ a1-a6: svorka

Oblasti  $\beta'$ a1-a6 se podílí na tvorbě svorky (LANE a DARST 2010b). Struktura RNAP připomíná tvar krabích klepet a pohyblivá svorka (v originále *clamp*) tvoří většinu klepeta  $\beta'$  podjednotky, přičemž u bRNAP se svorka otáčí kolem pantu přibližně o 20°, a zaujímá tak otevřenou a uzavřenou konformaci (CHAKRABORTY *et al.* 2012). Volný enzym a enzym v časných stádiích iniciace transkripce má svorku otevřenou, zatímco katalýzy schopný iniciační komplex a elongační komplex má svorku uzavřenou (CHAKRABORTY *et al.* 2012). Rozplétání

DNA v iniciační fázi transkripce zřejmě spouští uzavření svorky, která pak přispívá ke stabilitě a procesivitě elongačních komplexů (CHAKRABORTY *et al.* 2012). Mezi oblastí  $\beta'a1-a2$  se nachází zip (v originále *zipper*), který není sekvenčně konzervovaný mezi všemi vícepodjednotkovými RNA polymerázami. Od jeho původně zamýšlené role v udržování délky transkripční bubliny proti směru transkripce se upouští (ANDRECKA *et al.* 2009; LANE a DARST 2010b). Jediným absolutně konzervovaným zbytkem těchto oblastí je cysteinový zbytek  $\beta'a3$  oblasti, který interaguje se zinečnatým iontem a je součástí zinkové stužky (v originále *zinc ribbon*). Ta je společným prvkem všech vícepodjednotkových RNA polymeráz (LANE a DARST 2010b).

#### 2.1.2.2.2 Konzervované oblasti $\beta'a7-a10$ : svorka, víčko, svorkové helixy

Oblasti  $\beta'a7-a10$  leží ve svorce a vytváří dva důležité strukturní prvky RNAP – víčko a svorkové helixy (LANE a DARST 2010b). Víčko (v originále *lid*) interaguje s patkou a uzavírá vznikající transkript na začátku odchodného kanálu RNA (LANE a DARST 2010b). Zdá se, že víčko funguje jako klín usnadňující dislokaci RNA z DNA:RNA hybridní molekuly a tím udržuje konstantní velikost DNA:RNA hybridu mezi sedmi až deseti páry bází (VASSYLYEV *et al.* 2007a). Víčková doména je nutná pro iniciaci transkripce u bRNAP a aRNAP, jak bylo zjištěno s použitím RNAP s delecí v této doméně (NARYSHKINA *et al.* 2006; NAJI *et al.* 2008). RNAP s deletovanou víčkovou doménou jsou nicméně schopné elongace a terminace, avšak při transkripci jednovláknových DNA templátů tvoří stabilní DNA:RNA hybridní molekuly (NARYSHKINA *et al.* 2006; NAJI *et al.* 2008). Na dvouvláknových DNA templátech podobný efekt pozorován nebyl, takže pro dislokaci RNA z DNA:RNA hybridní molekuly postačuje zpětné převinutí DNA proti směru transkripce (NAJI *et al.* 2008). Oblast  $\beta'a9$  a  $\beta'a10$  tvoří svorkové helixy (jinak také *coiled coil*), což jsou dva antiparalelní  $\alpha$ -helixy, které jsou u bRNAP hlavním místem vazby  $\sigma$ -faktoru (VASSYLYEV *et al.* 2002). Do druhého  $\alpha$ -helixu svorkových helixů je vloženo kormidlo (v originále *rudder*), což je doména interagující s templátovou DNA v pozici  $-9$  a  $-10$  v DNA:RNA hybridní molekule (LANE a DARST 2010b). Pokusy s bRNAP s deletovaným kormidlem zjistily defekty v iniciaci transkripce a méně stabilní elongační komplexy (KUZNEDELOV *et al.* 2002).

#### 2.1.2.2.3 Konzervované oblasti $\beta'a11-a12$ : přepínač 2, DPBB, katalytické centrum

Oblasti  $\beta'a11-a12$  obsahují všeobecně konzervované aminokyselinové zbytky, které interagují s templátovou DNA, transkriptem, substrátem, hořečnatými ionty Mg-A a Mg-B a konzervovanými zbytky  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky v blízkosti aktivního centra (LANE a DARST 2010b). Začátek oblasti  $\beta'a11$  tvoří přepínač 2, který obsahuje invariantní aminokyselinové zbytky

interagující s cukrfosfátovou páteří templátového vlákna DNA na pozicích +2, +1, -1 a -3 (LANE a DARST 2010b). Přepínač 2 je nutný pro elongaci, zřejmě díky jeho roli v napomáhání rozplétání dvouvláknové DNA (NAJI *et al.* 2008). Dále oblast  $\beta'a11$  pokračuje dvěma  $\beta$ -listy DPBB motivu a končí  $\alpha$ -helixem, jenž lemuje jednu stranu odchodného kanálu RNA (LANE a DARST 2010b). První polovina oblasti  $\beta'a12$  je tvořena hlavně zbývajícími čtyřmi  $\beta$ -listy DPBB motivu a obsahuje mnoho esenciálních konzervovaných aminokyselinových zbytků (LANE a DARST 2010b). Invariantní motiv *two-barrel* polymeráz DxDxD je u kanonických vícepodjednotkových RNA polymeráz součástí invariantního NADFDGD motivu a substituce jakéhokoliv aspartátového zbytku zruší všechny katalytické aktivity RNAP (SOSUNOV *et al.* 2005). C-koncová část oblasti  $\beta'a12$  tvoří část sekundárního kanálu. Oblast  $\beta'a12$  také interaguje s  $\omega$  podjednotkou a jejími orthology (LANE a DARST 2010b). Oblasti  $\beta'a11$ - $\beta'a12$  tvoří čtené interakce s oblastmi  $\beta'a11$  a  $\beta'a14$ - $\beta'a16$   $\beta$  podjednotky, přičemž společně tvoří centrální jádro katalytického centra (LANE a DARST 2010b).

#### 2.1.2.2.4 Konzervované oblasti $\beta'a13$ - $\beta'a14$ : helixy lemuující sekundární kanál

Oblast  $\beta'a13$  začíná  $\alpha$ -helixem, který přechází z  $\beta'$  na  $\beta$  stranu enzymu (LANE a DARST 2010b). Poslední helix oblasti  $\beta'a13$  a první helix oblasti  $\beta'a14$  se k sobě antiparalelně přikládají a tvoří helixy lemuující sekundární kanál (v originále *secondary-channel rim helices*) (LANE a DARST 2010b). Sekundární kanál, někdy nazývaný trychtýř (v originále *funnel*) nebo pór v případě eRNAP II, je 10-15 Å široký kanál poskytující přímou cestu do katalytického centra (CRAMER *et al.* 2001). Když se elongační komplex vrací, tj. když dochází k jeho reverzní translokaci, je 3' konec transkriptu vsunován právě do tohoto kanálu (WANG *et al.* 2009). Předpokládá se, že sekundárním kanálem přichází substrátový NTP (ZHANG *et al.* 1999). Tato teorie nachází oporu v krystalografických studiích, které identifikovaly takzvané vstupní místo nukleotidu (E místo) ve vnitřní části sekundárního kanálu, kam se může vázat NTP (KETTENBERGER *et al.* 2004; WESTOVER *et al.* 2004). Existuje i alternativní teorie, že NTP mohou vstupovat do aktivního centra hlavním kanálem (GONG *et al.* 2005). Dostupná data zatím nedovolují ani jednu z těchto teorií zavrhnout. Sekundární kanál poskytuje přístup do aktivního centra různým faktorům modifikujícím funkce RNA polymerázy, jako například faktorům podporujícím štěpení transkriptu – GreA a GreB u bakterií a TFIIS u eukaryot (SOSUNOVA *et al.* 2003; KETTENBERGER *et al.* 2004).

#### 2.1.2.2.5 Konzervované oblasti $\beta'a15$ - $\beta'a16$ : mostový helix, spouštěcí smyčka

V oblastech  $\beta'a15$ - $\beta'a16$  se nachází dva důležité strukturní prvky zvané mostový helix (v originále *bridge helix*) a spouštěcí smyčka (v originále *trigger loop*). N-koncová část oblasti  $\beta'a15$

tvoří jednu stěnu sekundárního kanálu, pokračuje strukturním prvkem za helixy lemujícími sekundární kanál. Dále tvoří dlouhý  $\alpha$ -helix, který vede příčně z  $\beta$  strany na  $\beta'$  stranu enzymu a přemostuje hlavní kanál, což dalo tomuto helixu název mostový helix (další synonymum je F-helix) (LANE a DARST 2010b). Mostový helix interaguje s dalšími dvěma  $\alpha$ -helixy – helixem 1 a 2 spouštěcí smyčky, čímž vzniká svazek tří helixů. Oblast  $\beta'a16$  tvoří helix 1 spouštěcí smyčky a pokračuje ve spouštěcí smyčce; střed této oblasti pomáhá utvářet sekundární kanál (LANE a DARST 2010b). Spouštěcí smyčka (synonymum je G-smyčka) je flexibilní smyčka mezi dvěma  $\alpha$ -helixy, která může zaujímat mnoho konformací. Za  $\beta'a16$  oblastí následuje nepřilíš sekvenčně konzervovaný helix 2 spouštěcí smyčky. Za ním se nachází čelistní doména (v originále *jaw*), která se strukturně liší mezi bRNAP a eRNAP (LANE a DARST 2010b). Čelistní doména interaguje s DNA po směru transkripce distálně od aktivního centra. Její delece u bRNAP *E. coli* má pleiotropní efekt na všechny fáze transkripce, ale neovlivňuje životaschopnost buněk (EDERTH *et al.* 2002). U eRNAP II je čelistní doména tvořena ještě podjednotkou Rpb5 (CRAMER *et al.* 2000). Mostový helix a spouštěcí smyčka se nachází v blízkosti aktivního centra a tvoří četné vzájemné interakce. Mostový helix interaguje s templátovým vláknem DNA v pozicích +2 a +1 a spouštěcí smyčka interaguje se substrátovým NTP (LANE a DARST 2010b). Mostový helix a spouštěcí smyčka mění svoje konformace s vazbou NTP. Jejich strukturní přestavby jsou nutné pro katalýzu, správné umístění substrátu, transkripční přesnost a translokaci (WANG *et al.* 2006; VASSYLYEV *et al.* 2007b; ZHANG *et al.* 2010; NEDIALKOV *et al.* 2013). Kromě elongace má spouštěcí smyčka roli i v iniciaci a terminaci transkripce aRNAP (FOUQUEAU *et al.* 2013). Struktura mostového helixu a spouštěcí smyčky se nachází i u buněčných RdRP (SALGADO *et al.* 2006). Mnoho aminokyselinových zbytků oblastí  $\beta'a15$ - $a16$  je zodpovědných za vazbu inhibitoru bRNAP streptolydiginu a vazbu inhibitoru  $\alpha$ -amanitinu u eRNAP II (TEMLIAKOV *et al.* 2005; BRUECKNER a CRAMER 2008).

#### **2.1.2.2.6 Konzervované oblasti $\beta'a17$ - $a20$ : svorka, přepínač 5**

Oblasti  $\beta'a17$ - $a19$  jsou spojeny aminokyselinovými úseky značně odlišnými mezi bRNAP a eRNAP. Tyto oblasti tvoří strukturní motiv, o jehož funkci není nic známo (LANE a DARST 2010b). Oblast  $\beta'a20$  zasahuje do svorky, pak z ní vystupuje a tvoří přepínač 5 sloužící jako pant, který zprostředkovává pohyb svorky (LANE a DARST 2010b). Většina oblastí  $\beta'a20$  tvoří interakce se svorkou v oblastech  $\beta'a15$ - $a16$  (LANE a DARST 2010b).

### 2.1.3 Nekanonické vícepodjednotkové DNA dependentní RNA polymerázy

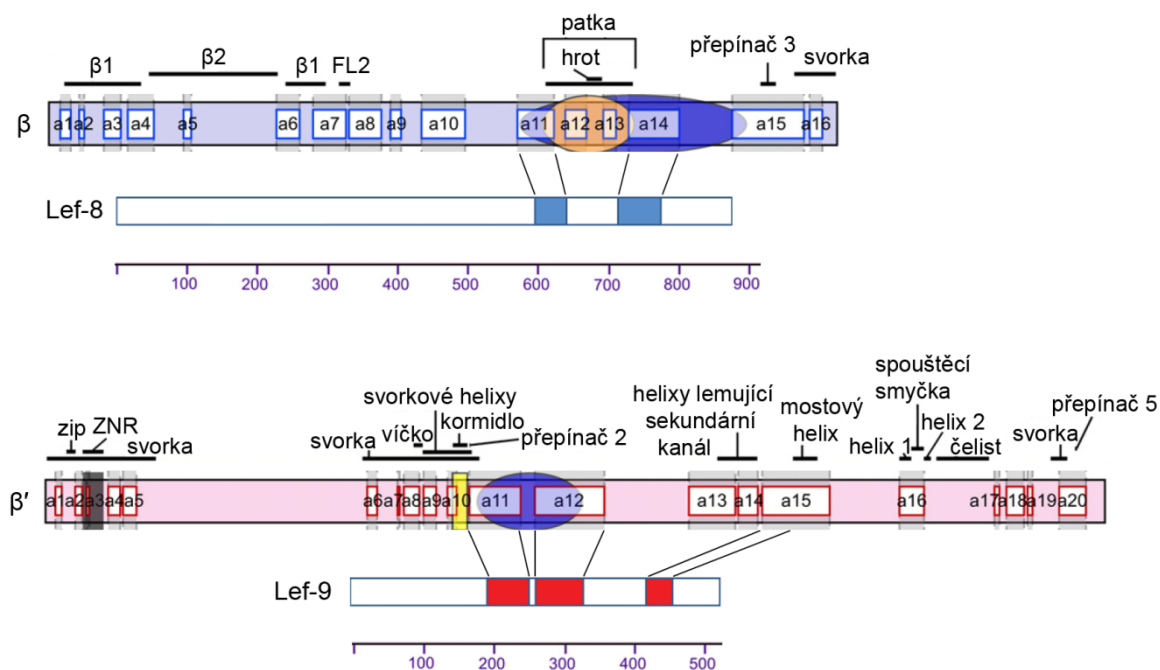
Kromě výše zmíněných kanonických vícepodjednotkových DNA dependentních RNAP ještě existují jiné DNA dependentní RNAP z rodiny *two-barrel* polymeráz, které se odlišují především nepřítomností nebo nezjistitelností některých konzervovaných oblastí katalytických podjednotek. Mimoto až na výjimky neobsahují další podjednotky jádra enzymu. Nově se pro tuto skupinu převážně *in silico* predikovaných RNA polymeráz zavedl název nekanonické DNA dependentní RNAP (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Eukaryotické RNA polymerázy IV a V jsou chápány jako kanonické RNAP, i když sekvenční podobnost jejich katalytických podjednotek s některými konzervovanými oblastmi katalytických podjednotek ostatních kanonických RNAP je menší. Například jejich oblast  $\beta'a16$ , tj. oblast helixu 1 spouštěcí smyčky a spouštěcí smyčky samotné, je sekvenčně značně odlišná (HAAG a PIKAARD 2011). Všechny dosud známé členy nekanonických DNA dependentních RNA polymeráz spojuje, kromě osmi evolučně konzervovaných aminokyselinových zbytků ve dvou DPBB motivech, ještě přítomnost tří bazických aminokyselinových zbytků. Konkrétně se jedná o lysin přepínače 2 oblasti  $\beta'a11$ , lysin sekundárního kanálu oblasti  $\beta'a15$  a arginin sekundárního kanálu oblasti  $\beta'a14$  (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Přepínač 2 je důležitý pro tvorbu transkripční bubliny; u eRNAP II s bodovými mutacemi v přepínači 2 docházelo k menší stabilitě DNA:RNA hybridní molekuly a zvýšené frekvenci abortivní transkripce (MAJOVSKI *et al.* 2005). Přítomnost sekundárního kanálu je pravděpodobně nutná pro vkládání NTP do aktivního centra (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Přepínač 2 a sekundární kanál nejsou přítomny u buněčných RdRP *two-barrel* rodiny, takže jsou pravděpodobně důležité pro transkripci DNA templátů (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010).

#### 2.1.3.1 RNA polymerázy virů *Baculoviridae*, *Nudiviridae* a *Hytrosaviridae*

Hmyzí DNA viry čeledi *Baculoviridae* replikující se v jádrech svých hostitelů kódují netradiční RNA polymerázu, která byla purifikována ve funkčním stavu (GUARINO *et al.* 1998). Tato polymeráza, obsahující podjednotky Lef-8, Lef-9, Lef-4 a p47, přepisuje pozdní a velmi pozdní geny virové exprese, zatímco geny časně fáze exprese jsou přepisovány hostitelskou eRNAP II (GUARINO *et al.* 1998). Podjednotka Lef-4 obsahuje první (5' RNA-trifosfatázovou) a druhou (mRNA-guanylyltransferázovou) aktivitu nezbytnou pro tvorbu čepičkové struktury na 5' koncích vznikajících transkriptů (GROSS a SHUMAN 1998). V predikované aminokyselinové sekvenci genu Lef-8 byla již dříve nalezena sekvenční podobnost s DPBB motivem  $\beta$  podjednotky RNAP a v predikované aminokyselinové sekvenci genu Lef-9 byla nalezena



sekvenční podobnost s DPBB motivem  $\beta'$  podjednotky RNAP (LU a MILLER 1994; PASSARELLI *et al.* 1994). O funkci podjednotky p47 se nic neví, ale údajně vykazuje velmi slabou sekvenční podobnost k  $\alpha$  podjednotce (ROHRMANN 2011). Sekvenční podobnost proteinu Lef-8 a Lef-9 k  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotce byla nedávno rozšířena na více konzervovaných oblastí. Předpokládá se, že původ těchto genů je v genech eRNAP ancestrálních hostitelů těchto virů (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Viry čeledi *Baculoviridae* také kódují protein homologní k TFIIS – Lef-5, který u nich funguje jako transkripční iniciační faktor (GUARINO *et al.* 2002). Viry čeledi *Nudiviridae*, jakožto sesterská skupina virů čeledi *Baculoviridae*, kódují homology všech čtyř výše zmíněných podjednotek RNAP (WANG *et al.* 2011). Zdá se, že u některých virů čeledi *Nudiviridae* je Lef-9 protein na svém C-konci fúzován s proteinem p47 (JEHLE *et al.* 2013). Další skupinou virů kódující stejný typ RNAP jsou viry způsobující hypertrofii slinných žláz některých much, pro které byl navrhnout taxonomický název *Hytrosaviridae* (JEHLE *et al.* 2013). U virů *Hytrosaviridae* zatím nebyl nalezen homolog podjednotky p47, a u jednoho ze dvou druhů se sekvenovaným genomem je podjednotka Lef-9 rozdělena na dva proteiny (JEHLE *et al.* 2013). Pro schématické zobrazení konzervovaných oblastí katalytických podjednotek RNAP virů *Baculoviridae* viz Obrázek 7.



**Obrázek 7:** Schématické zobrazení oblastí katalytických podjednotek RNA polymerázy virů *Baculoviridae* vykazujících podobnost ke konzervovaným oblastem katalytických podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNAP. Primární sekvence podjednotek Lef-8 a Lef-9 RNAP viru AcMNPV (multikapsidový nukleopolyhedrální virus *Autographa californica*) zobrazena s měřítkem ve stovkách aminokyselin. Poměry mezi velikostmi zobrazených podjednotek přibližně odpovídají skutečnosti. Zobrazení konzervovaných oblastí katalytických podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNAP stejné jako na Obrázku 5 a 6. Upraveno podle (LANE a DARST 2010a; RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010).

### 2.1.3.2 RNA polymerázy fágů bakterií rodu *Pseudomonas* a *Yersinia*

Transkripce DNA bakteriofágů se většinou spoléhá na hostitelský transkripční aparát nebo jednopodjednotkovou RNAP kódovanou fágem. Nicméně existuje skupina příbuzných velkých lytických fágů, která si kóduje vlastní nekanonické vícepodjednotkové RNAP (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Zatím sekvenované fágy  $\phi$ EL,  $\phi$ KZ180,  $\phi$ PA3 u *Pseudomonas aeruginosa*, 201 $\phi$ 2-1 u *Pseudomonas chlorapis*, OBV u *Pseudomonas fluorescens* a  $\phi$ R1-37 u *Yersinia enterocolitica* spojuje přítomnost minimálně šesti genů kódujících  $\beta$  podjednotky a rozdělené  $\beta'$  podjednotky na dvě části (HERTVELDT *et al.* 2005; THOMAS *et al.* 2008; MONSON *et al.* 2011; CORNELISSEN *et al.* 2012; SKURNIK *et al.* 2012). Díky sekvenční analýze se předpokládá, že bakteriofágy tyto geny získaly od genů bRNAP svých ancestrálních hostitelů (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). U několika bakteriofágů byla potvrzena přítomnost jejich  $\beta$  podjednotky a rozdělené  $\beta'$  podjednotky na dvě části (rozdělení přibližně ve stejném místě jako u pRNAP) ve virionu. Předpokládá se, že právě podjednotky přítomné ve virionu se skládají ve funkční RNAP zodpovědnou za expresi časných bakteriofágových genů (THOMAS *et al.* 2008; SKURNIK *et al.* 2012). Proteiny zbylých třech genů kódujících  $\beta$  podjednotku a rozdělenou  $\beta'$  podjednotku ve virionu přítomné nejsou, má se však zato, že budou tvořit druhou, funkčně specializovanou RNAP těchto bakteriofágů, která je exprimována po infekci hostitele (THOMAS *et al.* 2008). Pouze bakteriofág  $\phi$ R1-37 u *Yersinia enterocolitica* nekóduje druhou  $\beta$  podjednotku, ale kóduje další protein podobný části  $\beta'$  podjednotky (SKURNIK *et al.* 2012). Podobnou netradiční RNA polymerázu odvozenou od  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky bRNAP by mohl mít i bakteriofág PBS2 u *Bacillus subtilis*, který pravděpodobně kóduje RNAP o čtyřech podjednotkách. Tato RNAP je rezistentní k streptolydiginu a rifampicinu, ale sekvenční informace k této polymeráze nejsou dostupné (CLARK *et al.* 1974).

### 2.1.3.3 RNA polymerázy typu NCg11702

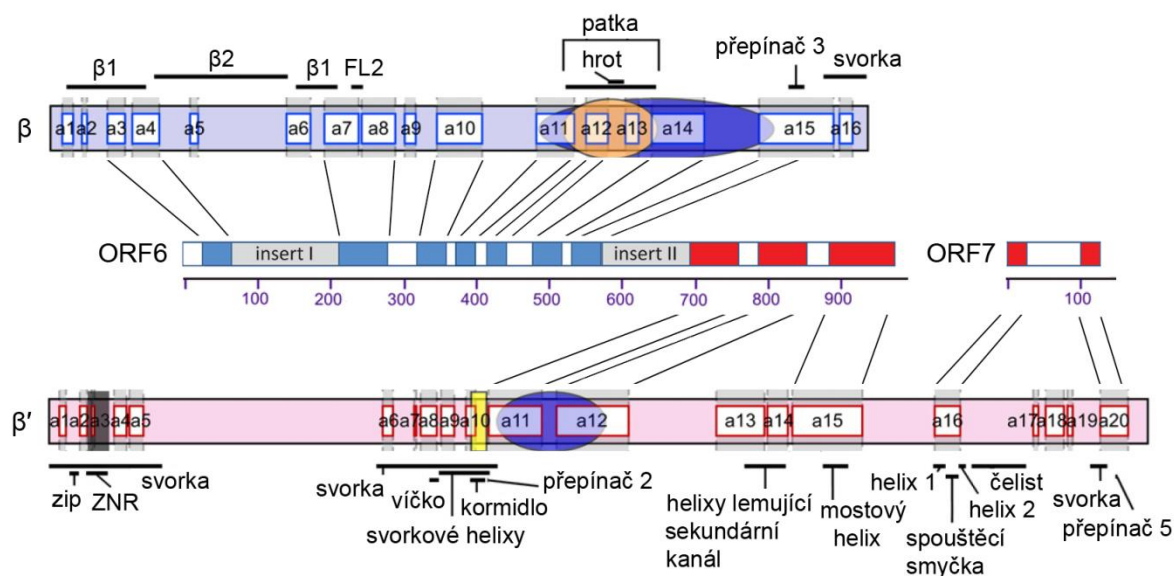
Předpokládaná nekanonická polymeráza se nachází i v genomu bakterie *Corynebacterium glutamicum*, jedná se o protein s označením NCg11702 (IYER *et al.* 2003). Tento protein má délku 2169 aminokyselin a obsahuje DPBB  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky, čímž připomíná fúzní protein  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek, jako tomu je například u bakterií rodu *Helicobacter* (IYER *et al.* 2003). Kromě DPBB motivu byly u NCg11702 nalezeny i konzervované zbytky odpovídající přepínači 2 a sekundárnímu kanálu (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Předpokládá se, že uspořádání proteinu NCg11702 by mohlo odpovídat uspořádání v předkovi dnešních vícepodjednotkových polymeráz. Tedy, že původně byla  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotka součástí jednoho proteinu a NCg11702

se v evoluci brzy oddělil, přičemž si ponechal původní uspořádání  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek (IYER *et al.* 2003; IYER a ARAVIND 2012). DPBB  $\beta$  podjednotky NCgl1702 je unikátní v tom, že neobsahuje vložený *sandwich barrel hybrid motif* (SBHM), jenž tvoří patku. Tento fakt by mohl hovořit pro diverzifikaci NCgl1702 proteinu dříve, než byl do DPBB motivu  $\beta$  podjednotky SBHM stabilně inkorporován (IYER a ARAVIND 2012). Byly také nalezeny další dva podobné hypotetické proteiny – protein SAP020A\_023 u *Staphylococcus* CDC3 a protein KTR9\_4862 kódovaný plasmidem pGKT2 u *Gordonia* KTR9 (IYER a ARAVIND 2012). Na základě analýzy genů v okolí bylo navrženo, že proteiny typu NCgl1702 jsou součástí mobilních genetických elementů, stejně jako *YonO-like* proteiny, a jejich role by mohla opět být v syntéze RNA primeru pro replikaci těchto elementů (IYER a ARAVIND 2012). *YonO-like* proteiny a proteiny typu NCgl1702 jsou chápány jako zástupci různých stádií dávné diverzifikace *two-barrel* RNA polymeráz, ale nedá se vyloučit ani to, že vznikly rozsáhlou redukcí kanonických RNA polymeráz (IYER a ARAVIND 2012).

#### 2.1.3.4 RNA polymerázy lineárních plasmidů kvasinek

Nekanonická RNA polymeráza je kódována i cytoplasmatickými lineárními plasmidy některých druhů kvasinek. Tyto lineární plasmidy jsou pravděpodobně replikovány a přepisovány nezávisle na jaderných enzymech svých hostitelů. Díky rostoucím důkazům o jejich virovém původu se těmto plasmidům začalo říkat *virus-like* elementy (JESKE *et al.* 2007). Podle zatím dostupných sekvenčních dat kóduje nekanonickou RNAP plasmid pGKL2 u *Kluyveromyces lactis*, pSKL u *Saccharomyces kluyveri*, pPac1-1 u *Pichia acaciae* a pPE1B u *Pichia etchellsii* (TOMMASINO *et al.* 1988; HISHINUMA a HIRAI 1991; KLASSEN *et al.* 2001; JESKE a MEINHARDT 2006). Nejprve byla nalezena sekvenční podobnost proteinu otevřeného čtecího rámce 6 (ORF6) plasmidu pGKL2 s přepínačem 3  $\beta$  podjednotky a DPBB motivem  $\beta'$  podjednotky vícepodjednotkových RNA polymeráz (WILSON a MEACOCK 1988). Sekvenční podobnost ORF6 proteinu s konzervovanými oblastmi katalytických podjednotek kanonických polymeráz byla rozšířena na celkem 12 oblastí  $\beta$  i  $\beta'$  podjednotky. Otevřený čtecí rámec 6 připomíná fúzi  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky, jako je tomu u bakterií rodu *Helicobacter* a proteinu NCgl1702, s tím rozdílem, že zhruba polovina kódujících sekvencí  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky byla v ORF6 deletována (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Kromě toho byly v proteinu ORF6 definovány dvě oblasti předpokládaných insertů specifických pouze pro tento protein (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). V proteinu ORF7 plasmidu pGKL2 byly nalezeny 2 oblasti vykazující sekvenční podobnost ke spouštěcí smyčce a přepínači 5  $\beta'$  podjednotky, což znamená že by ORF7 tvořil druhou podjednotku nekanonické RNA polymerázy specifické pro cytoplasmatické plasmidy

(SCHAFFRATH *et al.* 1995a). Vzhledem ke konzervovaným oblastem  $\beta'$  podjednotky zachovaným na ORF6 a ORF7 proteinu je rozdělení těchto domén do dvou proteinů shodné s místem rozdělení orthologu  $\beta'$  podjednotky RNAP u *Archaea*. Pro schématické zobrazení konzervovaných oblastí katalytických podjednotek RNAP zachovaných u RNA polymerázy cytoplasmatických plasmidů viz Obrázek 8. ORF6 a ORF7 by mohly být odvozeny z ancestrálních kvasinkových genů kódujících Rpb1 a Rpb2 podjednotky nebo paralogy těchto podjednotek z eRNAP I či eRNAP III (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Další teorie říká, že protein ORF6 by mohl být opět zástupce dávné diverzifikace *two-barrel* RNA polymeráz z dob, kdy byla  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotka součástí jednoho proteinu. Vědecká skupina podporující tuto teorii ale zjevně neví o existenci ORF7 (IYER a ARAVIND 2012). Uspořádání konzervovaných oblastí ORF6 a ORF7 proteinu je shodné i u výše zmíněných plasmidů pSKL, pPac1-1 a pPE1B. Podle hybridizačních experimentů bude tuto nekanonickou RNA polymerázu obsahovat i plasmid pWR1B u *Wingea robertsiae* a plasmid pDH1B u *Debaryomyces hansenii* (CONG *et al.* 1994).

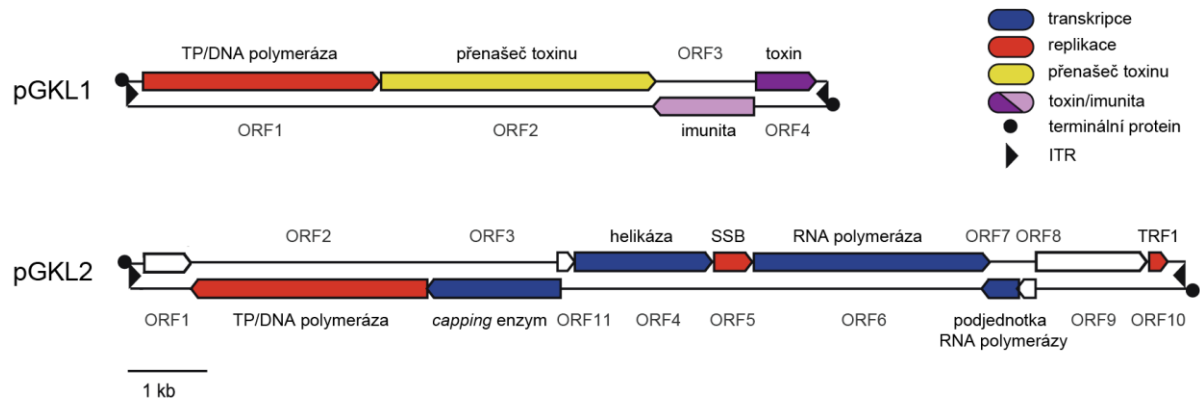


**Obrázek 8:** Schématické zobrazení oblastí RNA polymerázy lineárních plasmidů kvasinek vykazujících podobnost ke konzervovaným oblastem katalytických podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNAP. Primární sekvence podjednotek ORF6 a ORF7 RNAP lineárního plasmidu pGKL2 *Kluyveromyces lactis* zobrazena s měřítkem ve stovkách aminokyselin. V sekvenci ORF6 znázorněno umístění předpokládaných insertů definovaných podle (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Poměry mezi velikostmi zobrazených podjednotek přibližně odpovídají skutečnosti. Zobrazení konzervovaných oblastí katalytických podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNAP stejné jako na Obrázku 5 a 6. Upraveno podle (SCHAFFRATH *et al.* 1995a; LANE a DARST 2010a; RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010).

## 2.2 Cytoplasmatické lineární plasmidy kvasinky *Kluyveromyces lactis*

První lineární plasmidy kvasinek byly popsány u *Kluyveromyces lactis* IFO 1267 (*K. lactis*). Jedná se o dva dvouvláknové DNA elementy nazvané pGKL1 (synonymum k1) a pGKL2 (synonymum k2), jejichž přítomnost v buňkách je spojena se schopností zabít buňky citlivých kvasinkových kmenů stejného, ale i jiného druhu (GUNGE *et al.* 1981). Strukturně podobné elementy byly posléze nalezeny u dalších devíti kvasinkových rodů – *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Botryascus*, *Trichosporon*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces* a *Wingea*, přičemž většinou v buňkách tvoří systém dvou až tří rozdílně velkých plasmidů (JESKE *et al.* 2007). Charakteristickými znaky těchto plasmidů jsou kovalentně vázané terminální proteiny na 5' koncích jejich DNA, invertované terminální repetice a cytoplasmatická lokalizace (GUNGE *et al.* 1982; KIKUCHI *et al.* 1984; STAM *et al.* 1986). Nejlépe prozkoumané kvasinkové lineární plasmidy jsou pGKL1 a pGKL2, které se staly modelovým systémem pro studium těchto elementů. Plasmidy pGKL mají vysoký obsah A+T bází a velice kompaktní genomy s občasnými vzájemnými překryvy otevřených čtecích rámců (SOR a FUKUHARA 1985; TOMMASINO *et al.* 1988). Pomocí *in silico* analýzy byly predikovány 4 otevřené čtecí rámce na plasmidu pGKL1 a 11 otevřených čtecích rámců na plasmidu pGKL2 (SOR a FUKUHARA 1985; TOMMASINO *et al.* 1988; LARSEN a MEINHARDT 2000). U většiny otevřených čtecích rámců byla pomocí bioinformatických metod předpovězena funkce příslušného proteinového produktu. Některé proteinové produkty byly genetickými a biochemickými metodami charakterizovány, pro přehled viz (VOPÁLENSKÝ 2007). Orientace otevřených čtecích rámců obou plasmidů viz Obrázek 9. Plasmid pGKL1 kóduje *killer* toxin a imunitní složku, která chrání hostitelské buňky plasmidu proti účinku tohoto toxinu a tím zároveň přispívá k stabilní dědičnosti obou plasmidů autoselekcí (TOKUNAGA *et al.* 1987). Plasmid pGKL1 je neautonomní a pro udržení v buňkách potřebuje přítomnost většího plasmidu pGKL2, jenž kóduje proteiny s předpokládanými funkcemi v replikaci a transkripci obou plasmidů (STARK *et al.* 1990). Oba plasmidy se vyskytují přibližně v 50-100 kopiích na buňku (GUNGE 1986). Každý z plasmidů si kóduje vlastní DNA polymerázu rodiny B a terminální protein, přičemž se předpokládá, že mechanismus jejich replikace bude podobný jako replikace u virů čeledi *Adenoviridae* či bakteriofága  $\phi$ 29 u *Bacillus subtilis* (STARK *et al.* 1990). Pouze dva otevřené čtecí rámce (ORF2-pGKL1 a ORF1-pGKL2) je možné deletovat bez vlivu na udržení obou plasmidů v buňce (SOR a FUKUHARA 1985; SCHAFFRATH *et al.* 1992). Původ kvasinkových lineárních plasmidů je nejasný. Jedna teorie říká, že vznikly z endosymbiotické bakterie (KEMPKEN *et al.* 1992), zatímco druhá teorie předpokládá jejich vznik z virů. Sekvenční podobnost mezi virovými enzymy a produkty některých

otevřených čtecích rámců pGKL plasmidů s předpokládanými funkcemi v replikaci a transkripci je tak markantní, že se lineárním plasmidům začalo říkat *virus-like* elementy (JESKE *et al.* 2007; SATWIKA *et al.* 2012).



**Obrázek 9:** Schématické znázornění struktury a kódující kapacity lineárních plasmidů kvasinky *Kluyveromyces lactis*. Šipky indikují otevřené čtecí rámce a jejich transkripční směr. Barvy odpovídají uvedeným funkčním kategoriím. Bezbarvé šipky značí otevřené čtecí rámce s neznámou funkcí. Znamé nebo předpokládané funkce predikovaných proteinů jsou uvedeny. Uvedené měřítko je tisíc párů bází. TP: terminální protein, ITR: invertované terminální repetice, SSB: *single strand binding protein*, TRF1: *terminal recognition factor 1*. Upraveno podle (KLASSEN a MEINHARDT 2007).

## 2.2.1 Transkripční aparát lineárních plasmidů

Pro teorii specifického transkripčního aparátu lineárních plasmidů svědčí několik zjištění. Jednak díky své cytoplasmatické lokalizaci nemají pGKL plasmidy přístup k jadernému transkripčnímu aparátu hostitele, protože buněčné RNA polymerázy jsou aktivně transportovány do jádra a jejich množství v cytoplasmě je velmi malé (WILD a CRAMER 2012). Navíc jsou pGKL plasmidy stabilně udržovány v  $\rho^0$  a  $\rho^-$  buňkách *Saccharomyces cerevisiae*, což vylučuje roli mitochondriální RNA polymerázy v jejich transkripci (GUNGE a YAMANE 1984). Reportérové jaderné geny pod kontrolou svých vlastních promotorů, umístěné na pGKL plasmidy, nejsou exprimovány a naopak, exprese otevřeného čtecího rámce toxinu umístěného na vektor replikující se v jádře hostitelského kmene plasmidů selhala (ROMANOS a BOYD 1988; KÄMPER *et al.* 1989; STARK *et al.* 1990; KÄMPER *et al.* 1991). Pomocí pokusů s bakteriálními a kvasinkovými jadernými reportérovými geny fúzovanými se sekvencemi pGKL plasmidů byla identifikována šestinukleotidová konzervovaná sekvence (5'-ATNTGA-3') předcházející každý z otevřených čtecích rámců. Tato sekvence je nutná a dostačující pro cytoplasmatickou transkripci genu umístěného po směru transkripce (SCHRÜNDER a MEINHARDT 1995; SCHICKEL *et al.* 1996; SCHRÜNDER *et al.* 1996). Tato konzervovaná sekvence proti směru transkripce (*upstream conserved sequence*, UCS) se typicky nachází ve vzdálenosti 20-40 nukleotidů před startovním kodónem.

Sekvence umístěné distálně proti směru transkripce od UCS nemají na transkripci vliv (SCHICKEL *et al.* 1996). Sekvence UCS je vysoce konzervována mezi všemi kvasinkovými lineárními plasmidy; UCS sekvence odvozená od plasmidu pPE1B z *Pichia etchellsii* se chová jako funkční promotor po umístění do plasmidu pGKL1 (KLASSEN *et al.* 2001). Ačkoliv je exprese genů lineárních plasmidů poměrně slabá, byla určena relativní transkripční aktivita devíti otevřených čtecích rámců tím, že se sekvence od UCS po iniciační kodón použila k expresi glukosadehydrogenázy, jejíž aktivita byla měřena (SCHICKEL *et al.* 1996; LARSEN a MEINHARDT 2000). Nejvyšší transkripční aktivita byla u elementu řídicího transkripci předpokládané RNA polymerázy a nejnižší aktivita byla u předpokládané DNA polymerázy plasmidu pGKL2. Analýzou transkriptů všech otevřených čtecích rámců plasmidu pGKL1 a ORF9-pGKL2 bylo zjištěno více iniciačních míst po směru transkripce od každého UCS elementu s preferencí pro jedno místo (ROMANOS a BOYD 1988; JESKE *et al.* 2006). Transkripce většinou začíná 8-16 nukleotidů po směru transkripce od UCS. Analýzy transkriptů šesti otevřených čtecích rámců plasmidu pGKL2 metodou *Northern blot* odhalily pouze monocistronní transkripty, což naznačuje existenci nějakého definovaného, leč dosud neznámého mechanismu terminace transkripce (TOMMASINO *et al.* 1988; SCHAFFRATH *et al.* 1995b; SCHAFFRATH *et al.* 1997; JESKE *et al.* 2006). Hlavní komponenty transkripčního aparátu lineárních plasmidů jsou pravděpodobně ORF6 a ORF7 plasmidu pGKL2 (velká a malá podjednotka RNA polymerázy), ORF4 plasmidu pGKL2 (pravděpodobná helikáza) a ORF3 plasmidu pGKL2, který kóduje *capping* enzym.

### 2.2.1.1 RNA polymeráza (ORF6-pGKL2 a ORF7-pGKL2)

Produkty otevřených čtecích rámců 6 a 7 plasmidu pGKL2 by měly tvořit nekanonickou vícepodjednotkovou RNAP, blíže viz kapitola 2.1.3.4. Produkt ORF6 má předpokládanou délku 974 aminokyselin a přibližně 113 kDa, neboť jako startovní kodón je brán až druhý ATG kodón v rámci ORF (TOMMASINO *et al.* 1988). Kromě zjištění, že se jedná o nepostradatelný gen pro udržení pGKL plasmidů v buňkách, nebyl tento gen ani jeho proteinový produkt nikterak charakterizován (SCHAFFRATH *et al.* 1995b). Produkt ORF7 má 132 aminokyselin a přibližně 16 kDa. Tento ORF byl nadprodukován v bakteriálním expresním systému se značkou c-myc na svém C-konci (SCHAFFRATH *et al.* 1997). Protilátkou proti ORF7-c-myc fúznímu proteinu byl metodou *Western blot* identifikován produkt ORF7 v lyzátu kvasinkových buněk kmene nesoucího pGKL plasmidy (SCHAFFRATH *et al.* 1997).

### 2.2.1.2 Helikáza (ORF4-pGKL2)

Produkt ORF4-pGKL2 má zřejmě 579 aminokyselin a přibližně 67 kDa, neboť jako startovní kodón je brán až druhý ATG kodón v rámci ORF (TOMMASINO *et al.* 1988). Sekvence tohoto otevřeného čtecího rámce vykazuje nápadnou sekvenční podobnost virovým helikázám superrodiny 2 z DExH/D rodiny helikáz, které se podílejí na transkripci. Nejprve byla nalezena sekvenční podobnost mezi ORF4-pGKL2 a dvěma helikázami viru *Vaccinia* – nukleosidtrifosfátfosfohydrolázou I (NPH I) kódovanou genem D6R a menší podjednotkou heterodimerního velmi časného transkripčního faktoru (VETF) kódovanou genem D11L (WILSON a MEACOCK 1988). Protein NPH I vykazuje pouze ATPázovou aktivitu, nikoliv helikázovou aktivitu. O tomto proteinu je známo, že po stimulaci jednovláknovou DNA poskytuje energii pro elongaci transkripce a pro uvolnění RNA při terminaci transkripce (DENG a SHUMAN 1998). Pět ze šesti helikázových motivů přítomných na proteinu NPH I je esenciálních pro jeho funkci jakožto terminačního faktoru transkripce časných genů (CHRISTEN *et al.* 1998). Menší podjednotka VETF vykazuje ATPázovou aktivitu a heterodimerní VETF funguje jako iniciační faktor transkripce, který váže a ohýbá promotorovou oblast časných genů (BROYLES *et al.* 1991). Na komplex DNA:VETF se váže RNA polymeráza (LI a BROYLES 1993b). ATPázová aktivita VETF vede k jeho autodisociaci od DNA a následnému zahájení transkripce (LI a BROYLES 1993a). Dále byla nalezena sekvenční podobnost mezi ORF4 a některými helikázami viru ASFV čeledi *Asfarviridae*, například helikázou D1133L a Q706L (YÁÑEZ *et al.* 1993). Předpokládá se, že geny pro helikázy D6R a D11L byly přítomné ve společném předkovi všech nukleocytoplasmatických virů a že geny D1133L a Q706L jsou jejich homology (IYER *et al.* 2001; IYER *et al.* 2006). Recentní sekvenční srovnání proteinu ORF4-pGKL2 s databází známých sekvencí ukazuje největší sekvenční podobnost tohoto ORF s homology helikáz D6R a D11L u virů čeledí *Iridoviridae* a *Marseilleviridae* (SATWIKI *et al.* 2012). Produkt genu ORF4-pGKL2 obsahuje helikázové motivy Q, Ia, I, II, III, IV, V a VI. V naší laboratoři se jej podařilo produkovat v kvasinkovém expresním systému s HA značkou na C-konci (PEJZNOCHOVÁ 2004), nicméně následná funkční analýza nebyla uskutečněna. Jeho přesná role je zatím neznámá, i když se díky sekvenčním podobnostem očekává role v transkripci.

### 2.2.1.3 Capping enzym (ORF3-pGKL2)

Produkt ORF3-pGKL2 má 594 aminokyselin a přibližně 70 kDa. Sekvence tohoto otevřeného čtecího rámce vykazuje nápadnou sekvenční podobnost virovým tripartitním capping enzymům (LARSEN *et al.* 1998). Přítomnost čepičkové struktury na 5' koncích mediátorové RNA je běžný znak mediátorové RNA eukaryot a mnoha virů infikujících eukaryota. Pro tvorbu



čepičkové struktury jsou vyžadovány tři enzymatické aktivity, ale existují značné rozdíly mezi taxonomickými skupinami v genetické organizaci *capping* enzymů, stejně jako v jejich struktuře a mechanismech katalýzy. Pro více informací viz přehledové články: (SHUMAN 2002; GHOSH a LIMA 2010). Produkt ORF3-pGKL2 vykazuje sekvenční podobnost s *capping* enzymem viru *Vaccinia*, ve kterém jsou domény zodpovědné za 5' RNA-trifosfatázovou, mRNA-guanylyltransferázovou a N<sup>7</sup>-*cap*-methyltransferázovou aktivitu přítomné na jednom polypeptidu kódovaném genem D1R. Stejně tripartitní uspořádání domén jako u proteinu D1R mají také *capping* enzymy nukleocytoplasmatických virů čeledí *Asfarviridae*, *Mimiviridae* *Megaviridae* a *Marseilleviridae* (BENARROCH *et al.* 2008; BOYER *et al.* 2009; ARSLAN *et al.* 2011). Uspořádání *capping* enzymů u nukleocytoplasmatických virů je poměrně variabilní; například některé viry čeledi *Phycodnaviridae* kódují trifosfatázu a guanylyltransferázu jako nezávislé proteiny (IYER *et al.* 2006). Pouze některé viry čeledi *Iridoviridae* kódují *capping* enzym, který je bipartitní s trifosfatázovou a guanylyltransferázovou aktivitou (IYER *et al.* 2006). Methyltransferázová doména *capping* enzymu je mezi všemi nukleocytoplasmatickými viry, u kterých se vyskytuje monofyletická (YUTIN a KOONIN 2012). Guanylyltransferáza je mezi všemi nukleocytoplasmatickými viry taktéž monofyletická, až na guanylyltransferázu některých virů čeledi *Iridoviridae* a *Phycodnaviridae*, kde byla blíže v evoluci nahrazena eukaryotickou guanylyltransferázou hostitele (YUTIN a KOONIN 2012).

Nejvíce studovaným tripartitním *capping* enzymem je protein D1R z viru *Vaccinia*, který ovšem vykazuje pouze velmi slabou methyltransferázovou aktivitu. Ta je alostericky stimulována heterodimerizací s menším proteinem D12L (MAO a SHUMAN 1994; SCHWER *et al.* 2006). Není známo, zda ostatní tripartitní *capping* enzymy nukleocytoplasmatických virů také asociují s přídatnou podjednotkou, která stimuluje jejich methyltransferázovou aktivitu, leč pravděpodobný homolog proteinu D12L byl nalezen i u čeledi *Asfarviridae* (DIXON *et al.* 1994). Na druhou stranu methyltransferázová aktivita fragmentu rekombinantního *capping* enzymu Mimiviru *in vitro* se zdá být dostačující pro funkci *in vivo* (BENARROCH *et al.* 2008). Komplex D1R a D12L proteinu u viru *Vaccinia* je někdy nazýván jako virový terminační faktor (VTF), neboť kromě role v tvorbě čepičkové struktury na 5' koncích virové RNA funguje jako terminační faktor transkripce časných genů spolu s NPH I, a také jako iniciační faktor transkripce středních genů (HARRIS *et al.* 1993; LUO *et al.* 1995). Je známo, že VTF interaguje s RNA polymerázou, přičemž obě jeho podjednotky jsou potřebné pro terminaci transkripce časných genů *in vitro*. Tato funkce ale není závislá na *capping* aktivitách D1R proteinu, stejně jako na těchto aktivitách není závislá ani jeho funkce jakožto iniciačního faktoru transkripce středních genů (HAGLER a SHUMAN 1992; HARRIS *et al.* 1993; LUO *et al.* 1995). Funkce VTF v iniciaci

transkripce a terminaci transkripce se již podařilo prokázat *in vivo*, což potvrzuje multifunkční povahu *capping* enzymu viru *Vaccinia* (SHATZER *et al.* 2008).

Na základě fylogenetické analýzy aminokyselinových sekvencí guanylyltransferázových domén se jeví geny ORF3 kvasinkových lineárních plasmidů nejpříbuznější právě genům D1R u *Poxviridae* (JESKE *et al.* 2007). Recentní sekvenční srovnání proteinu ORF3 s databází známých sekvencí ukazuje největší sekvenční podobnost ORF3 s tripartitním *capping* enzymem u virů čeledi *Marseilleviridae* (SATWIKA *et al.* 2012). Přesvědčivá podobnost *capping* enzymu a helikázy lineárních plasmidů s proteiny nukleocytoplasmatických virů silně podporuje předpokládaný virový původ lineárních plasmidů (KLASSEN a MEINHARDT 2007). Experimentálně již byla potvrzena trifosfatázová a guanylyltransferázová aktivita produktu ORF3 *in vitro*, stejně jako nutnost funkční guanylyltransferázové aktivity pro udržení pGKL plasmidů v buňkách (TIGGEMANN *et al.* 2001). Methyltransferázovou aktivitu produktu ORF3 se navzdory několika nezávislým pokusům nepodařilo *in vitro* prokázat (TIGGEMANN *et al.* 2001; VOPÁLENSKÝ 2007). Je nutno objasnit, jestli je potřeba druhá podjednotka *capping* enzymu pro účinnou methyltransferázovou aktivitu ORF3, jako tomu je u viru *Vaccinia*. Vhodnými kandidáty by mohly být otevřené čtecí rámce plasmidu pGKL2 se zatím neznámými funkcemi. Stejně tak je třeba objasnit, zda by protein ORF3 nemohl ve specifickém transkripčním aparátu lineárních plasmidů kromě předpokládané tvorby čepičkové struktury na 5' koncích transkriptů plnit více rolí, než se na první pohled zdá.

### 3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat nekanonickou RNA polymerázu kódovanou otevřeným čtecím rámcem 6 a 7 plasmidu pGKL2 u *Kluyveromyces lactis* bioinformatickými, genetickými a biochemickými metodami.

Bioinformatická charakterizace *in silico*:

- Provéřit důkazy vedoucí k předpokladu, že ORF6 a ORF7 kódují nekanonickou polymerázu.
- Pokusit se zjistit identitu insertu I a insertu II v ORF6 definovaných podle (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010).
- Provéřit důkazy vedoucí k předpokladu, že ORF3 obsahuje N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázovou doménu.

Genetická a biochemická charakterizace:

- Vytvořit vektory pro produkci ORF6 a ORF7 v bakteriálním expresním systému a pokusit se ORF6 a ORF7 v tomto systému nadprodukovat, purifikovat a otestovat RNA polymerázovou aktivitu.
- Vytvořit vektory pro produkci ORF6 a ORF7 v kvasinkovém expresním systému a pokusit se ORF6 a ORF7 v tomto systému nadprodukovat, purifikovat a otestovat RNA polymerázovou aktivitu.
- Vytvořit vektory pro produkci ORF6, ORF7 a ORF3 v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému. Pokusit se v tomto systému detekovat předpokládanou interakci mezi jednotlivými proteiny.
- Pokusit se produkovat ORF6 v *in vitro* translačním systému.
- Připravit rekombinantní plasmid pGKL2 *in vivo* kódující ORF6 se značkou umožňující detekci a purifikaci ORF6. Pokusit se ORF6 se značkou purifikovat i s předpokládanými interakčními partnery.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

<u>Název</u>	<u>Výrobce</u>	<u>Vzorec/Zkratka</u>
8-hydroxychinolin	Lachema	
acetamid	ForMedium™	
adenin	ANGUS	
agar	ForMedium™	
agarosa	Serva / Invitrogen	
akrylamid	Serva / BIO-RAD	
ampicilin	Spofa / Sigma	
azid sodný	Advondale Laboratories Limited	
β-merkptoethanol	Sigma	
bovinní sérum albumin	Serva	BSA
bromfenolová modř	Merck	
<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	Serva	
deionizovaná voda		ddH <sub>2</sub> O
deoxyribonukleosidtrifosfáty	Fermentas / Roche	dNTP
dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO
dithiotreitol	AMRESCO	DTT
dodecylsírán sodný	Serva	SDS
dusičnan stříbrný	Lachema	AgNO <sub>3</sub>
ethanol	Lach-Ner	
ethidium bromid	Sigma	EtBr
fenol	Merck	
fenylmethylsulfonyl fluorid	Sigma	PMSF
formaldehyd	Sigma	
G-418	Amersham / Sigma	
galaktosa	Sigma / Serva	
glukosa	Serva	
glutaraldehyd	Serva	

glutathion	Sigma	
glycerol	Sigma / Lach-Ner	
glycin	Serva	
hydrogenfosforečnan disodný	Lachema	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
hydroxid sodný	Lachema	NaOH
chloramfenikol	Lepetit	
chlorid draselný	Lach-Ner	KCl
chlorid hořečnatý	Sigma	MgCl <sub>2</sub>
chlorid sodný	Lach-Ner	NaCl
chloroform	Lach-Ner	
imidazol	Sigma	
isoamylalkohol	Lachema	
isopropanol	Lach-Ner	
isopropyl-β-D-thiogalaktosid	Fermentas / Sigma	IPTG
jednovláknová DNA z lososího mlíčí	Sigma	
kvasničný autolyzát	Imuna / ForMedium™	
kyselina citrónová	Lachema	
kyselina ethylendiamintetraoctová	Serva	EDTA
kyselina chlorovodíková	Lachema	HCl
kyselina p-kumarová	Sigma	
kyselina octová	Lach-Ner	
kyselina trichloroactová	Sigma	TCA
L-histidin	Serva	
L-leucin	ANGUS	
L-lysin	Nutritional Biochemicals Co.	
L-methionin	Merck	
L-tryptofan	Reanal	
luminol	Sigma	
methanol	Lach-Ner / Lachema	
N,N'-methylenbisakrylamid	Serva / Lachema	
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin	Sigma	TEMED
Nodidet P-40	Sigma	
octan draselný	Sigma	KAc
octan litný	Sigma	LiAc
octan sodný	Sigma	NaAc

pepton	OXOID/ ForMedium™	
peroxid vodíku	Sigma / Lach-Ner	
persíran amonný	Serva	APS
polyethylenglykol 4000	Serva	
sacharosa	Serva	
síran amonný	Lach-Ner	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
směs inhibitorů proteáz	Roche	
Sunar Complex 1	Hero	
tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Serva / ANGUS	Tris
tris(hydroxymethyl-aminomethan chlorid	Serva	Tris-HCl
Triton X-100	Serva	
Tween 20	Serva	
uhličitan sodný	Lachema	NaCO <sub>3</sub>
uracil	Sigma	
xylenová modř	Merck	
<i>Yeast Nitrogen Base</i>	ANGUS / Difco / Sigma	

#### 4.1.2 Roztoky

**1x PBS:** 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3

**1x TBS:** 20 mM Tris; 150 mM NaCl

**4x Tris-HCl/SDS pH 6,8:** 0,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS

**4x Tris-HCl/SDS pH 8,8:** 1,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS

**5x SDS-PAGE pufr:** 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1 % (w/v) SDS

**6x vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu:** 10 mM Tris-HCl pH 7,6;

0,03 % (w/v) bromfenolová modř; 0,03 % (w/v) xylenová modř;

60 % (v/v) glycerol; 60 mM EDTA-NaOH

**6x vzorkový pufr pro SDS-PAGE:** 53,8 % (v/v) 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8;

38,5 % (v/v) glycerol; 7,6 % (v/v) β-merkptoethanol; 270 mM SDS;

0,57 mM bromfenolová modř

**50x TAE pufr:** 24,2 % (w/v) Tris-HCl; 5,7 % (v/v) HCl;

10 % (v/v) 0,5 M EDTA-NaOH pH 8,0

**akrylamid + N,N'-methylenbisakrylamid:** 30 % (w/v) akrylamid;

0,8 % (w/v) N,N'-methylenbisakrylamid; přefiltrovat

**blotovací roztok:** 20 % (v/v) methanol; 0,29 % (w/v) glycin; 0,58 % (w/v) Tris;  
0,037 % (w/v) SDS

**blokovací roztok:** 1x TBS; 0,5 % (v/v) Tween 20; 5 % (w/v) Sunar Complex 1

**EDTA-NaOH:** 0,5 M roztok EDTA upravit pomocí NaOH na pH 8

**fixační roztok:** 25 % (v/v) izopropanol; 10 % (v/v) kyselina octová

**odmývací roztok:** 1x TBS; 0,5 % Tween 20

**PEG:** 50 % (w/v) polyethylenglykol 4000

**převrstvovací pufr pH 8,8:** 0,375 M Tris-HCl; 0,1 % (w/v) SDS

**roztok I** (izolace plasmidové DNA): 25 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA-NaOH

**roztok II** (izolace plasmidové DNA): 1 % (w/v) SDS; 0,2 M NaOH

**roztok III** (izolace plasmidové DNA): 3 M KAc; 11,5 % (v/v) kyselina octová

**roztok *Coomassie Blue*:** 10 % (v/v) kyselina octová;  
0,006 % (w/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*

**roztok kyseliny p-kumarové:** 93,5 mM kyselina p-kumarová v DMSO

**roztok luminolu:** 250 mM luminol v DMSO

**STET pufr:** 10 % (v/v) sacharosa; 50 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA-NaOH;  
1 % (v/v) Triton X-100

**sušící roztok:** 10 % (v/v) ethanol; 4 % (v/v) glycerol

**TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA-NaOH pH 8

**TESP:** 20 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA-NaOH pH 8; 2 % (w/v) SDS;  
před použitím přidat 0,5 mg/ml pronáza E

**TKCl:** 0,8 M KCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5

**TM:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>

**TN:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl

**TRN:** 58 U/mg ribonukleáza A; 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,045 mM NaCl

**upravený fenol:** vodou nasycený fenol ekvilibrovaný 50 mM Tris-HCl na pH 8;  
0,1 % (w/v) 8-hydroxychinolin; 0,1 % (v/v) β-merkptoethanol

**upravený chloroform:** chloroform + isoamylalkohol v poměru 24:1

#### 4.1.2.1 Pufry pro purifikaci proteinů a imunoprecipitaci

##### 4.1.2.1.1 Purifikace proteinů s GST-epitopem

**eluční pufr:** 1x PBS pH 8; 10 mM glutathion pH 8

#### 4.1.2.1.2 Purifikace proteinů s HIS-epitopem

**omývací pufr:** TN + 10 mM imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol

**eluční pufr 1:** TN + 50 mM imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol

**eluční pufr 2:** TN + 100 mM imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol

**eluční pufr 3:** TN + 250 mM imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol

**eluční pufr 4:** TN + 500 mM imidazol; 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol

#### 4.1.2.1.3 Purifikace proteinů s GFP-epitopem pomocí GFP-Trap®\_M

**lyzační pufr:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 M EDTA-NaOH;  
0,5 % (v/v) Nodidet P-40

**omývací pufr:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 M EDTA-NaOH

#### 4.1.2.1.4 Imunoprecipitace

**nedenaturující lyzační pufr (NDLB):** 1 % (v/v) Triton X-100; 50 mM Tris-HCl pH 7,4;  
300 mM NaCl; 5 mM EDTA-NaOH; 0,02 % (w/v) azid sodný; těsně před použitím  
přidat směs inhibitorů proteáz (1 tableta směsi inhibitorů Roche na 10 ml) a 1 mM PMSF

### 4.1.3 Komerční pufrы a roztoky nezahrnuté v soupravách

25x upravená vývojka (Kodak)

25x upravený ustalovač (Kodak)

**B-PER® Bacterial Protein Extraction Reagent** (Thermo Scientific)

**dNTPs:** 10 mM dATP; 10 mM dGTP; 10 mM dCTP; 10 mM dTTP (Roche / Fermentas)

**GFP-Trap®\_M** (ChromoTek)

**Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow** (Amersham)

**Ni-NTA Superflow** (Quiagen)

**Protein G-Agarose** (Sigma)

**pufr pro restrikční endonukleázu *BamHI*:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5 při 37 °C; 10 mM MgCl<sub>2</sub>;  
100 mM NaCl; 0,02 % (v/v) Triton X-100; 0,1 mg/ml BSA (Fermentas)

**pufr pro restrikční endonukleázu *EcoRI*:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0 při 37 °C; 5 mM MgCl<sub>2</sub>;  
100 mM KCl; 0,02 % (v/v) Triton X-100; 0,1 mg/ml BSA (Fermentas)

**pufr pro restrikční endonukleázy *Orange*:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5 při 37 °C;  
100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/ml BSA (Fermentas)



**pufr pro restrikční endonukleázy Red:** 10 mM Tris-HCl pH 8,5 při 37 °C; 100 mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/ml BSA (Fermentas)

**pufr pro restrikční endonukleázy Yellow:** 33 mM Tris-octan pH 7,9 při 37 °C; 66 mM KAc; 10 mM octan hořečnatý; 0,1 mg/ml BSA (Fermentas)

**pufr pro SAP fosfatázu:** 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 při 37°C; 0,1 M MgCl<sub>2</sub>; 1 mg/ml BSA (Fermentas)

**pufr pro Taq DNA polymerázu:** 100 mM Tris-HCl pH 8,3 při 20 °C; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche)

**pufr pro T4 DNA ligázu:** 40 mM Tris-HCl pH 7,8 při 25 °C; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP (Fermentas)

**Y-PER™ Yeast Protein Extraction Reagent** (Thermo Scientific)

#### 4.1.4 Enzymy

<u>Název</u>	<u>Koncentrace</u>	<u>Výrobce</u>
lysozym	500 U/mg	Serva
lytikáza	2000 U/mg	Sigma
Pfu DNA polymeráza	2,5 U/μl	Fermentas / NEB / Roche
Pwo DNA polymeráza	2,5 U/μl	Roche
pronáza E	6 U/mg	Serva / Roche
proteináza K	16,4 mg/μl	Roche / Merck
<i>Shrimp alkaline phosphatase</i> (SAP)	1 U/μl	Fermentas
Taq DNA polymeráza	2,5 U/μl	Roche, Fermentas
T4 DNA ligáza	5 U/μl	Fermentas
restrikční endonukleázy	10 U/μl	Fermentas / NEB
ribonukleáza A	58 U/mg	Sigma

#### 4.1.5 Komerční soupravy

**BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit** (Applied Biosystems)

**FastBack DNA Minispin Kit** (Renogen Biolab)

**GenBond Plasmid FlexSpin Kit** (Renogen Biolab)

**High Pure PCR Product Purification Kit** (Roche)

**QuantiPro™ BCA Assay Kit** (Sigma)

#### 4.1.6 Standardy molekulových hmotností

Všechny použité standardy molekulových hmotností jsou zobrazeny níže na Obrázku 10.

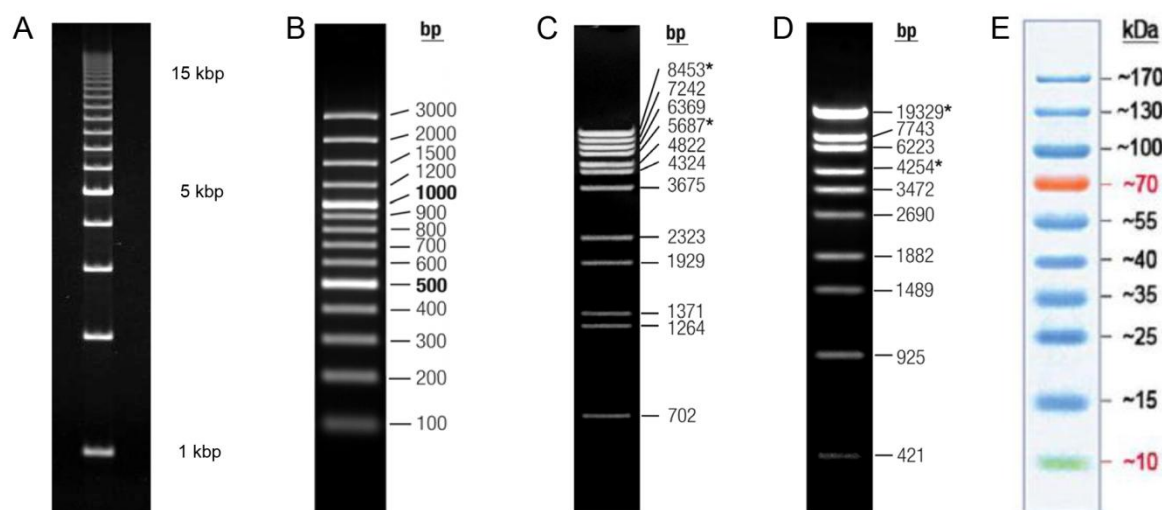
**EZ Load™ 1 kb Molecular Ruler** (BIO-RAD)

**GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder** (Fermentas)

**Lambda DNA/ *Eco91I* (*BstEII*) Marker, 15** (Fermentas)

**Lambda DNA/ *Eco130I* (*StyI*) Marker, 16** (Fermentas)

**PageRuler™ Prestained Protein Ladder** (Fermentas)



**Obrázek 10:** Standardy molekulových hmotností. Čísla udávají velikost daných fragmentů DNA nebo daných proteinů. Hvězdička označuje fragmenty, které se mohou spojit v jediný fragment tvořící další nezobrazený pruh. **A)** EZ Load™ 1 kb Molecular Ruler, **B)** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, **C)** Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker, 15, **D)** Lambda DNA/*Eco130I* (*StyI*) Marker, 16, **E)** PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Převzato z příbalových letáků daných produktů.

#### 4.1.7 Vektory

<u>Název vektoru</u>	<u>Původ</u>
C-YC426ADH	SKARP <i>et al.</i> 2008
C-YN425ADH	SKARP <i>et al.</i> 2008
N-YC426ADH	SKARP <i>et al.</i> 2008
N-YN425ADH	SKARP <i>et al.</i> 2008

C-YC426ADH_ORF3	tato práce
C-YN425ADH_ORF3	tato práce
N-YC426ADH_ORF3	tato práce
N-YN425ADH_ORF3	tato práce
C-YC426ADH_ORF6	tato práce
C-YN425ADH_ORF6	tato práce
N-YC426ADH_ORF6	tato práce
N-YN425ADH_ORF6	tato práce
C-YC426ADH_ORF7	tato práce
C-YN425ADH_ORF7	tato práce
pBSc KS+/ORF3	Václav Vopálenký
pBSc KS+/ORF6	Václav Vopálenký
pBSc KS+/ORF7	Václav Vopálenký
pGEX4T2_TEV	Ivana Hrušková
pGEX4T2_TEV_ORF6	tato práce
pGEX4T2_TEV_ORF7	tato práce
pIVEX 2.4a_ORF9	Václav Vopálenký
pIVEX 2.4c_ORF6	Václav Vopálenký
pIVEX-GFP	Roche
pKLAC1	NEB
pKLAC1_GST_ORF6	tato práce
pKLAC1_GST_ORF7	tato práce
pUG36	J. H. Hegeman

Sekvence mnou připravených vektorů jsou součástí elektronických příloh.

#### 4.1.8 Oligonukleotidové primery

Název primeru	Nukleotidová sekvence 5' → 3'
5RACE_O6_K2	CTGACCAATTTAATGGTAAATTC
5RACE_O7_K2	CAAATAGCTCATTTTTGTCATAAGC
GST_TEV_For	ATGTCCCCTATACTAGGTATTTGG
in_GEX_seq_rev	GCACGCTCTTTTGGACAACC
in_Kan_rev1	GCAGTGGTGAGTAACCATGCA

inORF6_forv3	ACAGGGGTCCAATAAAACTATAGC
inORF6rev	TCTCCTTTCCTTCATAGGTGC
Integration_1	TACCGACGTATATCAAGCCCA
Integration_3	CAGTGATTACATGCATATGT
K2ORF6_SAM_del	TACACTTCTTTTCTGCTATAATTGCATGTATCAGTTCTCC
kanR1	ATGGGTAAGGAAAAGACTCACG
kanR2	TTAGAAAACTCATCGAGCATCA
KL_orf6C_Flag1F	ACAGATACAATGAAATTTGGAGA
KL_orf6C_Flag1R	AAAAACTTTCATATATTAAGTAGCTTTCACGGTCTTATTTA TCATCATCATCTTTATAATCTTTTAAGTACATTTCATTACAT ATATTTT
KL_orf6C_Flag2F	GACCGTGAAAGCTACTTAATATATGAAAGTTT
KL_orf6C_Flag2R	GAAAATAGAAAACCCTAGCGAGAAAATATCTTTTATAA TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAA
KL_orf6N_EGFP1R	CTTCACCTTTAGACATTTTAGGTATATCTAATACGATCATA TAGCTAATGATATTAGAAAACTCATCGAGCATCAA
KL_orf6N_EGFP2F	TATATGATCGTATTAGATATACCTAAAATGTCTAAAGGTG AAGAATTATTCACTGGTG
KL_orf6N_EGFP2R	CAACATTTCTAAAATAATCGTTATAAATTTCTATTTGTCCA TAATCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTT
KL_orf6N_Flag1F	AGAAGTTGAATTTGACAACTATCATTAGCTATATGATCG TATTAGGACCGTGAAAGCTACTTAATATATGAAG
KL_orf6N_Flag1R	CATCTTTATAATCCATTTTAGGTATATCTAATACGATCATA TAGCTAATGATATTAGAAAACTCATCGAGCATCAA
KL_orf6N_Flag2F	TATATGATCGTATTAGATATACCTAAAATGGATTATAAAG ATGATGATGATAAAATTGATTATGGACAAATAGAAATTTA
KLex_5_GST_Hind	CGAAGCTTATGTCCCCTATACTAGGTTATT
O3_BiFC_F_Bam	CCGGATCCCATGTCTGGTTCCTTTAGATCGA
O3_BiFC_R_Sal	CCGTGACTTTTTTAGAAAAGAAATGATAAG
O6_BiFC_F_Bam	CCGGATCCCATGGATTATGGACAAATAGAAA
O6_BiFC_R_Sal	ACGTGACTAAGTACATTTCAATTACATATA
O7_BiFC_F_Bam	CCGGATCCCATGAATGAAAATATTATTTCT
O7_BiFC_R_Sal	CCGTGACTAAAAGAATATTTTCTCGCTAG
ORF3_F_BamHI	CCGGATCCCATGTCTGGTTCCTTTAGATCGA
ORF3_R_SalI	CCGTGACTCATTTTTTAGAAAAGAAAT

ORF3-K2_tail_2	TGGATATTGGGTCTGCAAAAAGG
ORF6_F_BamHI	ACGGATCCATGGATTATGGACAAATAGAAA
ORF6_R_SalI	ATGTCGACTTATAAGTACATTTTCATTACAT
ORF6-K2_tail_2	CGTTGTGTGTCAATCATTTAATGCAG
ORF7-K2_tail_2	GATTCCACTTTAGAAGACGAAGTAGAAG
pGEX 3'-seq	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
pGEX 5'-seq	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pKLAC1_Forwseq2	TTAGGAAAGAGCAGAATTTGGC
pKLAC1_Rev_Seq	TTATCGCACAAGACAATC
vORF3-k2-rev_2	GTTCTTTTGTTAGCCGGTATT

#### 4.1.9 Protilátky

Název	Typ	Výrobce
anti-FLAG <sup>®</sup> (M2)	myší monoklonální IgG <sub>1</sub>	Sigma
anti-GFP (B-2)	myší monoklonální IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-GST (3D4)	myší monoklonální IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-mouse IgG-HRP	kozí polyklonální	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-polyHis (HIS1)	myší monoklonální IgG <sub>2a</sub>	Sigma
anti-rabbit IgG-HRP	prasečí polyklonální	Sevapharm
anti-RPS0A	králičí polyklonální	KOUBA <i>et al.</i> 2012

#### 4.1.10 Bakteriální kmeny

***Escherichia coli* XL-1 Blue:** *endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 supE44*

*lac* [F' Tn10(tet<sup>R</sup>) *proAB lacI<sup>q</sup>Δ(lacZ)M15*] *hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)* (Stratagene)

***Escherichia coli* Rosetta<sup>TM</sup> (DE3):** F- *ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm*

λ(DE3 [lacI *lacUV5-T7* gene 1 ind1 sam7 nin5]) pRARE (Cam<sup>R</sup>) (Novagen<sup>®</sup>)

***Escherichia coli* Rosetta-gami2(DE3):** Δ(*ara-leu*)7697 Δ*lacX74* Δ*phoA PvuII phoR*

*araD139 ahpC galE galK rpsL* λ(DE3 [lacI *lacUV5-T7* gene 1 ind1 sam7 nin5])

F'[*lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro*] *gor522::Tn10 trxB* pRARE2 (Cam<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>) (Novagen<sup>®</sup>)

#### 4.1.11 Kvasinkové kmeny

***Kluyveromyces lactis* IFO 1267:** pGKL1<sup>+</sup> pGKL2<sup>+</sup> prototrof

***Kluyveromyces lactis* IFO 1267 pGKL1 ORF2::G-418:** pGKL1(ORF2::G-418<sup>R</sup>)<sup>+</sup> pGKL2<sup>+</sup>  
(Václav Vopálenský)

***Kluyveromyces lactis* IFO 1267 FLAG-ORF6:** pGKL1<sup>+</sup> pGKL2(FLAG-ORF6 G-418<sup>R</sup>)<sup>+</sup>  
prototrof (tato práce)

***Kluyveromyces lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6:** pGKL1<sup>+</sup> pGKL2(EGFP-ORF6 G-418<sup>R</sup>)<sup>+</sup>  
prototrof (tato práce)

***Kluyveromyces lactis* IFO 1267 ORF6ΔSAM:** pGKL1<sup>+</sup> pGKL2(ORF6ΔSAM G-418<sup>R</sup>)<sup>+</sup>  
prototrof (tato práce)

***Saccharomyces cerevisiae* GFP<sup>+</sup>:** darovaný kmen neznámého genotypu produkující zelený  
fluorescenční protein (GFP) z kazety na chromosomu

***Saccharomyces cerevisiae* pJ69-4A:** MATa *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80*  
*LYS2::GALL-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ* (JAMES *et al.* 1996)

#### 4.1.12 Kultivační média

##### 4.1.12.1 Bakteriální kultivační média

###### 4.1.12.1.1 Tekutá média

**2xTY médium:** 1,6 % (w/v) pepton; 1 % (w/v) kvasničný autolyzát; 0,5 % (w/v) NaCl;  
upravit pomocí NaOH na pH 7,0

**2xTY médium s antibiotiky:** složení stejné jako 2xTY médium; přidány antibiotika v celkové  
koncentraci: ampicilin (100 µg/ml), chloramfenikol (34 µg/ml)

###### 4.1.12.1.2 Agarové půdy

**2xTYA:** 2xTY médium + 2 % (w/v) agar

**2xTYA s antibiotiky:** 2xTY médium s antibiotiky + 2 % (w/v) agar

## 4.1.12.2 Kvasinková kultivační média

### 4.1.12.2.1 Tekutá média

**SD-:** 0,174 % (w/v) *Yeast Nitrogen Base*; 0,5 % (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 % (w/v) glukosa

**SD+:** SD-; 0,003 % (w/v) adenin (A); 0,003 % (w/v) L-histidin (H); 0,003 % (w/v) L-leucin (L);  
0,003 % (w/v) L-lysin (Lys); 0,003 % (w/v) L-methionin (M);  
0,003 % (w/v) L-tryptofan (T); 0,003 % (w/v) uracil (U)

**selekční minimální média:** složení jako SD+, ale chybí zde konkrétní aminokyselina,  
báze nebo kombinace více chybějících složek

**YCB + acetamid:** 0,174 % (w/v) *Yeast Nitrogen Base*; 1 % (w/v) glukosa;  
0,0001 % (w/v) L-histidin; 0,0002 % (w/v) L-methionin;  
0,0002 % (w/v) L-tryptofan; 0,0002 % (w/v) L-lysin; 15 mM Tris pH 7; 5 mM acetamid

**YPD:** 0,5 % (w/v) kvasniční autolyzát; 1 % (w/v) pepton; 2 % (w/v) glukosa

**YPD + G-418:** YPD; G-418 (250 µg/ml)

**YPGal:** 1 % (w/v) kvasniční autolyzát; 2 % (w/v) pepton; 2 % (w/v) galaktosa

### 4.1.12.2.2 Agarové půdy

**SD půdy:** SD-; SD+ nebo selekční média + 2 % (w/v) agar

**YCBA + acetamid:** YCB + acetamid; 2 % (w/v) agar

**YPDA:** YPD + 2 % (w/v) agar

**YPDA + G-418:** YPDA; G-418 (250 µg/ml nebo 750 µg/ml)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Práce s mikroorganismy

#### 4.2.1.1 Kultivace bakterií

Kultivace bakteriálních kmenů probíhala v tekutém médiu za aerobních podmínek a třepání v reciproké nebo orbitální třepačce v Erlenmayerových baňkách, nebo na agarových půdách v termostatu. Pokud není uvedeno jinak, kultivace probíhala při teplotě 37 °C.

#### 4.2.1.2 Kultivace kvasinek

Kultivace kvasinkových kmenů probíhala v tekutém médiu za aerobních podmínek a třepání v reciproké nebo orbitální třepačce v Erlenmayerových baňkách, nebo na agarových půdách v termostatu. Kultivace probíhala při teplotě 28 °C.

#### 4.2.1.3 Skladování bakteriálních a kvasinkových kmenů

Krátkodobé skladování bakteriálních kmenů v řádu týdnů a kvasinkových kmenů v řádu týdnů až měsíců probíhalo na agarových půdách při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobé skladování byly čerstvě napěstované mikroorganismy na agarových půdách převedeny do 50 % (v/v) glycerolu a skladovány při –80 °C.

#### 4.2.1.4 Měření růstu mikroorganismů

Měření průběhu růstu bakterií a kvasinek probíhalo měřením změny optické hustoty (OD) na přístroji Spectronic® Helios Beta (Thermo Spectronic). Pro měření bylo použito záření o vlnové délce 600 nm nebo 660 nm, tato hodnota je dále zapisována jako dolní index. Pokud hodnota OD přesahovala hodnotu 1, byl vzorek před měřením naředěn.

##### 4.2.1.4.1 Stanovení růstové křivky kvasinkového kmene

Kultura kvasinkového kmene narostlá přes noc v tekutém médiu při 28 °C byla zaočkována do vytemperovaného média na  $OD_{600}$  0,05. V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky a měřeny hodnoty optické hustoty při 600 nm. Tyto hodnoty byly vyneseny do grafu.



#### 4.2.1.5 Testování auxotrofních požadavků kvasinkových kmenů

Auxotrofní požadavky kvasinkových kmenů byly testovány po dlouhodobém skladování při 4 °C, při vyočkování buněk uskladněných při -80 °C a v některých případech po transformaci. Bylo pracováno s čerstvě narostlými kvasinkovými kmeny na agarových půdách. Sterilním párátkem bylo odebráno malé množství biomasy a přeneseno na agarové půdy se selekčními médii vhodnými pro účel daného testování a inkubováno v termostatu při 28 °C dva až více dní.

#### 4.2.1.6 Indukce bakteriálního Tac promotoru

Vektor plasmidového typu kódující příslušný konstrukt čerstvě vnést do elektrokompetentních buněk *E. coli* Rosetta™(DE3) nebo Rosetta-gami2(DE3) elektroporací, buňky vysít na selekční médium obsahující chloramfenikol a ampicilin.

- pomocí mikrobiologické kličky část biomasy přenést do selekčního média a kultivovat v orbitální třepačce přes noc při 28 °C
- kulturu přeočkovat na OD<sub>600</sub> 0,05-0,1 do požadovaného množství selekčního média vytemperovaného na 28 °C a kultivovat do dosažení OD<sub>600</sub> 0,35-0,4
- snížit kultivační teplotu na 15 °C po dobu 3-5 hod.
- přidat IPTG na finální koncentraci 0,1 mM a inkubovat přes noc při 15 °C
- centrifugovat 10 min./5000g při 4 °C, odstranit supernatant
- buňky propláchnout v ledovém 1xPBS, ihned použít nebo uchovat při -80 °C

#### 4.2.1.7 Příprava kvasinkových buněk pro měření na průtokovém cytometru

- kvasinkovou kulturu nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 5 ml příslušného média
- přeočkovat do 10 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,2
- inkubovat při teplotě 28 °C do požadované optické denzity (většinou do OD<sub>600</sub> 0,6-0,9)
- centrifugovat 10 min./3000g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 1-5 ml vychlazeného 1x PBS, přenést 200-750 µl do mikrozkmavek vhodných pro měření na daném průtokovém cytometru
- odnést na ledu k analýze na průtokovém cytometru BD™ LSRII Flow Cytometer (BD Biosciences)

## 4.2.2 Práce s DNA

### 4.2.2.1 Izolace DNA

#### 4.2.2.1.1 Minipreparace vektorů plasmidového typu z buněk *E. coli*

- bakteriální kulturu nechat narůst přes noc v termostatu při teplotě 37 °C na agarových půdách 2x TYA obsahujících příslušné selekční antibiotikum
- sterilním párátkem přenést množství bakteriální biomasy odpovídající ploše 2x2 cm do 400 µl roztoku STET, přidat 5 µl 5 % (w/v) lysozymu a dokonale resuspendovat
- inkubovat minimálně 2 min. v termobloku při 95 °C
- nechat vychladnout 5-10 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 10 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit pelet párátkem
- přidat 400 µl isopropanolu
- inkubovat 30-60 min. při teplotě -20 °C
- centrifugovat 15 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, sediment resuspendovat v 1 ml 70 % (v/v) ethanolu
- centrifugovat 10 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet vysušit 60 min. v termostatu při teplotě 37 °C nebo 10-15 min. v přístroji Speed Vac Plus SC110A (Savant)
- vysušený pelet resuspendovat v 30 µl roztoku TE
- 5 µl vzorku analyzovat elektroforeticky

#### 4.2.2.1.2 Minipreparace vektorů plasmidového typu z buněk *E. coli* pomocí soupravy GenBond Plasmid FlexSpin Kit

- bakteriální kulturu nesoucí příslušný vektor plasmidového typu nechat narůst přes noc při teplotě 37 °C v 2-5 ml média 2xTY obsahujícího příslušné selekční antibiotikum
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat pipetováním v 200 µl pufru S1 (obsahuje ribonukleázu A)
- přidat 200 µl pufru S2, opatrně promíchat otáčením mikrozkmavky, inkubovat 2-4 min. při pokojové teplotě

- přidat 350  $\mu$ l pufru S3, opatrně promíchat otáčením mikrozkušavky, inkubovat 1 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 5 min./14000g při pokojové teplotě
- supernatant přenést do dodaných kolonek, přidat 100  $\mu$ l DNA vazebné matrice
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, přidat 700  $\mu$ l pufru WB
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, přidat 250  $\mu$ l pufru WB
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, kolonku nasadit na čistou mikrozkušavku
- přidat 75-100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O zahřáté v termobloku na 60 °C, inkubovat 1 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 2 min./14000g při pokojové teplotě
- vzorek analyzovat elektroforeticky

#### 4.2.2.1.3 Midipreparace vektorů plasmidového typu z buněk *E. coli*

- bakteriální kulturu nesoucí příslušný vektor plasmidového typu nechat narůst přes noc při teplotě 37 °C v 50 ml média 2xTY obsahujícího příslušné selekční antibiotikum
- centrifugovat 10 min./5000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet důkladně resuspendovat v 2 ml roztoku I
- přidat 4 ml roztoku II, promíchat otáčením zkumavky, inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
- přidat 3 ml roztoku III, promíchat otáčením zkumavky, inkubovat 20 min. na ledu
- centrifugovat 20 min./5000g při teplotě 4 °C
- supernatant přefiltrovat přes gázu, přidat 0,7 objemu isopropanolu, dokonale promíchat, inkubovat 10 min. na ledu
- centrifugovat 20 min./5000g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 3 ml 70 % (v/v) ethanolu
- centrifugovat 5 min./5000g při pokojové teplotě
- dokonale odstranit supernatant, pelet nechat vyschnout v termostatu při teplotě 37 °C
- pelet resuspendovat v 500  $\mu$ l pufru TE, přidat 10  $\mu$ l roztoku TRN, inkubovat 1 hod. v termostatu při teplotě 37 °C

- přidat 500 µl upraveného fenolu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./14000g při pokojové teplotě
- odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 250 µl upraveného fenolu a 250 µl upraveného chloroformu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./14000g při pokojové teplotě
- opakovat předchozí dva kroky ještě jednou
- odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 500 µl upraveného chloroformu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./14000g při pokojové teplotě
- odebrat vrchní vodnou fázi, přidat k ní 0,1 objemu 3 M NaAc a 2,5 objemu 96 % (v/v) ethanolu vychlazeného na 4 °C
- inkubovat přes noc při -20 °C
- centrifugovat 10 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, přidat 1 ml 70 % (v/v) ethanolu, dokonale promíchat
- centrifugovat 10 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet nechat dokonale vyschnout v termostatu při teplotě 37 °C
- podle objemu peletu rozpustit v 100-300 µl pufru TE
- vzorek analyzovat elektroforeticky

#### 4.2.2.1.4 Minipreparace kvasinkových cytoplasmatických plasmidů z buněk *K. lactis*

- kvasinkovou kulturu nesoucí příslušné plasmidy nechat narůst 1-2 dny v termostatu při teplotě 28 °C na agarových půdách YPDA nebo YPDA + G-418
- množství kvasinkové biomasy objemu špendlíkové hlavičky přenést párátkem do jamky mikrotitrační destičky
- inkubovat v hybridizační peci při teplotě 45 °C 2-6 hod
- přidat 40 µl pufru TESP
- inkubovat v třepačce pro mikrotitrační destičky PST-60HL (BIOSAN Ltd.) 15 min./900 otáček za minutu při teplotě 25 °C
- inkubovat přes noc v termostatu při teplotě 37 °C
- přidat 40 µl 1x vzorkového pufru pro agarosovou elektroforézu

- inkubovat v třepačce pro mikrotitrační destičky PST-60HL (BIOSAN Ltd.) 15-30 min./900 otáček za minutu při teplotě 25 °C
- vzorek analyzovat elektroforeticky

#### 4.2.2.1.5 Midipreparace kvasinkových cytoplasmatických plasmidů z lyzátů protoplastů buněk *K. lactis*

- kvasinkovou kulturu nesoucí příslušné plasmidy nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 50 ml média YPD nebo YPD + G-418
- přeočkovat do 50 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,2
- inkubovat za stálého třepání při teplotě 28 °C do OD<sub>600</sub> 1,5
- centrifugovat 10 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 4 ml 60 mM EDTA-NaOH pH 8 + 1 % (v/v) β-merkaptoethanol
- inkubovat 20 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 50 ml pufru TKCl
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 4 ml pufru TKCl + 0,66 mg lytikázy
- inkubovat 10 min. při pokojové teplotě
- (kontrola protoplastů: 20 μl suspenze kápnout na podložní sklo, přikrýt krycím sklem, pozorovat v mikroskopu při zvětšení 500x, ke hraně krycího skla přidat 10-20 μl H<sub>2</sub>O, protoplasty praskají)
- centrifugovat 5 min./3000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet opatrně kývavě otáčivým pohybem resuspendovat v 50 ml pufru TKCl
- centrifugovat 5 min./3000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet opatrně kývavě otáčivým pohybem resuspendovat v 50 ml pufru TKCl
- centrifugovat 5 min./3000g při pokojové teplotě
- dokonale odstranit veškerý supernatant, pelet zchladit na ledu 5 min
- pelet opatrně kývavě otáčivým pohybem resuspendovat v 5 ml ledového pufru TM

- přenést pelet do Dounceova homogenizátoru vychlazeného na ledu, skleněným pístem pomalu pohybovat 5x nahoru a dolů
- (kontrola lyze protoplastů: 20  $\mu$ l suspenze kápnout na podložní sklo, přikrýt krycím sklem, pozorovat v mikroskopu při zvětšení 500x)
- centrifugovat 20 min./20000g při 4 °C
- supernatant odebrat do čisté zkumavky, přidat 10  $\mu$ l proteinázy K a inkubovat 6,5 hod. v termostatu při teplotě 37 °C
- přidat 1 objem upraveného fenolu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 0,5 objemu upraveného fenolu a 0,5 objemu upraveného chloroformu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- opakovat předchozí dva kroky ještě jednou
- odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 1 objem upraveného chloroformu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odebrat vrchní vodnou fázi, přidat k ní 100  $\mu$ l roztoku TRN, inkubovat 2 hod. v termostatu při teplotě 37 °C
- přidat 1 objem upraveného fenolu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 0,5 objemu upraveného fenolu a 0,5 objemu upraveného chloroformu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- opakovat předchozí dva kroky ještě jednou
- odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 1 objem upraveného chloroformu, dokonale promíchat
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 0,1 objemu 3 M NaAc a 2,5 objemu 96 % (v/v) ethanolu
- uchovávat přes noc při -20 °C
- centrifugovat 10 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, přidat 1 ml 70 % (v/v) ethanolu, dokonale promíchat
- centrifugovat 10 min./14000g při pokojové teplotě

- odstranit supernatant, pelet nechat dokonale vyschnout v termostatu při teplotě 37 °C
- pelet rozpustit v 100 µl pufru TE
- 5 µl vzorku analyzovat elektroforeticky

#### 4.2.2.1.6 Izolace DNA z agarosového gelu pomocí soupravy FastBack DNA Minispin Kit

- vzorky rozdělit na 0,5 % (w/v) agarosovém gelu
- pod transluminátorem generujícím UV záření o vlnové délce 254 nm nebo 312 nm vyříznout úsek gelu s požadovaným fragmentem DNA
- vyříznutý úsek gelu přenést do mikrozkušavky a podle velikosti přidat 500-650 µl dodaného pufru GL
- inkubovat 5-10 min. v termobloku při teplotě 60 °C za občasného promíchání
- přenést suspenzi do dodané kolonky se skleněnou fritou
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, přidat 750 µl dodaného pufru WB
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, přidat 250 µl dodaného pufru WB
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, skleněnou fritu nasadit na čistou mikrozkušavku
- přidat 30 µl ddH<sub>2</sub>O zahřáté v termobloku na 60 °C, inkubovat 1 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 2 min./14000g při pokojové teplotě
- 5 µl vzorku analyzovat elektroforeticky

#### 4.2.2.1.7 Přečištění produktu reakce PCR pomocí soupravy High Pure PCR Product Purification Kit

- produkt PCR reakce doplnit do objemu 100 µl pomocí ddH<sub>2</sub>O, přidat 500 µl dodaného pufru *binding*, dokonale promíchat
- přenést do dodané kolonky se skleněnou fritou
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě

- odstranit proteklý supernatant, přidat 500 µl dodaného pufru *wash*
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, přidat 200 µl dodaného pufru *wash*
- centrifugovat 1 min./14000g při pokojové teplotě
- odstranit proteklý supernatant, skleněnou fritu nasadit na čistou mikrozkušavku
- přidat 50-100 µl ddH<sub>2</sub>O zahřáté v termobloku na 60 °C, inkubovat 1 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 2 min./14000g při pokojové teplotě
- 8 µl vzorku analyzovat elektroforeticky

#### 4.2.2.1.8 Izolace kvasinkových cytoplasmatických plasmidů a genomové DNA pro reakci PCR z buněk *K. lactis*

##### Metoda 1

- kvasinkovou kulturu nechat narůst 1-2 dny v termostatu při teplotě 28 °C na agarových půdách YCBA + acetamid, YPDA nebo YPDA + G-418
- množství kvasinkové biomasy objemu dvou špendlíkových hlaviček přenést do mikrozkušavky pipetovacím nástavcem
- přidat 100 µl ddH<sub>2</sub>O, dokonale promíchat
- inkubovat 10 min. v termobloku při teplotě 96 °C
- dokonale promíchat a inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
- inkubovat 10 min. v termobloku při teplotě 96 °C
- dokonale promíchat a inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 5 min./14000g při pokojové teplotě
- použít 2-4 µl supernatantu jako templát pro reakci PCR

##### Metoda 2

- kvasinkovou kulturu nechat narůst 1-2 dny v termostatu při teplotě 28 °C na agarových půdách YCBA + acetamid, YPDA nebo YPDA + G-418
- množství kvasinkové biomasy objemu špendlíkové hlavičky přenést do mikrozkušavky pipetovacím nástavcem
- přidat 15 µl 20 mM NaOH, dokonale promíchat
- inkubovat 15 min. v termobloku při teplotě 96 °C



- dokonale promíchat
- inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 5 min./14000g při pokojové teplotě
- použít 1-2  $\mu$ l supernatantu jako templát pro reakci PCR

#### 4.2.2.2 Měření koncentrace DNA

Pro běžnou práci s DNA byla její koncentrace odhadována při elektroforetické analýze. Pro transformaci mikroorganismů, sekvenování a *in vitro* translační systém byla koncentrace DNA měřena na mikrokapilárním spektrofotometru NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) v objemu 1,5  $\mu$ l při vlnové délce 260 nm.

#### 4.2.2.3 Agarosová elektroforéza DNA

- agarosu v požadované koncentraci (použité koncentrace od 0,5 % (w/v) do 1,5 % (w/v) agarosa) rozpustit v 1x pufru TAE
- zchladit na cca 60 °C, nalít do vaničky, přidat EtBr (výsledná koncentrace 0,1  $\mu$ g/ml), vložit hřeben, nechat agarosu ztuhnout
- vaničku umístit do elektroforetického přístroje, přelít 1x pufrům TAE, vyndat hřeben, nanést vzorky smíchané s 6x vzorkovým pufrům a v případě potřeby nanést standard molekulových hmotností
- zapojit do elektrického pole o vhodném konstantním napětí (použité napětí od 1 V/cm po 8 V/cm) dostatečně dlouhou dobu (použité doby od 20 min. po 24 hod)
- prohlédnout gel pod transluminátorem generujícím UV záření o vlnové délce 254 nm nebo 312 nm
- v případě potřeby dobarvit gel v roztoku EtBr (výsledná koncentrace 1,6  $\mu$ g/ml) 2-24 hod. při teplotě 4 °C
- vyfotit gel přístrojem EDAS 290 (Kodak) nebo Gel Logic 112 Imaging System (Kodak) pod transluminátorem generujícím UV záření
- analyzovat fotografii gelu v programu Carestream (Kodak)

## 4.2.2.4 Modifikace DNA

### 4.2.2.4.1 Štěpení restričními endonukleázami

#### Štěpení vektorů a produktů PCR pro přípravu nových rekombinantních vektorů

- 1,5  $\mu\text{l}$  od každého enzymu (koncentrace 10 U/ $\mu\text{l}$ ) použitého v daném štěpení
- 3  $\mu\text{l}$  nebo 6  $\mu\text{l}$  vhodného pufru
- množství DNA pro štěpení odhadnout z elektroforetické analýzy, pro štěpení použít vektor izolovaný metodou 4.2.2.1.3
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 30  $\mu\text{l}$ , vše dokonale promíchat
- centrifugovat 10 s/14000g při pokojové teplotě
- inkubovat v termostatu 2-4 hod. při teplotě 37 °C nebo jiné vhodné teplotě
- smíchat s 6x vzorkovým pufrem pro agarosovou elektroforézu a rozdělit elektroforeticky v 0,5 % (w/v) agarosovém gelu
- izolovat naštěpený fragment pomocí metody 4.2.2.1.6

#### Analytické štěpení vektorů a produktů PCR

- 1  $\mu\text{l}$  od každého enzymu použitého v daném štěpení
- 1  $\mu\text{l}$  nebo 2  $\mu\text{l}$  vhodného pufru
- množství DNA pro štěpení odhadnout z elektroforetické analýzy, pro štěpení použít vektor izolovaný metodou 4.2.2.1.2 nebo 4.2.2.1.3
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 10  $\mu\text{l}$ , vše dokonale promíchat
- centrifugovat 10 s/14000g při pokojové teplotě
- inkubovat v termostatu 1-4 hod. při teplotě 37 °C nebo jiné vhodné teplotě
- smíchat s 6x vzorkovým pufrem pro agarosovou elektroforézu a rozdělit elektroforeticky

#### Analytické štěpení nových rekombinantních vektorů vzniklých ligací

- 1  $\mu\text{l}$  od každého enzymu použitého v daném štěpení
- 1  $\mu\text{l}$  nebo 2  $\mu\text{l}$  vhodného pufru
- pro štěpení použít 3-5  $\mu\text{l}$  vektoru izolovaného metodou 4.2.2.1.1
- 0,3  $\mu\text{l}$  roztoku TRN
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 10  $\mu\text{l}$ , vše dokonale promíchat

- centrifugovat 10 s/14000g při pokojové teplotě
- inkubovat v termostatu 2-4 hod. při teplotě 37 °C
- smíchat s 6x vzorkovým pufrem pro agarosovou elektroforézu a rozdělit elektroforeticky

#### 4.2.2.4.2 Defosforylace štěpených vektorů pro přípravu nových rekombinantních vektorů

- 1 µl SAP fosfatázy
- 2 µl pufru pro SAP fosfatázu
- množství DNA pro defosforylaci odhadnout z elektroforetické analýzy vektoru štěpeného za účelem přípravy nového rekombinantního vektoru viz výše
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20 µl, vše dokonale promíchat
- centrifugovat 10 s/14000g při pokojové teplotě
- inkubovat v termocykleru 30 min. při teplotě 37 °C
- inkubovat v termocykleru 15 min. při teplotě 65 °C
- inkubovat 5 min. při pokojové teplotě
- pokračovat ligací viz 4.2.2.4.3

#### 4.2.2.4.3 Ligace

- 2 µl T4 DNA ligázy
- 3 µl pufru pro T4 DNA ligázu
- množství vektoru a insertu pro ligaci odhadnout z elektroforetické analýzy vektoru, při použití defosforylovaného vektoru použít 5 µl insertu
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 30 µl, vše dokonale promíchat
- centrifugovat 10 s/14000g při pokojové teplotě
- inkubovat v termocykleru 16 hod. při teplotě 16 °C
- inkubovat v termocykleru 10 min. při teplotě 65 °C
- inkubovat 10 min. při teplotě -20 °C
- použít 5-10 µl pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* elektroporací viz 4.2.2.5.1

#### 4.2.2.5 Vnášení DNA do mikroorganismů

##### 4.2.2.5.1 Transformace buněk *E. coli* elektroporací

- do vychlazené elektroporační kyvety o elektrodové vzdálenosti 2 mm vnést směs 40-70  $\mu$ l suspenze elektrokompetentních buněk *E. coli* a 2  $\mu$ l vhodně naředěné DNA (přibližně 100 ng) nebo 5-10  $\mu$ l ligační směsi
- inkubovat na ledu 1 min
- aplikovat puls elektroporátorem Gene Pulser Xcell™ (BIO-RAD) o kapacitanci 25  $\mu$ F, napětí 2500 V a odporu 200  $\Omega$
- co nejrychleji po pulzu přidat 1 ml 2xTY média o pokojové teplotě nebo teplotě 37 °C
- přenést do čisté mikrozkušavky
- inkubovat v třepačce pro mikrozkušavky TS-100 (BIOSAN Ltd.) 1 hod./750 otáček za minutu při teplotě 37°C
- transformované buňky vysít na agarové půdy s příslušným selekčním antibiotikem v objemech 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a zbylém objemu

##### 4.2.2.5.2 Transformace buněk *S. cerevisiae* a *K. lactis* metodou s octanem lithným

- kvasinkovou kulturu nechat narůst 1-2 dny v termostatu při teplotě 28 °C na agarových půdách YPDA
- množství kvasinkové biomasy objemu větší špendlíkové hlavičky (přibližně 25  $\mu$ l) přenést pipetovacím nástavcem do mikrozkušavky s 1 ml 100 mM LiAc, dokonale promíchat
- centrifugovat 30 s/14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, k peletu přidat v následujícím pořadí: 240  $\mu$ l PEG, 36  $\mu$ l 1 M LiAc, 50  $\mu$ l denaturované jednovláknové DNA z lososího mlíčí (2,0 mg/ml), 25  $\mu$ l roztoku transformující DNA (100 ng až 5  $\mu$ g)
- dokonale promíchávat 1 min. při pokojové teplotě
- inkubovat v termobloku 20 min. při teplotě 42 °C
- inkubovat přes noc při pokojové teplotě
- transformované buňky vysít na agarové půdy s příslušným selekčním médiem v objemech 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a zbylém objemu

#### 4.2.2.5.3 Transformace kvasinek metodou s octanem lithným s vysokým výtěžkem

- kvasinkovou kulturu nesoucí příslušné plasmidy nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 5 ml média YPD
- přeočkovat do 50 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,35
- inkubovat při teplotě 28 °C do OD<sub>600</sub> 1
- centrifugovat 10 min./3000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 25 ml ddH<sub>2</sub>O
- centrifugovat 10 min./3000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 1 ml 100 mM LiAc, přenést do mikrozkušavky
- centrifugovat 30 s/14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 1 ml 100 mM LiAc, rozdělit po 100 µl na jednotlivé transformační reakce do separátních mikrozkušavek
- centrifugovat 30 s/14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, k peletu jedné transformační reakce přidat v následujícím pořadí: 240 µl PEG, 36 µl 1 M LiAc, 50 µl denaturované jednovláknové DNA z lososího mlíčí (2,0 mg/ml), 34 µl roztoku transformující DNA (100 ng až 10 µg)
- dokonale promíchat 1 min. při pokojové teplotě
- inkubovat v termostatu 20 min. při teplotě 28 °C
- inkubovat v termobloku 20 min. při teplotě 42 °C
- centrifugovat 30 s/14000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, přidat 1 ml sterilní ddH<sub>2</sub>O, dokonale promíchat
- transformované buňky vysít na agarové půdy s příslušným selekčním médiem v objemech 10 µl, 100 µl a zbylém objemu
- pokud se jedná o transformaci za účelem tvorby rekombinantních pGKL plasmidů přenést suspenzi do Erlenmayerovy baňky s 5 ml média YPD
- inkubovat přes noc při 28 °C
- centrifugovat 10 min./3000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 1 ml ddH<sub>2</sub>O
- transformované buňky vysít na agarové půdy s příslušným selekčním médiem v objemech 10 µl, 100 µl a zbylém objemu

## 4.2.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvenování

### 4.2.2.6.1 Složení směsi pro reakci PCR

- 1  $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerázy pro analytické reakce PCR, 1  $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerázy + 2,5 % (v/v) Pfu DNA polymerázy nebo 1  $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerázy + 1-5 % (v/v) Pwo DNA polymerázy pro PCR reakce sloužící k přípravě rekombinantních vektorů, rekombinantních pGKL plasmidů nebo templátů pro sekvenování
- 2,5  $\mu\text{l}$  10x pufru pro Taq DNA polymerázu
- 1,25  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  primer 1
- 1,25  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  primer 2
- 0,5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP
- 0,5-4  $\mu\text{l}$  templátové DNA
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 25  $\mu\text{l}$ , dokonale promíchat, vše udržovat na ledu
- centrifugovat 10 s/14000g při pokojové teplotě
- inkubovat v termocykleru Mastercycler<sup>®</sup> ep Gradient S (Eppendorf) s vhodně zvoleným programem
- 5-10  $\mu\text{l}$  analyzovat elektroforeticky

### 4.2.2.6.2 Složení směsi pro sekvenační reakci PCR pomocí soupravy BigDye<sup>®</sup>

#### Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

- 2  $\mu\text{l}$  dodané směsi AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerázy FS, 2'-deoxyribonunukleosid-5'-trifosfátů a fluroescenčních 2'3'-dideoxyribonunukleosid-5'-trifosfátů
- 4  $\mu\text{l}$  dodaného 5x sekvenačního pufru
- 1  $\mu\text{l}$  5  $\mu\text{M}$  primer (nebo 0,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  primer)
- 1-10  $\mu\text{l}$  templátové DNA (750 ng v případě vektoru plasmidového typu, 100 ng v případě produktu reakce PCR)
- doplnit ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20  $\mu\text{l}$ , dokonale promíchat, vše udržovat na ledu
- centrifugovat 10 s/14000g při pokojové teplotě
- inkubovat v termocykleru Mastercycler<sup>®</sup> ep Gradient S (Eppendorf) s vhodně zvoleným programem
- pokračovat přečištěním reakce viz 4.2.2.6.5

#### 4.2.2.6.3 Program pro analytické reakce PCR a reakce PCR k přípravě rekombinantních vektorů, rekombinantních pGKL plasmidů a templátů pro sekvenování

95 °C	3 min.	} 25 cyklů pro přípravu konstruktů nebo sekvenač. templátů
94 °C	30 s	
variabilní (40-65 °C)	30 s	
72 °C	variabilní (1 min. - 3 min. 30s + 3 s na cyklus)	
72 °C	10 min.	
4 °C	do odvolání	

#### 4.2.2.6.4 Program pro sekvenační reakci PCR pomocí soupravy BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

96 °C	1 min.	} 24 cyklů
96 °C	30 s	
variabilní (50-55 °C)	30 s	
60 °C	4 min.	
4 °C	do odvolání	

#### 4.2.2.6.5 Přečištění sekvenační reakce PCR

- k sekvenační reakci přidat 2 µl 3 M NaAc a 50 µl 96 % (v/v) ethanolu, dokonale promíchat
- inkubovat 30 min. při laboratorní teplotě
- centrifugovat 15 min./13000g při pokojové teplotě
- opatrně odstranit supernatant (pelet není vidět), přidat 250 µl 70 % (v/v) ethanolu, dokonale promíchat
- centrifugovat 15 min./13000g při pokojové teplotě
- důkladně odstranit veškerý supernatant (pelet není vidět)
- inkubovat 10 min. v termostatu při teplotě 37 °C
- předat ke kapilární elektroforetické analýze do Laboratoře sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK

#### 4.2.2.6 Příprava vzorků pro sekvenaci firmou Macrogen

- vektory plasmidového typu určené k sekvenaci izolovat dle protokolu 4.2.2.1.2, naředit pomocí ddH<sub>2</sub>O na výslednou koncentraci 100 ng/μl a 20 μl odeslat k sekvenaci
- produkty reakce PCR naředit pomocí ddH<sub>2</sub>O na výslednou koncentraci 50 ng/μl nebo izolovat dle protokolu 4.2.2.1.6 nebo 4.2.2.1.7 a naředit pomocí ddH<sub>2</sub>O na výslednou koncentraci 50 ng/μl, odeslat k sekvenaci
- pro každých pět vzorků připravit 20 μl 10 μM primeru v ddH<sub>2</sub>O, odeslat spolu s příslušnými vzorky k sekvenaci

### 4.2.3 Práce s proteiny

#### 4.2.3.1 Příprava bakteriálních lyzátů

- bakteriální buňky propláchnuté 1x PBS po indukci IPTG viz protokol 4.2.1.6 dát na led a od tohoto kroku udržovat na ledu nebo při 4 °C
- resuspendovat buňky v roztoku B-PER<sup>®</sup> Bacterial Protein Extraction Reagent v objemu 1 ml na 50 ml vstupní kultury, přidat směs inhibitorů proteáz (1 tableta směsi inhibitorů Roche na 10 ml roztoku B-PER<sup>®</sup>) a 1 mM PMSF
- inkubovat 1 hod. na ledu
- sonikovat 15x 20 s při 50% amplitudě v sonikátoru Q700 Sonicator (QSONICA), mezi jednotlivými sonikacemi chladit 1 min. na ledu
- centrifugovat 20 min./20000g při teplotě 4 °C
- odstranit pelet, supernatant přenést do čisté mikrozkušavky a uchovávat v -80 °C
- část supernatantu analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy
- pokračovat protokolem 4.2.3.2

#### 4.2.3.2 Purifikace proteinů s GST-epitopem z bakteriálních a kvasinkových lyzátů

- jemně promíchat zásobní suspenzi Glutathione Sepharose<sup>™</sup> 4 Fast Flow uchovávanou při teplotě 4 °C, odebrat objem odpovídající 1/100 objemu přečištěného lyzátu
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, přidat 1 ml 1x PBS vychlazeného na ledu, jemně promíchat
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C



- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- opakovat předchozí tři kroky 2-3x
- odstranit supernatant, k peletu přidat přečištěný lyzát
- inkubovat minimálně 1 hod. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- ze supernatantu odebrat vzorek na SDS-PAGE proteinovou elektroforézu (označení *flow*), zbytek odstranit, k peletu přidat 1 ml 1x PBS vychlazeného na ledu
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant (možno odebrat vzorek na SDS-PAGE proteinovou elektroforézu, označení *wash 1*), k peletu přidat 1 ml 1x PBS vychlazeného na ledu
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- opakovat předchozí tři kroky 1-2x (označení volitelně odebíraných vzorku na SDS-PAGE proteinovou elektroforézu *wash 2-4*)
- odstranit supernatant, k peletu přidat 1 objem elučňního pufru
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odebrat supernatant do čisté mikrozkuřavky, odebrat z něj vzorek na SDS-PAGE proteinovou elektroforézu (označení *eluce 1*), k peletu přidat 1 objem elučňního pufru
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odebrat supernatant do čisté mikrozkuřavky, odebrat z něj vzorek na SDS-PAGE proteinovou elektroforézu (označení *eluce 2*)
- k peletu přidat 1 objem 2x vzorkového pufru pro SDS-PAGE proteinovou elektroforézu a odebrat vzorek na SDS-PAGE proteinovou elektroforézu (označení *matrice*)

#### 4.2.3.3 Produkce proteinů v bezbuněčném *in vitro* translačním systému

- vektor plasmidového typu pIVEX (nebo vektor podobných parametrů) kódující požadovaný protein pod kontrolou T7 promotoru izolovat z buněk *E. coli* podle protokolu 4.2.2.1.2 nebo 4.2.2.1.3
- izolovaný vektor přecistit pomocí protokolu 4.2.2.1.2, ale místo pufru S1 použít roztok I (bez ribonukleáz), naředit vektor na množství 5-15  $\mu\text{l}$  do objemu 50  $\mu\text{l}$  pomocí ddH<sub>2</sub>O
- jednotlivé lyofilizované komponenty soupravy Rapid Translation System RTS 500 rekonstituovat přidáním příslušných objemů dodaného pufru
- připravit *feeding* roztok smícháním 10,5 ml *Feeding Mix* roztoku a 0,5 ml *Energy Mix* roztoku, promíchat jemným otáčením zkumavky
- připravit *reaction* roztok smícháním 0,25 ml *E. coli Lysate* roztoku, 0,75 ml *Reaction Mix* roztoku, 50  $\mu\text{l}$  *Energy Mix* roztoku a 50  $\mu\text{l}$  připraveného vektoru, promíchat jemným otáčením zkumavky
- naplnit *reaction* komoru dodaného reakčního zařízení 1 ml *reaction* roztoku
- naplnit *feeding* komoru dodaného reakčního zařízení 10 ml *feeding* roztoku a odstranit bubliny jemným poklepáním na reakční zařízení
- položit reakční zařízení na magnetickou míchačku *reaction* komorou dolů, upevnit reakční zařízení k magnetické míchačce a nastavit míchání na 120-180 otáček za minutu
- inkubovat 24 hod. v termostatu při teplotě 30 °C
- přenést *reaction* roztok do čisté mikrozskumavky, analyzovat 1-5  $\mu\text{l}$  pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy, uchovávat při teplotě -20 °C nebo při teplotě 4 °C, pokud dojde k brzkému dalšímu zpracování

#### 4.2.3.4 Purifikace proteinů s HIS-epitopem z *in vitro* translačního systému

- kolonku Poly-Prep Chromatography Column (BIO-RAD) naplnit 1 ml Ni-NTA Superflow uchovávané při teplotě 4 °C, pracovat v chladové místnosti
- sestavenou kolonku promýt 5 ml pufru TN
- *reaction* roztok po proběhlé *in vitro* translační reakci nechat protéct kolonkou
- kolonku promýt 25 ml pufru TN
- kolonku promýt 25 ml omývacího pufru
- kolonku promýt 1 ml elučního pufru 1, jímát do mikrozskumavky

- kolonku promýt 2 ml elučního pufru 2, jímat frakce po 0,5 ml do mikrozkušavek
- kolonku promýt 2 ml elučního pufru 3, jímat frakce po 0,5 ml do mikrozkušavek
- kolonku promýt 1 ml elučního pufru 4, jímat do mikrozkušavky
- analyzovat 15  $\mu$ l vybraných frakcí pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy

#### 4.2.3.5 Příprava kvasinkových lyzátů

##### 4.2.3.5.1 Příprava kvasinkových lyzátů s vysokým výtěžkem

- kvasinkovou kulturu nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 5 ml média YPD, YPD + G-418 nebo YPGal
- přeočkovat do 5 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,05-0,2
- inkubovat při teplotě 28 °C do požadované optické hustoty
- 3 ml kultury zchladit na ledu, od tohoto kroku vše při 4 °C nebo na ledu
- centrifugovat 30 s/14000g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, k peletu přidat 1 ml ddH<sub>2</sub>O a důkladně promíchat
- centrifugovat 30 s/14000g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, pelet zmrazit v kapalném dusíku 3 min.
- k peletu přidat 100  $\mu$ l 1 M NaOH + 7 % (v/v)  $\beta$ -merkaptoethanol (čerstvě připravit)
- inkubovat 2 min. při pokojové teplotě, průběžně promíchat
- přidat 100  $\mu$ l 50 % (v/v) TCA
- inkubovat 5 min. na ledu
- centrifugovat 5 min./14000g při teplotě 4°C
- dokonale odstranit supernatant, pelet resuspendovat pipetováním v 500  $\mu$ l ledového roztoku 1 M Tris-HCl pH 8
- centrifugovat 1 min./14000g při teplotě 4°C
- odstranit supernatant, k peletu přidat 100-150  $\mu$ l 2x vzorkového pufru pro SDS-PAGE proteinovou elektroforézu \*, dokonale promíchat
- inkubovat 5 min. v termobloku při teplotě 100 °C
- 5-15  $\mu$ l analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy

\* pro měření celkové koncentrace proteinů ve vzorku soupravou QuantiPro™ BCA Assay Kit místo tohoto kroku přidat 40  $\mu$ l 5 % (w/v) SDS

#### 4.2.3.5.2 Příprava kvasinkových lyzátů pomocí roztoku Y-PER™ Yeast Protein

##### Extraction Reagent

- kvasinkovou kulturu nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 30 ml média YPD, YPD + G-418 nebo YPGal
- přeočkovat do 50-500 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,1-0,2
- inkubovat při teplotě 28 °C do požadované optické denzity
- centrifugovat 10 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, k peletu přidat 30 ml ddH<sub>2</sub>O, důkladně promíchat
- centrifugovat 10 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, zvážit pelet, přidat 2,5-5 µl roztoku Y-PER™ Yeast Protein Extraction Reagent na každý mg peletu
- inkubovat 20 min. při pokojové teplotě, občas promíchávat
- centrifugovat 10 min./14000g při teplotě 4 °C
- supernatant přenést do čistých mikrozkušavek, možno uchovávat při teplotě -80 °C
- 10-25 µl analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy

#### 4.2.3.5.3 Příprava lyzátů z kvasinkových protoplastů

- kvasinkovou kulturu nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 50 ml média YPD nebo YPD + G-418
- přeočkovat do 50-500 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,2
- inkubovat při teplotě 28 °C do požadované optické denzity
- centrifugovat 10 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v čerstvě připravených 30 ml 60 mM EDTA-NaOH pH 8 + 1 % (v/v) β-merkptoethanol
- inkubovat 20 min. při pokojové teplotě
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 50 ml pufru TKCl
- centrifugovat 5 min./4000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 30 ml pufru TKCl + 5 mg lytikázy
- inkubovat 10 min. při pokojové teplotě

- (kontrola protoplastů: 20  $\mu$ l suspenze kápnout na podložní sklo, přikrýt krycím sklem, pozorovat v mikroskopu při zvětšení 500x, ke hraně krycího skla přidat 10-20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, protoplasty praskají)
- centrifugovat 5 min./3000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet opatrně kývavě otáčivým pohybem resuspendovat v 50 ml pufru TKCl
- centrifugovat 5 min./3000g při pokojové teplotě
- odstranit supernatant, pelet opatrně kývavě otáčivým pohybem resuspendovat v 50 ml pufru TKCl
- centrifugovat 5 min./3000g při pokojové teplotě
- dokonale odstranit veškerý supernatant, pelet zchladit na ledu 5 min
- pelet opatrně kývavě otáčivým pohybem resuspendovat v 2-7 ml ledového pufru TM + 1 tableta směsi inhibitorů proteáz a 1 mM PMSF
- přenést pelet do Dounceova homogenizátoru vychlazeného na ledu, skleněným pístem pomalu pohybovat 5x nahoru a dolů
- (kontrola lyze protoplastů: 20  $\mu$ l suspenze kápnout na podložní sklo, přikrýt krycím sklem, pozorovat v mikroskopu při zvětšení 500x)
- centrifugovat 20 min./20000g při 4 °C
- supernatant odebrat do čistých mikroskopů, možno uchovávat při teplotě -80 °C
- 10-25  $\mu$ l analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy

#### 4.2.3.6 Imunoprecipitace proteinů z kvasinek

- kvasinkovou kulturu nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 50 ml média YPD nebo YPD + G-418
- přeočkovat do 50-500 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,2
- inkubovat při teplotě 28 °C do požadované optické denzity
- buňky umístit na led, dále pracovat při teplotě 4 °C nebo na ledu
- centrifugovat 10 min./4000g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 40 ml ddH<sub>2</sub>O vychlazené na ledu
- centrifugovat 10 min./4000g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, pelet resuspendovat v 1 objemu vychlazené ddH<sub>2</sub>O, suspenzi rozdělit do čistých mikroskopů po 800  $\mu$ l

- centrifugovat 30 s/14000g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, k peletu v každé mikrozkušavce přidat 1,5 objemu skleněných kuliček o průměru 0,45 mm a 400 µl vychlazeného nedenedaturujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, dokonale promíchat
- inkubovat v oscilačním kulovém mlýnku MM301 (Retsch®) 3 min. při frekvenci 30 kmitů/s (alternativně intenzivně promíchávat 5x 30 s v chladové místnosti, mezitím inkubovat na ledu)
- centrifugovat 1 min./14000g při teplotě 4 °C
- odebrat supernatant do čisté mikrozkušavky, k peletu v každé mikrozkušavce přidat 200 µl vychlazeného nedenedaturujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, dokonale promíchat
- centrifugovat 1 min./14000g při teplotě 4 °C
- odebrat supernatant a přidat k již odebranému supernatantu
- (alternativně místo předchozích 4 kroků inkubovat na ledu do doby, než se skleněné kuličky samovolně usadí na dně, odebrat suspenzi buněk a pufru do čistých mikrozkušavek, kuličky v každé mikrozkušavce resuspendovat v 200 µl vychlazeného nedenedaturujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, přidat roztok z resuspendovaných kuliček k již odebrané suspenzi a sonikovat 45x 20 s při 50% amplitudě v sonikátoru Q700 Sonicator (QSONICA), mezi jednotlivými sonikacemi 1 min. chladit na ledu)
- centrifugovat 20 min./20000g při teplotě 4 °C
- supernatant(=lyzát) odebrat do čistých mikrozkušavek, možno uchovávat při teplotě -80 °C 10-25 µl analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy (označení lyzát)
- (volitelně pro další práci k lyzátu přidat 2 objemy vychlazeného nedenedaturujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF)
- jemně promíchat zásobní suspenzi Protein G-agarosy uchovávanou při teplotě 4 °C, odebrat 20-30 µl na každých 50 ml vstupní kultury
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, k Protein G-agarose přidat 600 µl vychlazeného nedenedaturujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, jemně promíchat
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- opakovat předchozí tři kroky 2x

- odstranit supernatant, k Protein G-agarose přidat 1 ml vychlazeného nedenuujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, jemně promíchat, odebrat 75  $\mu$ l a přidat k lyzátu
- inkubovat minimálně 1 hod. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odebrat supernatant do čisté mikrokumavky, přidat 925  $\mu$ l promyté Protein G-agarosy, přidat protilátku v požadovaném množství (většinou 1-2  $\mu$ l)
- inkubovat přes noc na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odebrat supernatant (volitelně analyzovat 10-25  $\mu$ l pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy – označení *flow*), k peletu přidat 4 ml vychlazeného nedenuujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, jemně promíchat
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- odstranit supernatant, k peletu přidat 4 ml vychlazeného nedenuujícího lyzačního pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, jemně promíchat
- inkubovat 10 min. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- centrifugovat 5 min./500g při teplotě 4 °C
- opakovat předchozí tři kroky 1x
- k peletu přidat 0,33 objemu 3x vzorkového pufru pro SDS-PAGE proteinovou elektroforézu, 20-25  $\mu$ l analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy (označení IP = imunoprecipitace)

#### 4.2.3.7 Imunoprecipitace proteinů s GFP-epitopem z kvasinkových lyzátů

- lyzát požadované kvasinkové kultury připravit podle protokolu 4.2.3.5.3 nebo podle protokolu 4.2.3.6, ale místo nedenuujícího lyzačního pufru použít lyzační pufr + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, 20-25  $\mu$ l lyzátu analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy (označení lyzát)
- pokud byl k přípravě lyzátu použit lyzační pufr, přidat k lyzátu 2 objemy omývacího pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF

- důkladně promíchat zásobní suspenzi GFP-Trap<sup>®</sup>\_M uchovávanou při 4 °C, odebrat 20-35 µl do čisté mikrozkuřavky, přidat 500 µl vychlazeného omývacího pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, důkladně promíchat
- inkubovat 3 min. v magnetickém stojánku na ledu
- odstranit supernatant, přidat 500 µl vychlazeného omývacího pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, důkladně promíchat
- inkubovat 3 min. v magnetickém stojánku na ledu
- opakovat předchozí dva kroky 1x
- odstranit supernatant, přidat lyzát
- inkubovat 1-24 hod. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C
- inkubovat 3 min. v magnetickém stojánku na ledu
- odstranit supernatant (volitelně analyzovat 20-25 µl pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy – označení *flow*), přidat 500 µl vychlazeného omývacího pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, důkladně promíchat
- inkubovat 3 min. v magnetickém stojánku na ledu
- odstranit supernatant, přidat 500 µl vychlazeného omývacího pufru + směs inhibitorů proteáz + 1 mM PMSF, důkladně promíchat
- inkubovat 3 min. v magnetickém stojánku na ledu
- opakovat předchozí dva kroky 1-2x
- odstranit supernatant, přidat 60-75 µl 2x vzorkového pufru pro SDS-PAGE proteinovou elektroforézu, 20-25 µl analyzovat pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy (označení IP)

#### 4.2.3.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou s kyselinou bicinoninovou

- lyzát připravený podle protokolu 4.2.3.5.1 ředit 500x a 1000x pomocí ddH<sub>2</sub>O
- nanést do mikrotitrační destičky 75 µl ddH<sub>2</sub>O a 75 µl ředící řady proteinového standardu BSA o koncentracích 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 µg/ml
- nanést do mikrotitrační destičky 75 µl 500x a 1000x ředěného lyzátu v triplikátech
- přidat ke každému vzorku na destičce 75 µl směsi dodaných roztoků QB, QA a síranu měďnatého v poměru 25:25:1 ze soupravy QuantiPro<sup>™</sup> BCA Assay Kit
- inkubovat 2 hod. v termostatu při teplotě 37 °C



- změřit absorbanci každého vzorku při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru pro mikrotitrační destičky Epoch™ Microplate Reader (BioTek®)
- sestavit kalibrační křivku v programu Gen5™ software (BioTek®)
- podle rovnice regresní přímky dopočítat celkovou koncentraci proteinů ve vzorku

### 4.2.3.9 Polyakrylamidová proteinová elektroforéza SDS-PAGE

#### 4.2.3.9.1 Příprava polyakrylamidového gelu

- použít skla a další příslušenství pro elektroforézu ze soupravy Mini-PROTEAN® 3 (BIO-RAD)
- podle hodnot uvedených v Tabulce 3 připravit roztok dělicího gelu, persíran amonný (APS) a TEMED přidat nakonec, důkladně promíchat
- přenést rychle mezi skla, převrstvit převrstvovacím pufrem
- inkubovat cca 30 min. při pokojové teplotě
- odstranit převrstvovací pufr a vysušit skla nad gelem filtračním papírem
- připravit roztok zaostřovacího gelu, složení na 2 gely: 0,65 ml směsi akrylamidu + N,N'-metylenbisakrylamidu; 1,25 ml 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8; 3,05 ml ddH<sub>2</sub>O; nakonec přidat 37,5 µl APS a 7,5 µl TEMED
- přelít zaostřovacím gelem a vložit hřebínky
- inkubovat cca 20 min. při pokojové teplotě
- gely je možno uchovávat několik dní zabalené ve filtračním papíru namočeném v převrstvovacím pufru nebo ddH<sub>2</sub>O a neprodyšně uzavřené při teplotě 4 °C

#### 4.2.3.9.2 Příprava gradientového polyakrylamidového gelu

- připravit dva roztoky dělicího gelu pro krajní hodnoty koncentrace požadovaného gradientu podle hodnot uvedených v Tabulce 3, oba roztoky připravit v objemu 2,75-3 ml
- přenést oba roztoky do míchačky gradientů, roztok o vyšší koncentraci umístit do přihrádky blíže k výpusti
- vložit do roztoku o vyšší koncentraci magnetické míchátko, zapnout míchání, otevřít uzávěr mezi roztoky a výpust' umístěnou mezi skla

- převrstvit převrstvovacím pufrem a dále postupovat jako v případě běžného gelu počínaje bodem 4

Koncentrace gelu (%)	5	6	7	8	9	10	12	13	15	20
ddH <sub>2</sub> O	8,75	8,25	7,75	7,25	6,75	6,25	5,25	4,75	3,75	1,25
4x Tris-HCl/SDS pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
akrylamid + N,N' methylen-bisakrylamid	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	6,5	7,5	10
10 % (w/v) APS	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
TEMED	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015

**Tabulka 3:** Použité objemy jednotlivých komponent pro přípravu roztoku dělicího gelu o požadované koncentraci polyakrylamidu. Uváděné objemy jsou v mililitrech. Objem dělicího roztoku připraveného podle této tabulky vystačí na přípravu dvou gelů.

#### 4.2.3.9.3 Elektroforetické dělení

- vytáhnout hřebínek, propláchnout jamky pomocí stříkačky naplněné 1x SDS pufrem
- vložit skla s polyakrylamidovým gelem do elektroforetické aparatury, nalít dostatečné množství 1x SDS pufru
- nanést vzorky smíchané se vzorkovým pufrem pro SDS-PAGE elektroforézu a inkubované v termobloku 5-10 min. při teplotě 100 °C
- zapojit elektroforetický přístroj do elektrického pole o konstantním napětí 150 V po dobu 1-1,5 hod.

#### 4.2.3.10 Western blot

- rozebrat elektroforetickou aparaturu, odstranit zaostřovací gel, dělicí gel inkubovat 15 min. v blotovacím roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- na blotovací přístroj Owl HEP-1 (Thermo Scientific) naskládat 3 filtrační papíry Whatmann® 3MM, polyakrylamidový gel, nitrocelulózovou membránu o poréznosti

0,2  $\mu\text{m}$  NC2 (Serva) nebo PVDF membránu\* o poréznosti 0,2  $\mu\text{m}$  Immun-Blot<sup>®</sup> PVDF Membrane (BIO-RAD) a 3 filtrační papíry Whatmann<sup>®</sup> 3MM

- všechny vrstvy nejdříve namočit v blotovacím roztoku
- vytlačit bubliny zkumavkou a přiklopit druhým dílem blotovacího přístroje
- přístroj zapojit do elektrického pole o konstantním proudu 2 mA/cm<sup>2</sup> membrány (standardně 96 mA na membránu) po dobu 1-1,5 hod
- rozebrat blotovací přístroj, tužkou označit pozici jednotlivých proteinů předbarveného standardu molekulových hmotností a stranu membrány, která byla v kontaktu s gelem
- gel obarvit pomocí *Coomassie Brilliant Blue G-250* viz protokol 4.2.3.12.1
- membránu inkubovat 1 hod. v blokovacím roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- membránu inkubovat na otočném zrcadle přes noc při teplotě 4 °C zatavenou do fólie spolu s primární protilátkou naředěnou v blokovacím roztoku
- membránu promýt 2x 15 min. v odmyvacím roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- membránu inkubovat 20 min. v blokovacím roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- membránu inkubovat 2-3 hod. na otočném zrcadle při teplotě 4 °C zatavenou do fólie spolu se sekundární protilátkou naředěnou v blokovacím roztoku
- membránu promýt 3x15 min. v odmyvacím roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- analyzovat chemiluminiscenčně

\* při použití PVDF membrány nejprve PVDF membránu inkubovat 2 s v 100 % (v/v) methanolu při pokojové teplotě, poté inkubovat v ddH<sub>2</sub>O 10-15 min. na kývačce při pokojové teplotě

#### 4.2.3.11 Chemiluminiscenční detekce

##### 4.2.3.11.1 Detekce na rentgenový film

- připravit 2x roztok 18 ml ddH<sub>2</sub>O + 2 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,5
- k jednomu roztoku přidat 12  $\mu\text{l}$  30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- k druhému roztoku přidat 200  $\mu\text{l}$  roztoku luminolu a 88  $\mu\text{l}$  roztoku kyseliny p-kumarové
- těsně před použitím roztoky smíchat, krátce inkubovat s membránou
- membránu založit do kazety s rentgenovým filmem Medix (FOMA), pracovat v temné komoře
- inkubovat v kazetě podle očekávané intenzity signálu 5 min. až 1 hod

- film inkubovat 5-10 min. v 1x upravené vývojce, opláchnout pomocí destilované vody
- film inkubovat 10-15 min. v 1x upraveném ustalovači
- film inkubovat 15 min. pod tekoucí vodou, poté nechat oschnout
- po oschnutí na vyvolaný film vyznačit pozici membrány a standardu molekulových hmotností
- pro další práci naskenovat film v rozlišení 300 bodů na palec a více, uložit na pevný disk počítače

#### 4.2.3.11.2 Detekce pomocí přístroje ImageQuant™ LAS 4000

- připravit 2x roztok 4,5 ml ddH<sub>2</sub>O + 0,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,5
- k jednomu roztoku přidat 3 µl 30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- k druhému roztoku přidat 50 µl roztoku luminolu a 22 µl roztoku kyseliny p-kumarové
- těsně před použitím roztoky smíchat, roztokem pokrýt celou plochu membrány
- membránu založit do Eurofolie a na folii vyznačit fixem pozici jednotlivých proteinů předbarveného standardu molekulových hmotností
- membránu v Eurofolii vložit do přístroje ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare)
- nastavit chemiluminiscenční režim přístroje v dodaném software
- zvolit vhodný režim citlivosti, rozlišení a času snímání vzhledem k intenzitě signálu, snímky uložit na pevný disk počítače
- nastavit *in vivo* režim přístroje v dodaném software
- snímat pozici vyznačených proteinů předbarveného standardu molekulových hmotností, snímky uložit na pevný disk počítače

#### 4.2.3.12 Barvení polyakrylamidových gelů

##### 4.2.3.12.1 Barvení pomocí *Coomassie Brilliant Blue G-250*

- po rozebrání elektroforetického nebo blotovacího přístroje inkubovat gel 15-30 min. ve fixačním roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- inkubovat gel přes noc v roztoku *Coomassie Blue* na kývačce při pokojové teplotě
- promývat ddH<sub>2</sub>O na kývačce při pokojové teplotě do odbarvení gelu

- gel vysušit viz protokol 4.2.3.13 nebo obarvit stříbrem viz protokol 4.2.3.12.2 nebo 4.2.3.12.3, případně vložit do Eurofolie, naskenovat v rozlišení 300 bodů na palec a více, uložit na pevný disk počítače

#### 4.2.3.12.2 Barvení stříbrem

- gel obarvený pomocí roztoku *Coomassie Blue* inkubovat 30 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml prefixačního roztoku [50 % (v/v) methanol + 10 % (v/v) kyselina octová]
- inkubovat 30 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml promývacího roztoku [5 % (v/v) methanol + 7 % (v/v) kyselina octová]
- inkubovat 30-45 min. na kývačce při pokojové teplotě v 25 ml 5 % (v/v) glutaraldehydu (lze použít opakovaně až 10x, skladovat při teplotě 4 °C)
- oplachovat 3x 15 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml ddH<sub>2</sub>O
- inkubovat 20 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml roztoku 32 μM DTT
- inkubovat 20 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml 0,1 % (w/v) roztoku AgNO<sub>3</sub>
- opláchnout 1 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml ddH<sub>2</sub>O
- inkubovat v 25 ml vyvíjecího roztoku [3 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1/1000 objemu formaldehydu] dokud roztok nezačne hnědnout, poté okamžitě odstranit
- inkubovat v 25 ml vyvíjecího roztoku dokud roztok nezačne hnědnout, poté okamžitě odstranit
- inkubovat v 25 ml vyvíjecího roztoku téměř do požadovaného zbarvení proteinových pruhů
- okamžitě přidat 5 ml roztoku 2,3 M kyseliny citrónové, inkubovat 10 min. na kývačce při pokojové teplotě
- oplachovat 3x 15 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml ddH<sub>2</sub>O
- gel vysušit viz protokol 4.2.3.13 nebo vložit do Eurofolie, naskenovat v rozlišení 300 bodů na palec a více, uložit na pevný disk počítače

#### 4.2.3.12.3 Rychlé barvení stříbrem

- gel obarvený pomocí roztoku *Coomassie Blue* inkubovat 10 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml 50 % (v/v) methanolu
- inkubovat 10 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml 5 % (v/v) methanolu

- inkubovat 10 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml roztoku 32  $\mu$ M DTT
- inkubovat 10 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml 0,1 % (w/v) roztoku  $\text{AgNO}_3$
- opláchnout 1 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$
- inkubovat v 50 ml vyvíjecího roztoku [3 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 1/2000 objemu formaldehydu] dokud roztok nezačne hnědnout, poté okamžitě odstranit
- inkubovat v 50 ml vyvíjecího roztoku dokud roztok nezačne hnědnout, poté okamžitě odstranit
- inkubovat v 50 ml vyvíjecího roztoku téměř do požadovaného zbarvení proteinových pruhů
- okamžitě začít přisypávat bezvodou kyselinu citrónovou, dokud roztok s gelem šumí
- oplachovat 3x 15 min. na kývačce při pokojové teplotě v 50 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$
- gel vysušit viz protokol 4.2.3.13 nebo vložit do Eurofolie, naskenovat v rozlišení 300 bodů na palec a více, uložit na pevný disk počítače

#### 4.2.3.13 Sušení polyakrylamidových gelů

- po obarvení gelu odmývat  $\text{ddH}_2\text{O}$  na kývačce při pokojové teplotě do odbarvení pozadí
- inkubovat 30 min. v sušicím roztoku
- přenést na dvě vrstvy filtračního papíru Whatmann® 3MM, překrýt potravinovou fólií
- sušit 2 hod. na sušičce gelů Gel Dryer Model 583 (BIO-RAD) při 80 °C
- naskenovat v rozlišení 300 bodů na palec a více, uložit na pevný disk počítače

#### 4.2.3.14 Odstranění protilátek z již analyzované *Western blot* membrány

- připravit 40 ml stripovacího roztoku (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2,05 % (w/v) SDS; 0,75 % (v/v)  $\beta$ -merkaptoethanol)
- inkubovat membránu 30 min. se 40 ml stripovacího roztoku v nádobě umístěné na vodní lázni o teplotě 50 °C, občas promíchat
- inkubovat membránu 4x 20 min. v 50 ml odmývacího roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- inkubovat 1 hod. v 50 ml blokovacího roztoku na kývačce při pokojové teplotě
- pokračovat protokolem 4.2.3.10 od bodu 9

#### 4.2.3.15 Semikvantitativní analýza exprese pomocí *Western blot*

- kvasinkovou kulturu nechat narůst přes noc při teplotě 28 °C v 10 ml příslušného média
- přeočkovat do 400 ml vytemperovaného média teploty 28 °C na OD<sub>600</sub> 0,05 a inkubovat při teplotě 28 °C
- v pravidelných intervalech měřit optickou denzitu a odebírat vzorky kultury
- z odebraných vzorků kultury připravit lyzáty podle protokolu 4.2.3.5.1
- stanovit celkovou koncentraci proteinů v lyzátech podle protokolu 4.2.3.8
- objemy každého vzorku o stejné koncentraci proteinů rozdělit pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy podle protokolu 4.2.3.9
- protein našeho zájmu a protein sloužící jako kontrola u každého vzorku analyzovat pomocí metody *Western blot* a detekovat viz protokoly 4.2.3.10 a 4.2.3.11
- stanovit relativní sumu intenzity pruhu proteinu našeho zájmu a relativní sumu intenzity pruhu kontrolního proteinu pro každý vzorek pomocí programu Carestream (Kodak)
- vypočítat podíl relativní sumy intenzity pruhu kontrolního proteinu a relativní sumy intenzity pruhu proteinu našeho zájmu pro každý vzorek a vynést do grafu

#### 4.2.4 Práce s obrazovými daty

Digitalizovaná obrazová data gelů agarosových elektroforéz DNA, gelů proteinových SDS-PAGE elektroforéz, rentgenových filmů a snímků chemiluminiscenčně detekovaných proteinů metodou *Western Blot* zobrazená v této práci byla různě upravena. Úprava probíhala v programech Carestream (Kodak), Adobe® Photoshop® CS5 (Adobe Systems Inc.), ImageJ 1.46p (National Institutes of Health). Vždy se jednalo vědecky akceptovatelné úpravy, které měly za cíl zpřehlednit zobrazovanou skutečnost, případně zobrazovanou skutečnost učinit lépe viditelnou. Mezi běžně použité úpravy patřilo oříznutí oblasti obrazu nezobrazující nic relevantního, otočení obrazu v prostoru, zrcadlové otočení obrazu v prostoru, odbarvení obrazu, invertování barev obrazu, změna velikosti obrazu, změna jasu a kontrastu obrazu. V programu Adobe® Photoshop® CS5 byly v některých případech upraveny křivky a úrovně obrazu. V programu ImageJ 1.46p bylo funkcí Image Calculator skládáno v jediný obraz několik, v různých intervalech po sobě zachycených snímků proteinů, chemiluminiscenčně detekovaných podle protokolu 4.2.3.11.2.

## 4.2.5 Bioinformatické analýzy

Pokud není uvedeno jinak, bylo použito standardního nastavení programů.

### **Příprava konstruktů DNA *in silico* a tvorba schémat vektorů**

Clone Manager 9.2 Professional Edition (Scientific & Educational Software)

### **Kontrola elektroforetogramu sekvenování DNA**

ChromasPro 1.34 (Technelysium Pty Ltd)

### **Porovnávání sekvencí *in silico* konstruktů DNA s výsledky sekvenování DNA**

ClustalW 1.81 v prostředí programu BioEdit 7.0.5.3 (HALL 1999)

### **Návrh sekvencí oligonukleotidových primerů**

OligoAnalyser 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>)

### **Prohledávání databází sekvencí DNA**

BLASTN<sup>®</sup> (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### **Prohledávání databází sekvencí proteinů**

BLASTP<sup>®</sup> (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### **Porovnávání sekvencí proteinů**

ClustalW 2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

manuálně v prostředí programu BioEdit 7.0.5.3 (HALL 1999)

### **Kontrola lokální spolehlivosti porovnání sekvencí proteinů**

Core (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:core>) (DI TOMMASO *et al.* 2011)

### **Barevné zobrazení porovnání sekvencí proteinů**

BoxShade 3.21 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html))



### **Predikce terciální struktury proteinů *de novo***

Robetta (<http://robetta.bakerlab.org/>) (KIM *et al.* 2004)

### **Prohledávání databáze terciálních struktur proteinů**

DaliLite v. 3 ([http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server/start](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/start)) (HOLM a ROSENSTRÖM 2010)

### **Strukturní porovnávání terciálních struktur proteinů**

DaliLite v. 3 ([http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server/start](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/start)) (HOLM a ROSENSTRÖM 2010)

The PyMOL Molecular Graphic System 1.3 (Schrödinger LLC.)

### **Vizualizace terciálních struktur proteinů**

The PyMOL Molecular Graphic System 1.3 (Schrödinger LLC.)

### **Tvorba *maximum likelihood* fylogenetických stromů**

PhyML 3.0 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PHYML/interface.html>) (GUINDON *et al.* 2010)

Použité nastavení: substituční model – LG, rovnovážné frekvence – odhadnout použitím substitučního modelu, proporce neměnných míst – odhadnout z dat, parametr gamma tvaru – odhadnout z dat, počáteční strom – BioNJ, optimalizace počátečního stromu – topologie stromu a délka větví, vylepšení stromu – *subtree pruning* a *regrafting*, podpora větví – *SH-like* podpora

### **Vizualizace fylogenetických stromů**

Rainbow Tree

(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RAINBOWTREE/rainbowtree.html>)

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Bioinformatická charakterizace transkripčního aparátu lineárních plasmidů

#### 5.1.1 Sekvenční analýza RNA polymerázy (ORF6-pGKL2 a ORF7-pGKL2)

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.3.4, předpokládá se, že lineární plasmidy kvasinek kódují nekanonickou vícepodjednotkovou RNA polymerázu. Aminokyselinová sekvence proteinu ORF6-pGKL2 vykazuje sekvenční podobnost k několika konzervovaným oblastem  $\beta$  i  $\beta'$  podjednotky kanonických RNA polymeráz (Obrázek 8). Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinu ORF6-pGKL2 a vybraných kanonických RNA polymeráz je dostupné (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010). Kromě oblastí vykazujících podobnost k RNA polymerázám obsahuje protein ORF6-pGKL2 dvě oblasti o velikosti přibližně 100 aminokyselin, které nevykazují sekvenční podobnost k žádným známým proteinům. Tyto oblasti, které byly pojmenovány insert I a insert II (RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010), proteinu ORF6-pGKL2 a proteinů ORF6 ostatních sekvenovaných lineárních plasmidů jsem bioinformaticky analyzoval.

Pomocí programu BLASTP<sup>®</sup> jsem našel slabou sekvenční podobnost insertu I ORF6-pGKL2 k N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázové doméně replikázy viru *Grapevine virus B* patřícího do skupiny Alfavirů (sekvenční identita 29 % s 64 % insertu I, *E value*=6). Porovnáním insertů I proteinů ORF6 se známým porovnáním N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázových domén dalších Alfavirů (ROZANOV *et al.* 1992) jsem zjistil, že sekvenční podobnost insertů I k methyltransferáze Alfavirů je nejzřetelnější v oblasti konzervované domény II a konzervované domény III alfavirové methyltransferázy (Obrázek 11). Alfavirová methyltransferáza obsahuje celkem čtyři konzervované domény a 4 invariantní aminokyselinové zbytky, z nichž 2 se nacházejí v doméně II (ROZANOV *et al.* 1992). Dva konzervované aminokyselinové zbytky domény II se nacházejí v motivu DxxR, a jejich substituce má za následek ztrátu schopnosti methyltransferázy vázat substrát S-adenosyl-L-methionin (SAM), fungující jako donor methylové skupiny (HUANG *et al.* 2004). V insertu I proteinů ORF6 se nachází podobný motiv, konkrétně motiv DxxK a v jednom případě motiv ExxK. Tato zjištění mě vedla k domněnce, že protein ORF6-pGKL2 by mohl mít roli v tvorbě čepičkové struktury na 5' koncích mRNA lineárních plasmidů, i když tvorba čepičkové struktury u Alfavirů se enzymaticky liší od tradiční cesty, pro přehled viz (VOPÁLENSKÝ 2007; GHOSH a LIMA 2010). Vzhledem k tomu, že methyltransferázová aktivita

proteinu ORF3-pGKL2 nebyla prokázána (TIGGEMANN *et al.* 2001; VOPÁLENSKÝ 2007), mě výše uvedená zjištění vedla ještě k prověření důkazů vedoucích k domněnce, že protein ORF3-pGKL2 kóduje N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázu.

		doména II	----- doména III
Grapevine virus B ORF1	107 [22].	VHARDVLEFY.[26].	ITDEVHYWSKDF-QSEIHLGGTQRRLYSVITYPAEL
Apple chlorotic leaf spot v. ORF1	106 [22].	VTAADKARY.[18].	ITDEHYWSRDQLEETPLQVHRP-KNLWATLVFPPEL
Turnip yellow mosaic virus ORF1	99 [19].	LHPNDSTRY.[14].	MEDALMYHPSQIMLEFLRKPNL-EREYASLVVPPEA
Potato virus X ORF1	100 [19].	IEPNDVARY.[18].	ISDTLHFLDPSYIVETIQNCPKL-QTLYATLVLPSEA
K. lactis pGKL2 ORF6	100 [22].	LNWSDIIRY.[24].	IKNEIDLISCYMFECCWLGREE-PRLYYRLVTPGEL
S. kluyveri pSKL ORF6	102 [22].	LNWSDIIRY.[21].	IKNEIDLMIICYMFECCWLGIRKE-SVHPWRLVTPGEL
P. acaciae pPac1-1 ORF6	102 [22].	LNWSDIIRY.[24].	IKNEVDLIHCYMFECCWFDLRKP-PKNNYRLVTPGEL
P. etchellsii pPE1B ORF6	102 [22].	LNYTEIARY.[25].	IKNEVDLINICYMFECCWLGKQT-KVDEHRLVTPGEL
konsensus Alfavirů		D R	e

**Obrázek 11:** Sekvenční podobnost insertu I proteinů ORF6 kvasinkových lineárních plasmidů a konzervované domény II a III N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázy Alfavirů. Ve výsledném porovnání byla zvýrazněna sekvenční identita (černé stínování), pokud se stejná aminokyselina vyskytovala u 60 a více procent sekvencí; sekvenční podobnost (šedé stínování), pokud se podobná aminokyselina vyskytovala u 60 a více procent sekvencí. Čísla v hranatých závorkách udávají počet vynechaných aminokyselinových zbytků v zobrazeném porovnání. Pod porovnáním zobrazena konsensus sekvence u Alfavirů podle (ROZANOV *et al.* 1992), kde velké písmena značí invariantní aminokyselinový zbytek a malá písmena značí aminokyselinový zbytek vyskytující se u 75 a více procent analyzovaných sekvencí. Pro tvorbu porovnání byly použity následující sekvence (číslo v závorce udává GenBank číslo dané sekvence): *Grapevine virus B* ORF1 (NP\_619654), *Apple chlorotic leaf spot virus* ORF1 (BAF64459.1), *Turnip yellow mosaic virus* ORF1 (P10358.2), *Potato virus X* ORF1 (P22591.1), *Kluyveromyces lactis* ORF6-pGKL2 (YP\_001648066.1), *Saccharomyces kluyveri* ORF6-pSKL (CAA38625.1), *Pichia acaciae* ORF6-pPac-1 (CAJ57280.1), *Pichia etchellsii* ORF6-pPE1B (CAC08226.1).

Při použití aminokyselinových sekvencí insertů II ORF6-pSKL a ORF6-pPE1B pro prohledávání databází sekvencí proteinů pomocí programu BLASTP<sup>®</sup> jsem zjistil, že cca 40 aminokyselinových zbytků na N-konci insertů II těchto proteinů je již anotováno jako součást konzervované domény vícepodjednotkových RNA polymeráz v databázi proteinových rodin PFAM (číslo rodiny 04560). Porovnal jsem sekvence insertů II proteinů ORF6 s několika vybranými sekvencemi kanonických RNA polymeráz, jejichž porovnání bylo publikováno dříve (LANE a DARST 2010a), a zjistil jsem, že N-koncová část insertů II proteinů ORF6 vykazuje sekvenční podobnost ke konzervované oblasti β16 a části konzervované oblasti β15 β podjednotky kanonických RNA polymeráz (Obrázek 12). Tuto skutečnost nezávisle na mně zjistil přibližně ve stejnou dobu ještě jiný tým pracovníků (IYER a ARAVIND 2012).

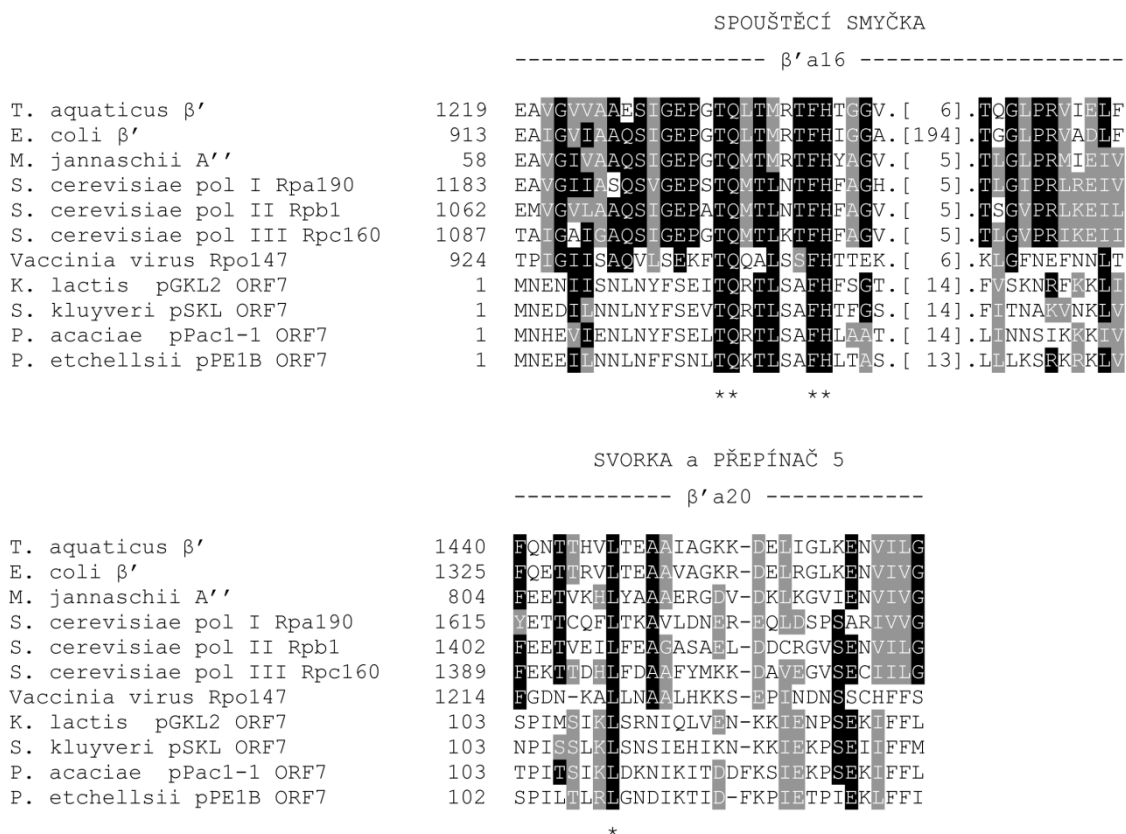
Protein ORF7-pGKL2 údajně vykazuje sekvenční podobnost ke konzervovaným oblastem β'a16 a β'a20 β' podjednotky kanonických RNAP (SCHAFFRATH *et al.* 1995a), nicméně sekvenční porovnání není publikované. Fakt, že by ORF7-pGKL2 měl tvořit menší podjednotku RNA polymerázy, zjevně není mimo osoby přímo pracující s kvasinkovými lineárními plasmidy moc znám.

		PŘEPÍNAČ 3 a 4	----- SVORKA -----
		----- βa15 -----	----- βa16 -----
T. aquaticus β	1053	LTIKSDDIEGRNAAYQATI.[ 8].SVPESFRVLMKELCALALDVTQLDE	
E. coli β	1291	LTVKSDDVNGRTKMYKNIV.[ 8].GMPESFNVLKEIRSLGINIELEDE	
M. jannaschii B'	539	LMDESDPYDICTCSKOCDF.[30].RTPYAFKLLLELKSMLPRLKVR	
S. cerevisiae pol I Rpa135	1092	LLNSSDYTOASVCRECGSI.[66].AIPFVLKYLDSELSAMGIRLRYNVE	
S. cerevisiae pol II Rpb2	1151	LMEASDAFRVHTICGICGLM.[25].HTPYAAKLLFQELMAMNITPRIYTD	
S. cerevisiae pol III Rpc128	1083	LMTSSDAFEVDVODKCGLM.[18].TTPYAAKLLFQELLSMNIAPRLRLE	
Vaccinia virus Rpo132	1074	LKDSEEYQDVYVCENCGDI.[25].DTHVSKVFLTQMNARGVKVKLDFE	
K. lactis pGKL2 ORF6	643	W--SIDRSKTKIDSKTGRI.[ 9].ETGQYFKICLSYMRSLGRDILIKND	
S. kluyveri pSKL ORF6	647	W--SIDKTNLYVCPKSGKI.[ 9].ESHQYFKICLSYMRALGHDILIKNN	
P. acaciae pPac1-1 ORF6	650	W--NIDKTTTYCCPKSGTI.[ 9].EVNQYLLICLSILRALDYDITQTKDN	
P. etchellsii pPE1B ORF6	650	W--SVDRSITKVCPKTGLI.[11].EINQGFICLSYLRGLGYDIRLKN	

**Obrázek 12:** Sekvenční podobnost části insertu II proteinů ORF6 kvasinkových lineárních plasmidů a konzervovaných oblastí β podjednotky kanonických RNAP. Ve výsledném porovnání byla zvýrazněna sekvenční identita (černé stínování), pokud se stejná aminokyselina vyskytovala u 50 a více procent sekvencí; sekvenční podobnost (šedé stínování), pokud se podobná aminokyselina vyskytovala u 50 a více procent sekvencí. Čísla v hranatých závorkách udávají počet vynechaných aminokyselinových zbytků v zobrazeném porovnání. Pro tvorbu porovnání byly použity následující sekvence (číslo v závorce udává GenBank číslo dané sekvence): *Thermus aquaticus* β (CAB65465.2), *E. coli* β (AAC76961.1), *Methanocaldococcus jannaschii* B' (Q60181.1), *S. cerevisiae* Rpa135 (CAA95050.1), *S. cerevisiae* Rpb2 (NP\_014794.1), *S. cerevisiae* Rpc128 (CAA99422.1), *Vaccinia virus* Rpo132 (AAQ93241.1), *Kluyveromyces lactis* ORF6-pGKL2 (YP\_001648066.1), *Saccharomyces kluyveri* ORF6-pSKL (CAA38625.1), *Pichia acaciae* ORF6-pPac-1 (CAJ57280.1), *Pichia etchellsii* ORF6-pPE1B (CAC08226.1).

Rozhodl jsem se tvrzení o sekvenční podobnosti aminokyselin proteinu ORF7-pGKL2 s β' podjednotkami kanonických RNAP prověřit. Při použití aminokyselinových sekvencí proteinů ORF7 pro hledání podobných proteinů pomocí BLASTP® jsem nenašel žádnou podobnost mezi ORF7 a RNA polymerázami. Sestrojením ručního porovnání sekvencí proteinů ORF7 s několika vybranými sekvencemi kanonických RNA polymeráz, jejichž porovnání bylo publikováno dříve (LANE a DARST 2010a), jsem zjistil, že tvrzení o sekvenční podobnosti mezi ORF7-pGKL2 a dvěma oblastmi β' podjednotek bylo pravdivé, viz Obrázek 13.

**Závěr:** Insert I proteinů ORF6 obsahuje potenciální SAM vazebné místo. Skoro polovina insertu II proteinů ORF6 vykazuje sekvenční podobnost ke dvěma C-koncovým konzervovaným oblastem β podjednotky kanonických vícepodjednotkových RNAP. Proteiny ORF7 opravdu vykazují podobnost ke dvěma konzervovaným oblastem β' podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNAP a obsahují naprosto konzervované aminokyselinové zbytky těchto oblastí.



**Obrázek 13:** Sekvenční podobnost proteinů ORF7 kvasinkových lineárních plasmidů a konzervovaných oblastí β'a16 a β'a20 β' podjednotky kanonických RNAP. Zvýraznění porovnání je stejné jako na Obrázku 12. Čísla v hranatých závorkách udávají počet vynechaných aminokyselinových zbytků v zobrazeném porovnání. Hvězdičky označují naprosto konzervované aminokyselinové zbytky všech kanonických RNAP, definované podle (LANE a DARST 2010a). Pro tvorbu porovnání byly použity následující sekvence: *Thermus aquaticus* β' (CAB65466.3), *E. coli* β' (AAC76962.1), *Methanocaldococcus jannaschii* A'' (Q58446.1), *S. cerevisiae* Rpa190 (NP\_014986.1), *S. cerevisiae* Rpb1 (NP\_010141.1), *S. cerevisiae* Rpc160 (NP\_014759.1), *Vaccinia virus* Rpo147 (YP\_232980.1), *Kluyveromyces lactis* ORF7-pGKL2 (YP\_001648067.1), *Saccharomyces kluyveri* ORF7-pSKL (CAA38626.1), *Pichia acaciae* ORF7-pPac-1 (CAJ57281.1), *Pichia etchellsii* ORF7-pPE1B (CAC08227.1).

### 5.1.2 Sekvenční analýza *capping* enzymu (ORF3-pGKL2)

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.2.1.3, aminokyselinová sekvence proteinu ORF3-pGKL2 vykazuje podobnost k tripartitním *capping* enzymům nukleocytoplasmatických virů. 5' RNA-trifosfatázová a mRNA-guanylyltransferázová aktivita tohoto proteinu již byla experimentálně ověřena, ale N<sup>7</sup>-*cap*-methyltransferázová aktivita nikoliv (TIGGEMANN *et al.* 2001). V C-koncové třetině proteinu ORF3-pGKL2 byla nalezena sekvenční podobnost se SAM vazebným místem methyltransferáz tvorbou porovnání o délce 29 aminokyselinových zbytků (LARSEN *et al.* 1998). Rozhodl jsem se prověřit, jestli i další úseky proteinu ORF3-pGKL2 nevykazují podobnost k methyltransferázové doméně. Při použití aminokyselinové sekvence

C-koncové třetiny proteinu ORF3-pGKL2 pro prohledávání databází sekvencí proteinů pomocí programu BLASTP<sup>®</sup> jsem zjistil, že již 127 aminokyselinových zbytků této oblasti (aminokyselinové zbytky 373-500) je anotováno jako součást methyltransferázové domény v databázi konzervovaných domén CDD (číslo domény 213141). Oněch 127 aminokyselin vykazuje sekvenční podobnost k prvním cca dvěma třetinám konzervovaných oblastí N<sup>7</sup>-cap-methyltransferáz definovaných podle porovnání 11 základních sekvencí v databázi proteinových rodin PFAM (číslo rodiny 03291). Vytvořil jsem manuální porovnání proteinů ORF3 s 11 základními sekvencemi proteinové rodiny PFAM 03291 a podařilo se mi odhalit další dosud nedetekovanou sekvenční podobnost proteinů ORF3 s N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázami (Obrázek 14). Tato podobnost odpovídá cca 20 aminokyselinovým zbytkům úplného C-konce proteinů ORF3 a poslední C-koncové konzervované oblasti N<sup>7</sup>-cap-methyltransferáz.

Variola virus D1R	824	CEGLDVEDLLSYVYVYVFSKR	C-konec
Moll. contagiosum vir. MC090R	930	CRGLDVEELLQYVYVYVFAKR	C-konec
Rabbit fibrioma vir. D3R	816	HEGTDIDLLRYLVYVYVFSKR	C-konec
Mel. sanguinipes entomopoxvir. MSV067	836	TKDNQVLEIMNLEKVIIFKYK.[ 4]	C-konec
S. cerevisiae Abd1	404	VEGDEKKAASYFYTMFAFRKV.[12]	C-konec
Sch.pombe Pcm1	368	IGGQEKKAAG-FYLAFAFBKR.[ 2]	C-konec
C. albicans Abd1	455	AEGDEKKAFA-FYLGFFVFKV	C-konec
A. thaliana At3g20650	322	LSADEWEAAY-LYLVCAFKR.[29]	C-konec
D. melanogaster l(2)35Bd	392	LSKSEWEAAT-LYLVCAFKK.[16]	C-konec
X. laevis Rnmt	382	LSKSEWEATS-LYLVFAFKQ.[ 1]	C-konec
M. musculus Rnmt	445	LSKSEWEATS-LYLVFAFKQ.[ 1]	C-konec
K. lactis pGKL2 ORF3	574	TGSAGEIELSRVYSYHFESKK	C-konec
P. etchellsii pPE1B ORF3	543	FGTESEIILSRVYSYIYIYKEK.[ 2]	C-konec
P. acaciae pPac1-1 ORF3	539	FGTNDIQILSSVYNYIYITR-	C-konec
S. kluyveri pSKL ORF3	543	IGTIQERELSRVYTYHYLKKI.[ 1]	C-konec

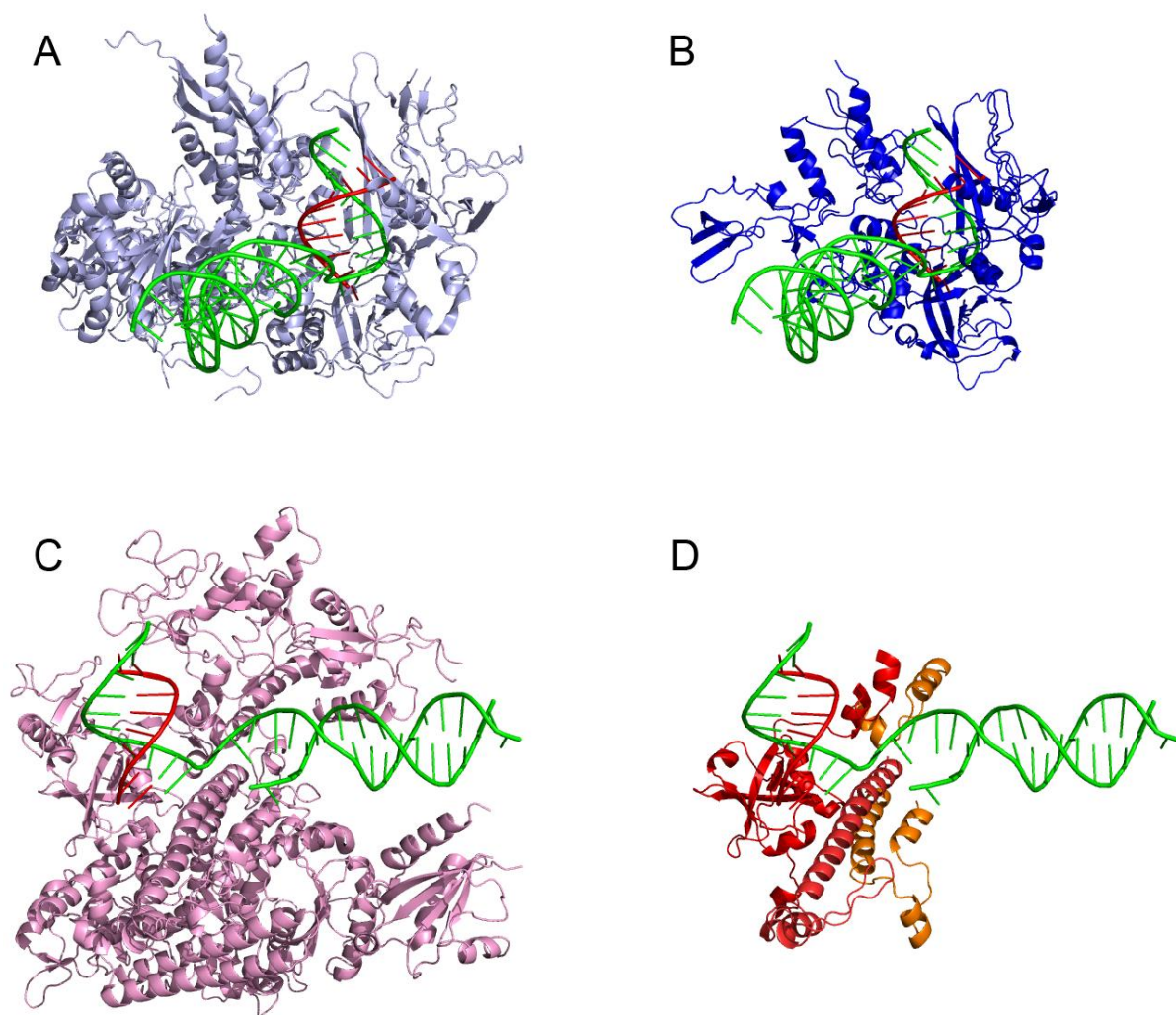
**Obrázek 14:** Sekvenční podobnost C-konce proteinů ORF3 kvasinkových lineárních plasmidů a C-konce N<sup>7</sup>-cap-methyltransferáz. Zvýraznění porovnání je stejné jako na Obrázku 12. Čísla v hranatých závorkách udávají počet vynechaných aminokyselinových zbytků v zobrazeném porovnání. Pro tvorbu porovnání byly použity následující sekvence: *Variola virus* D1R (P33057.1), *Molluscum contagiosum virus* MC090R (Q98257), *Rabbit fibrioma virus* D3R (P25950.1), *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* MSV067 (Q9YW26), *S.cerevisiae* Abd1 (P32783.1), *Schizosaccharomyces pombe* Pcm1 (O74880.2), *Candida albicans* Abd1 (Q5ADX5.1), *Arabidopsis thaliana* At3g20650 (Q9LHQ7.1), *Drosophila melanogaster* l(2)35Bd (Q9VJQ4.2), *Xenopus laevis* Rnmt (Q9I8S2.1), *Mus musculus* Rnmt (Q9D0L8.1), *Kluyveromyces lactis* ORF3-pGKL2 (YP\_001648063.1), *Pichia etchellsii* ORF3-pPE1B (CAC08222.1), *Pichia acaciae* ORF3-pPac-1 (CAJ57276.1), *Saccharomyces kluyveri* ORF3-pSKL (CAA38622.1).

**Závěr:** Sekvenční podobnost C-koncové třetiny proteinů ORF3 k N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázám je větší, než se původně zdálo. Kromě již anotované podobnosti proteinů ORF3 k cca prvním dvěma třetinám methyltransferáz se mi podařilo najít úsek proteinů ORF3 vykazující podobnost i k části poslední třetiny methyltransferáz.

### 5.1.3 Model terciální struktury RNA polymerázy

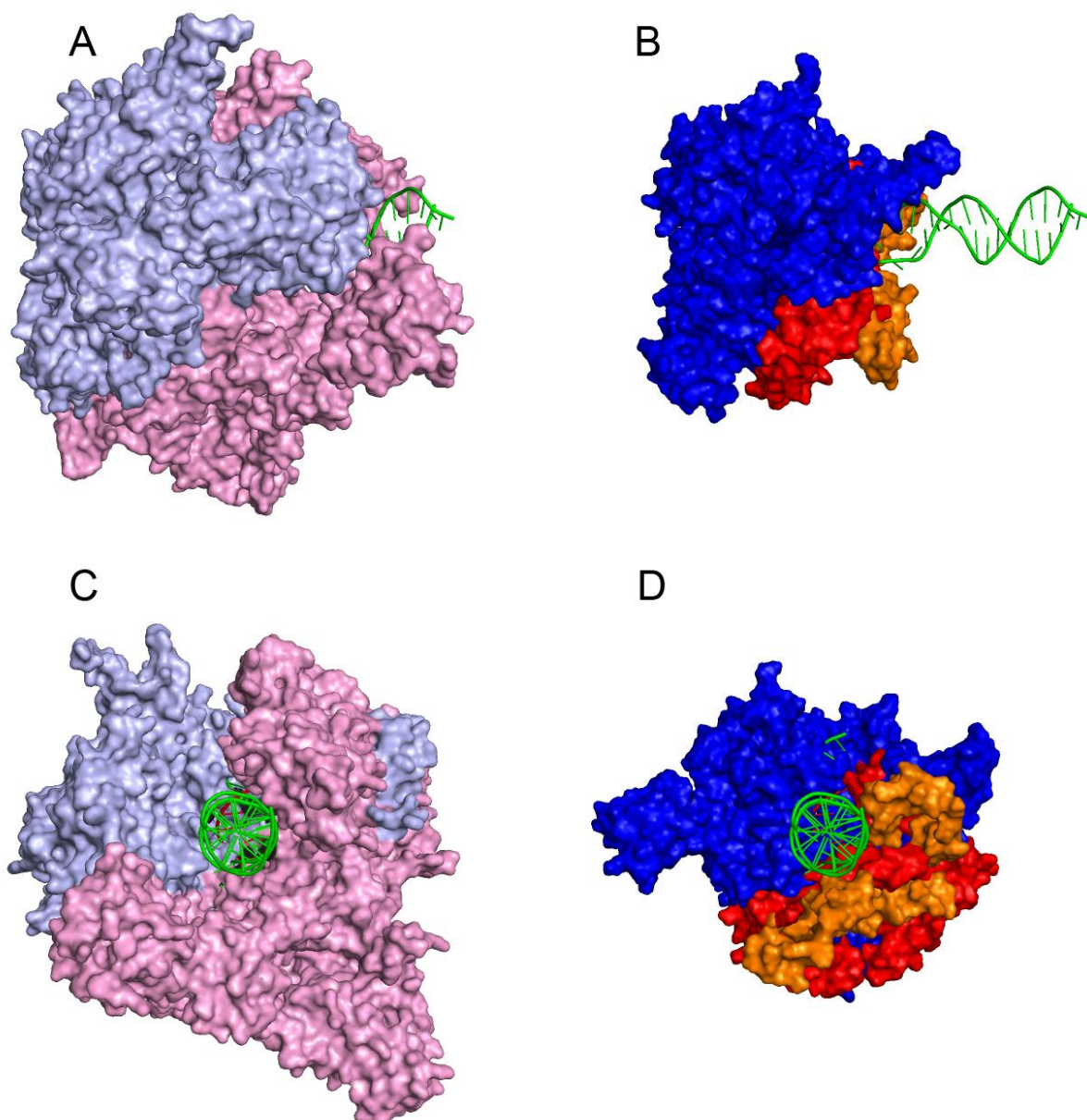
Terciální struktury kanonických vícepodjednotkových RNA polymeráz u některých organismů byly již experimentálně stanoveny. Protože větší část proteinů ORF6-pGKL2 a ORF7-pGKL2 vykazuje sekvenční podobnost ke konzervovaným oblastem kanonických RNAP, rozhodl jsem zkusit vytvořit model terciální struktury pro tyto proteiny. Modelování proběhlo na serveru Robetta, který kombinuje metodu komparativního modelování, pro části sekvence s nalezenou sekvenční podobností k experimentálně určeným strukturám, s metodou *de novo* modelování, pro části sekvence bez nalezené sekvenční podobnosti k experimentálně určeným strukturám. Templát pro komparativní modelování server Robetta vybírá sám. Výstupem serveru je vždy pět strukturních modelů ve formátu PDB. Všechny predikované modely jsem pokaždé podle jejich terciální struktury porovnal s databází známých struktur pomocí DaliLite v. 3, a pouze model, který dával nejlepší skóre ke známým strukturám RNA polymeráz, jsem vybral pro zobrazení (i když nejlepší model nemusí nutně nejlépe reflektovat skutečnou strukturu). Po značném úsilí se mi nakonec podařilo získat strukturní modely cca 92,7 % sekvence ORF6-pGKL2 a 62,1 % sekvence ORF7-pGKL2, přičemž v těchto modelech byly všechny dosud známé oblasti vykazující sekvenční podobnost ke konzervovaným oblastem kanonických RNAP modelovány podle oblastí, ke kterým onu sekvenční podobnost vykazují. Díky občasnému špatnému porovnání sekvencí ORF6-pGKL2 a ORF7-pGKL2 s templátem pro komparativní modelování musely být sekvence ORF6-pGKL2 a ORF7-pGKL2 pro modelování rozděleny na jednotlivé části. Aminokyselinové zbytky 1-693 proteinu ORF6-pGKL2 byly modelovány podle orthologu  $\beta$  podjednotky eRNAP II *Schizosaccharomyces pombe* (PDB ID: 3H0G.B), aminokyselinové zbytky 754-882 byly modelovány podle  $\beta'$  podjednotky bRNAP *Thermus thermophilus* (PDB ID: 2A6H.D), aminokyselinové zbytky 894-974 byly modelovány podle orthologu  $\beta'$  podjednotky eRNAP II *Schizosaccharomyces pombe* (PDB ID: 3H0G.A). Aminokyselinové zbytky 1-52 proteinu ORF7-pGKL2 byly modelovány podle orthologu  $\beta'$  podjednotky eRNAP II *Schizosaccharomyces pombe* (PDB ID: 3H0G.A), aminokyselinové zbytky 103-132 byly modelovány podle orthologu  $\beta'$  podjednotky eRNAP II *S. cerevisiae* (PDB ID: 1TWF.A). Modely všech částí obou proteinů jsou zobrazeny níže (Obrázek 15 a Obrázek 16). Velmi přínosnou se ukázala být tvorba modelu prvních 693 aminokyselinových zbytků proteinu ORF6-pGKL2, neboť některé úseky tohoto proteinu byly modelovány podle konzervovaných oblastí  $\beta$  podjednotek kanonických RNAP, ke kterým v proteinu ORF6-pGKL2 sekvenční podobnost zatím nalezena nebyla. Tvorbou manuálního sekvenčního porovnání vycházejícího ze strukturního porovnání modelu a jeho templátu, spolu se sekvenčním porovnáním všech proteinů ORF6 a několika vybraných sekvencí kanonických

RNA polymeráz, jejichž porovnání bylo publikováno dříve (LANE a DARST 2010a), se mi podařilo identifikovat úseky proteinů ORF6 vykazující sekvenční podobnost k dalším třem konzervovaným oblastem  $\beta$  podjednotek kanonických RNAP. Jeden z těchto úseků, lokalizovaný v insertu I, se však částečně překrývá s potenciálním SAM vazebným místem, které jsem predikoval dříve. Sekvenční porovnání zachycující podobnost proteinů ORF6 s dalšími třemi konzervovanými oblastmi  $\beta$  podjednotek jsou vyobrazena níže viz Obrázek 17.



**Obrázek 15:** Predikce terciální struktury nekanonické RNA polymerázy lineárních plasmidů a její porovnání se strukturou elongačního komplexu eukaryotické RNA polymerázy II *S. cerevisiae*. Zeleně zobrazena vlákna DNA, červeně zobrazeno vlákno RNA. Struktura nukleových kyselin pochází ze struktury eRNAP II (PDB ID: 2NVQ). **A)** Podjednotka Rpb2 (ortholog  $\beta$  podjednotky) eRNAP II *S. cerevisiae* (PDB ID: 2NVQ). **B)** Model ORF6-pGKL2 pokrývající aminokyselinové zbytky 1-693. **C)** Podjednotka Rpb1 (ortholog  $\beta'$  podjednotky) eRNAP II *S. cerevisiae* (PDB ID: 2NVQ). **D)** Červeně zobrazeny modely ORF6-pGKL2 pokrývající aminokyselinové zbytky 754-882 a 894-974. Oranžově zobrazeny modely ORF7-pGKL2 pokrývající aminokyselinové zbytky 1-52 a 103-132. Pro tvorbu modelů byly použity sekvence YP\_001648066.1 a YP\_001648067.1.





**Obrázek 16:** Predikce terciální struktury nekanonické RNA polymerázy lineárních plasmidů a její porovnání se strukturou elongačního komplexu eukaryotické RNA polymerázy II *S. cerevisiae*. Zeleně zobrazena vlákna DNA, červeně zobrazeno vlákno RNA. Struktura nukleových kyselin pochází ze struktury eRNAP II (PDB ID: 2NVQ). Světle modře zobrazena podjednotka Rpb2 eRNAP II. Růžově zobrazena podjednotka Rpb1 eRNAP II. Ostatní podjednotky eRNAP II v zobrazení vynechány. Modře zobrazena část ORF6-pGKL2 odpovídající  $\beta$  podjednotce. Červeně zobrazena část ORF6-pGKL2 odpovídající  $\beta'$  podjednotce. Oranžově zobrazeny modely ORF7-pGKL2 odpovídající  $\beta'$  podjednotce. Použité modely jsou stejné jako na Obrázku 15. **A)** Pohled od  $\beta$  strany enzymu na eRNAP II *S. cerevisiae* (PDB ID: 2NVQ). **B)** Pohled od  $\beta$  strany enzymu na model RNAP lineárních plasmidů. **C)** Přední pohled na eRNAP II *S. cerevisiae* (PDB ID: 2NVQ). **D)** Přední pohled na model RNAP lineárních plasmidů.

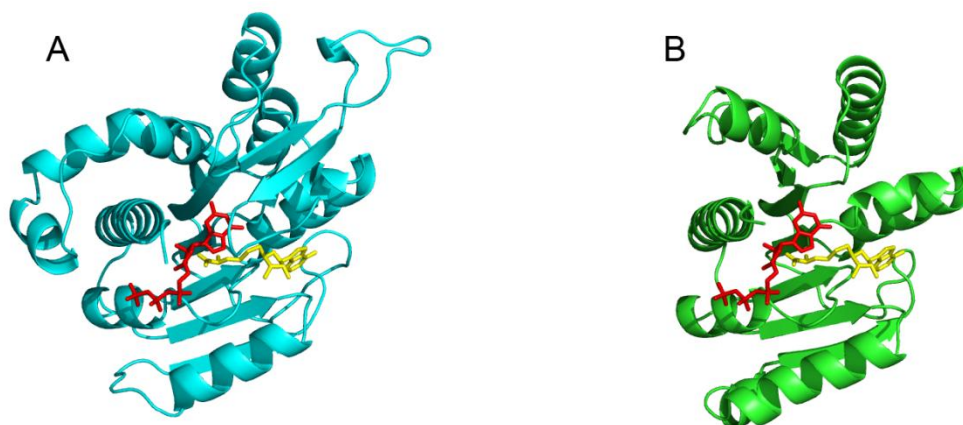
----- βa1 -----		
T. aquaticus β	16	PPLTEIQVBSYKKAQA
E. coli β	25	PYLTSIQLDSFOKFIQ
M. jannaschii B''	15	HGLTDHQIHSYNDFVEN
S. cerevisiae pol I Rpa135	39	QEAVQPHIGSFNALTG
S. cerevisiae pol II Rpb2	41	KGLVSQLDSENFQVDY
S. cerevisiae pol III Rpc128	55	KGLVKQHLDSFNVEVDI
Vaccinia virus Rpo132	28	YRPHHFQYVSYSNFLLH
K. lactis pGKL2 ORF6	2	---DYGQITTYNDYFRN
S. kluyveri pSKL ORF6	5	---DYGQIKIYETLFD
P. acaciae pPac1-1 ORF6	5	---DFGQIKIYEDLFHD
P. etchellsii pPE1B ORF6	5	---NFGQITTYNNIFSD
----- βa6 -----		
T. aquaticus β	328	LGNFRIRTVGELMADQFRVGLARLARGVRRM
E. coli β	448	LGNFRIRSVGEMAENQFRVGLVVRVERAVKERL
M. jannaschii B''	339	YAYKRAKLAGDLMEDLFRYAFSQLVVDIKYQL
S. cerevisiae pol I Rpa135	397	TOHQEVLLGGFLYGMILKEKIDEYLQNIQAQV
S. cerevisiae pol II Rpb2	401	FCKRRLDLACPLLAQLFKTLFKKLTDFRYM
S. cerevisiae pol III Rpc128	372	VGNKRLELAGQLISLLEDFLKKFNDFKLSI
Vaccinia virus Rpo132	354	MVCHRILTYGKYFETLAHDELENYIGNLRNDI
K. lactis pGKL2 ORF6	150	KAEKPIKNEIDLISLCYMFECWGLREEPRLY
S. kluyveri pSKL ORF6	149	KSDVIKNEIDLMLICYMFECWGLIKKESVHP
P. acaciae pPac1-1 ORF6	152	KTSNSIKNEVDLHICYMFECWFDLRKPPKNN
P. etchellsii pPE1B ORF6	153	KLNTAIKNEIDLINICYMFECWLGKQTKVLE
----- βa13 -----		
T. aquaticus β	787	DTSLRVPPGEGCIVVGRRLRLR
E. coli β	915	DSLSLRVPNGVSGTIVIVQVFT
M. jannaschii B'	324	DSSVVVRHGEEGYIDKVIILTE
S. cerevisiae pol I Rpa135	869	TKIKTYHSSEPAYTEEVNLIIG
S. cerevisiae pol II Rpb2	936	DASTPLRSTENGIVDOVLVTT
S. cerevisiae pol III Rpc128	868	EAPVIYRGPEPSHIDQVMSV
Vaccinia virus Rpo132	841	DVSEKYTDMYKSRVERVQVEL
K. lactis pGKL2 ORF6	470	KTINFVYAETHGKVKELIREE
S. kluyveri pSKL ORF6	472	KTINFVYAETHGKVKELIREE
P. acaciae pPac1-1 ORF6	474	KTINFVYAETHGKVKELIREE
P. etchellsii pPE1B ORF6	475	KTINFVYAETHGKVKELIREE

**Obrázek 17:** Sekvenční podobnost proteinů ORF6 kvasinkových lineárních plasmidů a konzervovaných oblastí βa1, βa6 a βa13 β podjednotky kanonických RNAP, nalezená díky modelu terciální struktury proteinu ORF6-pGKL2. Zvýraznění porovnání je stejné jako na Obrázku 12. Pro tvorbu porovnání byly použity následující sekvence: *Thermus aquaticus* β (CAB65465.2), *E. coli* β (AAC76961.1) *Methanocaldococcus jannaschii* B'' (Q58444.1), *Methanocaldococcus jannaschii* B' (Q60181.1), *S. cerevisiae* Rpa135 (CAA95050.1), *S. cerevisiae* Rpb2 (NP\_014794.1), *S. cerevisiae* Rpc128 (CAA99422.1), *Vaccinia virus* Rpo132 (AAQ93241.1), *Kluyveromyces lactis* ORF6-pGKL2 (YP\_001648066.1), *Saccharomyces kluyveri* ORF6-pSKL (CAA38625.1), *Pichia acaciae* ORF6-pPac-1 (CAJ57280.1), *Pichia etchellsii* ORF6-pPE1B (CAC08226.1).

**Závěr:** Podařilo se mi vytvořit model terciální struktury větší části předpokládané RNA polymerázy lineárních plasmidů kvasinky *K. lactis*. Z modelu je patrné, že oproti kanonickým RNA polymerázám je tato RNAP značně redukovaná, především na solventní straně enzymu a oblastech umístěných distálně od aktivního centra. Tvorba modelu přispěla k rozšíření počtu oblastí vykazujících sekvenční podobnost k β podjednotce kanonických vícepodjednotkových RNAP.

### 5.1.4 Model terciální struktury methyltransferázy *capping* enzymu

Terciální struktury dvou N<sup>7</sup>-*cap*-methyltransferáz byly již také experimentálně stanoveny, a to konkrétně u methyltransferázy Ecm1 prvoka *Encephalitozoon cuniculi* a methyltransferázy D1R viru *Vaccinia* (FABREGA *et al.* 2004; DE LA PEÑA *et al.* 2007). Rozhodl jsem se zkusit vytvořit model terciální struktury předpokládané methyltransferázy proteinu ORF3-pGKL2 uplatněním stejné strategie jako v případě modelu terciální struktury RNA polymerázy. Jako vstupní sekvenci pro modelování jsem zadal sekvenci ORF3-pGKL2 od aminokyselinového zbytku 376, který je v databázi CCD anotován jako první aminokyselinový zbytek předpokládané methyltransferázové domény, až po C-konec. Server Robetta vytvořil model terciální struktury proteinu ORF3-pGKL2 od aminokyselinového zbytku 405 až po C-konec podle methyltransferázy Ecm1 prvoka *Encephalitozoon cuniculi* (PDB ID: 1RI5). Model, zobrazený níže na Obrázku 18, tak pokrývá cca 86,8 % předpokládané methyltransferázové domény.



**Obrázek 18:** Predikce terciální struktury methyltransferázové domény *capping* enzymu lineárních plasmidů a její porovnání se strukturou N<sup>7</sup>-*cap*-methyltransferázy Ecm1 prvoka *Encephalitozoon cuniculi*. Červeně zobrazen 7-methyl-guanosin-5'-trifosfát-5'-guanosin, žlutě zobrazen S-adenosyl-L-homocystein. Struktura ligandů pochází ze struktury Ecm1 (PDB ID: 1RI1). **A)** Struktura Ecm1 *Encephalitozoon cuniculi* (PDB ID: 1RI1). **B)** Model ORF3-pGKL2 pokrývající aminokyselinové zbytky 405-594. Pro tvorbu modelu byla použita sekvence YP\_001648063.1.

**Závěr:** Podařilo se mi vytvořit model terciální struktury větší části předpokládané N<sup>7</sup>-*cap*-methyltransferázové domény *capping* enzymu lineárních plasmidů kvasinky *K. lactis*. Z modelu je patrné, že methyltransferáza ORF3-pGKL2 je částečně redukována oproti methyltransferáze Ecm1, ale je v ní zachována struktura sedmi  $\beta$ -listů, charakteristická pro methyltransferázy závislé na S-adenosyl-L-methioninu.

### 5.1.5 Fylogenetická analýza RNA polymerázy

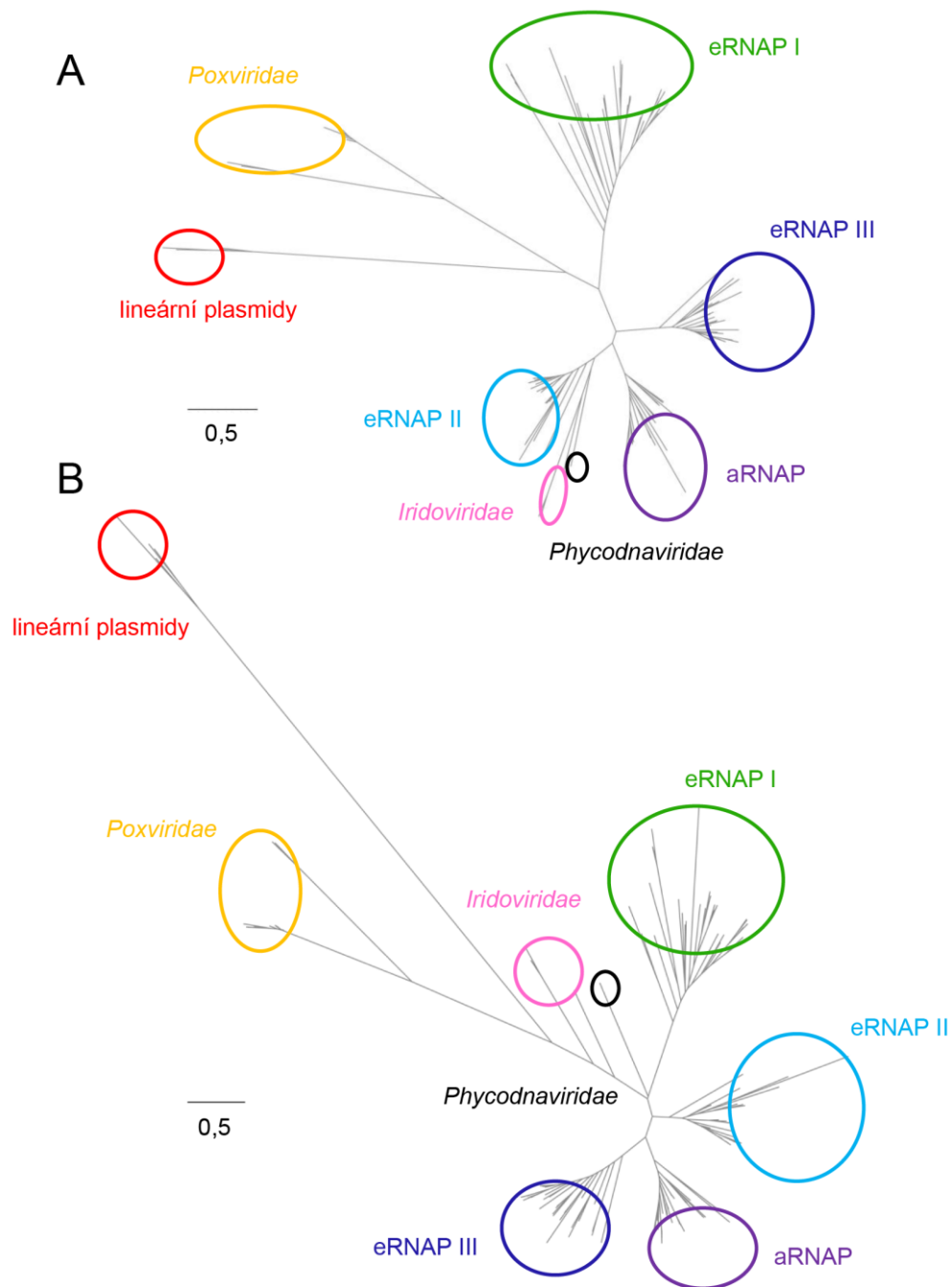
Rozsáhlejší fylogenetická analýza RNA polymeráz kvasinkových lineárních plasmidů dosud nebyla provedena. Starší analýzy, pracující pouze se sekvencemi DPBB  $\beta'$  podjednotky proteinů ORF6 plasmidů pGKL2 a pSKL, byly použity k demonstrování faktu, že RNA polymeráza kvasinkových cytoplasmatických lineárních plasmidů má blíže ke kanonickým vícepodjednotkovým RNA polymerázám, než k jednopodjednotkovým RNAP, kterými disponují mitochondriální lineární plasmidy hub a rostlin (KEMPKEN *et al.* 1992; ROHE *et al.* 1992). Předpokládá se, že geny pro proteiny ORF6 a ORF7 lineárních plasmidů jsou odvozeny od genů eRNAP ancestrálních hostitelů (JESKE *et al.* 2007; RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010), nebo že protein ORF6 je zástupce dávné diverzifikace *two-barrel* RNA polymeráz z dob, kdy byla  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotka součástí jednoho proteinu (IYER a ARAVIND 2012). Pokusil jsem se o fylogenetickou analýzu, která by původ RNA polymeráz kvasinkových lineárních plasmidů trochu osvětlila.

Nejdřív jsem vytvořil sekvenční porovnání obsahující pouze všechny známé konzervované oblasti kanonických RNAP, obsažené v proteinech ORF6 a ORF7, spolu s v této práci popsanými konzervovanými oblastmi kanonických RNAP, obsaženými v proteinech ORF6 a ORF7. Sekvenční porovnání obsahující oblasti  $\beta$ a1,  $\beta$ a3,  $\beta$ a4,  $\beta$ a6,  $\beta$ a7,  $\beta$ a8,  $\beta$ a10,  $\beta$ a11,  $\beta$ a12,  $\beta$ a13,  $\beta$ a14,  $\beta$ a15,  $\beta$ a16,  $\beta'$ a11,  $\beta'$ a12,  $\beta'$ a15,  $\beta'$ a16 a  $\beta'$ a20 proteinů ORF6 a ORF7 jsem rozdělil na dvě části odpovídající oblastem  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky. Tato dvě porovnání jsem potom manuálně přidal k porovnání konzervovaných oblastí  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek kanonických RNAP, které bylo publikováno dříve (LANE a DARST 2010a) a které je volně v elektronické podobě dostupné ([http://brahms.rockefeller.edu/supp/RNAP\\_MSA\\_2009/](http://brahms.rockefeller.edu/supp/RNAP_MSA_2009/)). Celkem jsem vytvořil čtyři porovnání: Porovnání  $\beta$  oblastí RNAP lineárních plasmidů s  $\beta$  oblastmi kanonických RNAP všech typů (755 sekvencí); porovnání  $\beta$  oblastí RNAP lineárních plasmidů s  $\beta$  oblastmi eRNAP, aRNAP a vRNAP (230 sekvencí); porovnání  $\beta'$  oblastí RNAP lineárních plasmidů s  $\beta'$  oblastmi kanonických RNAP všech typů (755 sekvencí); porovnání  $\beta'$  oblastí RNAP lineárních plasmidů s  $\beta'$  oblastmi eRNAP, aRNAP a vRNAP (230 sekvencí). Všechna čtyři porovnání jsou součástí elektronických příloh. Sekvence  $\beta$  a  $\beta'$  oblastí kanonických RNAP, ke kterým RNAP lineárních plasmidů nemá podobnost, byly v porovnání ponechány. Ze všech porovnání byly odstraněny sekvence odpovídající vRNAP viru čeledi *Mimiviridae*, aby došlo při tvorbě fylogenetického stromu ke stejnému omezení, jaké bylo použito pro tvorbu fylogenetického stromu, který reflektuje příbuznost podjednotek vRNAP nukleocytoplasmatických virů tak, jak je v dnešní době chápána (YUTIN a KOONIN 2012). Fylogenetický strom byl vytvořen v programu PhyML 3.0 použitím výše uvedených parametrů, které odpovídají parametrům použitým pro tvorbu

fylogenetického stromu příbuznosti katalytických podjednotek kanonických RNAP (LANE a DARST 2010a). Při porovnání  $\beta'$  oblastí RNAP lineárních plasmidů s  $\beta'$  oblastmi kanonických RNAP všech typů se RNAP lineárních plasmidů dělily od větve vedoucí k vRNAP virů čeledi *Poxviridae* (data nezobrazena), a při porovnání  $\beta$  oblastí RNAP lineárních plasmidů s  $\beta$  oblastmi kanonických RNAP všech typů se RNAP lineárních plasmidů dělily na pomezí mezi bRNAP + pRNAP, a všemi ostatními typy RNAP (data nezobrazena). Tento velmi rozdílný výsledek pro každou z katalytických podjednotek RNAP lineárních plasmidů se mi nezdál moc pravděpodobný. Vzhledem k tomu, že několik oblastí  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky RNAP lineárních plasmidů se nachází na jednom polypeptidu, usuzuji spíše na společný původ.

V konzervovaných oblastech  $\beta_{15}$  a  $\beta_{16}$  proteinu ORF6-pGKL2 byla nalezena sekvence, která strukturně odpovídá degenerovanému SBHM motivu (IYER a ARAVIND 2012). Tento degenerovaný strukturní motiv se nachází u eRNAP, aRNAP a vRNAP; u bRNAP a pRNAP se nenachází (IYER a ARAVIND 2012). Autoři výskyt degenerovaného SBHM motivu v ORF6-pGKL2 vysvětlují tak, že společný předek dnešních kanonických RNAP, od něhož se protein ORF6 oddělil, tento motiv obsahoval, ale posléze se tento motiv u bRNAP a pRNAP ztratil (IYER a ARAVIND 2012). Mnou vytvořený model proteinu ORF6-pGKL2 tento strukturní prvek také obsahuje. Potenciální přítomnost tohoto strukturního prvku  $\beta$  podjednotky v proteinech ORF6 mě vedla k názoru, že oblasti  $\beta$  podjednotky ORF6 proteinu by mohly být příbuznější RNA polymerázám eukaryot a *Archaea*. Proto jsem použil druhá dvě sestavená sekvenční porovnání pro tvorbu omezených fylogenetických stromů, ve kterých byly vynechány všechny sekvence bRNAP a pRNAP. Za těchto podmínek se ve fylogenetických stromech větvi oblasti  $\beta$  i  $\beta'$  podjednotek RNAP lineárních plasmidů od kanonických RNAP přibližně na stejném místě, což by značilo jejich shodný původ. Tento výsledek je zobrazen níže, viz Obrázek 19, v podobě nezakořeněného fylogenetického stromu, kde jsou zobrazeny pouze okraje každé skupiny listů díky velkému počtu porovnávaných sekvencí. Pro každé ze dvou omezených porovnání bylo nakonec sestrojeno 7 fylogenetických stromů s použitím dalších substitučních modelů.

**Závěr:** Fylogenetická analýza aminokyselinových sekvencí RNA polymeráz kvasinkových lineárních plasmidů s použitím všech dosud nalezených úseků vykazujících podobnost ke konzervovaným oblastem katalytických podjednotek RNAP a velkého počtu porovnávaných sekvencí kanonických RNAP jako první naznačuje největší podobnost RNAP lineárních plasmidů s vRNAP nukleocytoplasmatických virů. Tento poznatek vede k tvorbě teorie, že všechny předpokládané komponenty specifického transkripčního aparátu lineárních plasmidů kvasinek jsou odvozeny od genů nukleocytoplasmatických virů.



**Obrázek 19:** Fylogenetická analýza příbuznosti RNA polymeráz lineárních plasmidů kvasinek s vybranými typy kanonických RNA polymeráz. *Maximum likelihood* fylogenetické stromy byly zkonstruovány v PhyML 3.0. Fylogenetické stromy jsou zobrazeny jako nezakořeněné fylogramy, kde je délka jednotlivých větví stromu zobrazena proporciálně s vypočítanou evoluční vzdáleností jednotlivých sekvencí. Okraje listů ohraničující jednotlivé typy RNA polymeráz jsou barevně odlišeny a popsány. Pro oba zobrazené stromy je uvedeno měřítko délky větví v průměrné hodnotě 0,5 substitucí na každý aminokyselinový zbytek. **A)** Fylogram  $\beta$  podjednotek s použitím LG substitučního modelu. Ostatních 6 modelů dávalo téměř totožný výsledek topologie. Sekvence lineárních plasmidů vykazují největší podobnost k  $\beta$  podjednotce vRNAP virů čeledi *Poxviridae*. **B)** Fylogram  $\beta'$  podjednotek s použitím HIVb substitučního modelu. Ostatní modely dávaly jinou než dnes uznávanou topologii pro *Iridoviridae* a *Phycodnaviridae* (YUTIN a KOONIN 2012), ale lineární plasmidy se větvy vždy stejně. Sekvence lineárních plasmidů se oddělují z větve původní ancestrální  $\beta'$  podjednotky všech nukleocytoplasmatických virů.

## 5.2 Produkce RNA polymerázy v bakteriálním expresním systému

Produkt ORF7-pGKL2 (dále jen již jako ORF7) se již podařilo produkovat a purifikovat s c-myc-epitopem na C-konci v bakteriálním expresním systému (SCHAFFRATH *et al.* 1997). Produkovat tento protein s HIS-epitopem na N-konci v bakteriálním expresním systému se podařilo i v naší laboratoři, i když purifikace většího množství čistého proteinu nebyla dokončena (VOPÁLENSKÝ 1999). Produkovat produkt ORF6-pGKL2 (dále jen již jako ORF6) s HIS-epitopem na N-konci ve stejném systému se podařilo jen ve velmi malém množství a protein se v bakteriích rozpadá na několik degradačních produktů (VOPÁLENSKÝ 1999). Geny lineárních plasmidů mají vysoký obsah A+T bází a používání kodónů je dosti jiné od kodónů používaných v bakterii *E. coli*. Proto byl například protein ORF3-pGKL2 produkován v bakterii *Bacillus megaterium*, která má používáním kodónů blíže k lineárním plasmidům než bakterie *E. coli* (TIGGEMANN *et al.* 2001). Pro účely méj diplomové práce jsme se rozhodli pro produkci ORF6 a ORF7 s GST-epitopem na N-konci v buňkách Rosetta, v kterých by měl být problém rozdílného používání kodónu řešen produkcí několika transferových RNA, které jsou v *E. coli* raritní.

### 5.2.1 Příprava vektorů

Pro produkci bylo třeba vytvořit vektory. Rozhodli jsme vložit geny pro ORF6 a ORF7 do vektoru pGEX4T2\_TEV, kde by byly kódovány jako GST-fúzní proteiny pod kontrolou Tac promotoru, a GST-epitop by bylo možné v případě potřeby odštěpit z fúzního proteinu TEV proteázou.

Gen ORF6 byl namnožen pomocí PCR s primery ORF6\_F\_BamHI a ORF6\_R\_Sall. Jako templát byl použit vektor pBSc KS+/ORF6, který jsem vyizoloval metodou 4.2.2.1.3 obdržel od svého školitele. Produkt reakce PCR byl přečištěn metodou 4.2.2.1.7. Přečištěný produkt byl štěpen enzymy *BamHI* a *Sall*, a posléze izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Naštěpený fragment byl ligován metodou 4.2.2.4.3 spolu s vektorem pGEX4T2\_TEV štěpeným v polylinkeru enzymy *BamHI* a *Sall*, který byl po štěpení izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Vektor pGEX4T2\_TEV jsem pro svoji práci nejdříve izoloval metodou 4.2.2.1.3. Ligační směs byla přečištěna soupravou FastBack DNA Minispin Kit bez předchozího elektroforetického dělení, a část přečištěné ligační směsi byla vnesena do buněk *E. coli* XL-1 Blue elektroporací protokolem 4.2.2.5.1. Transformované buňky byly vysety na misky 2xTYA s ampicilinem. Vybrané monokolonie byly testovány na přítomnost rekombinantních vektorů

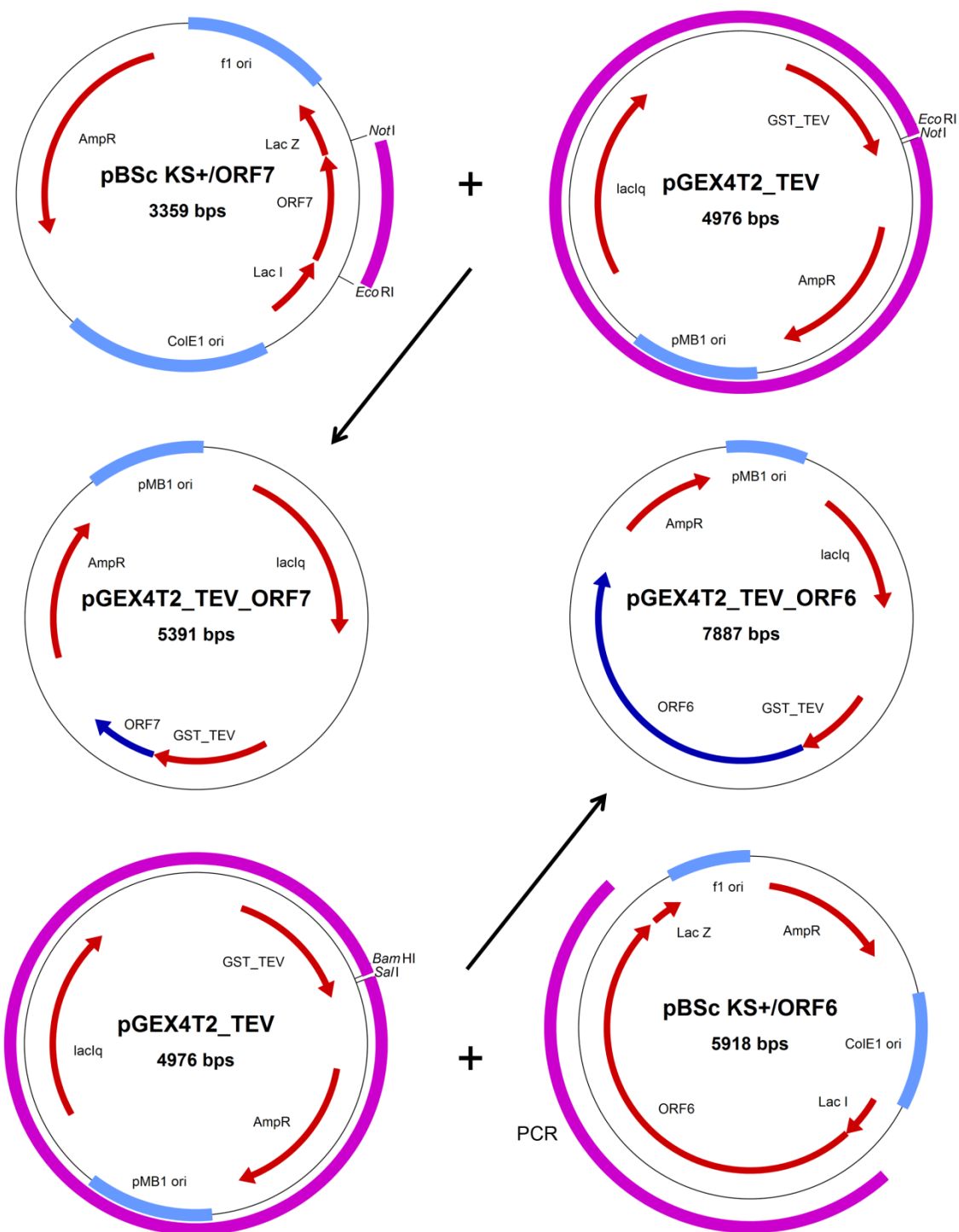
tak, že z nich byla izolována DNA vektorů plasmidového typu minipreparací podle protokolu 4.2.2.1.1, a izolované vektory podrobeny restričnímu štěpení enzymy *Bam*HI a *Sal*I s následnou elektroforetickou analýzou. Z buněk monokolonie, jejíž vektor po štěpení vykazoval přítomnost vektoru i insertu správné délky, byl vektor izolován metodou 4.2.2.1.2 a připraven k sekvenaci metodou 4.2.2.6.6 pomocí primerů pGEX 3'-seq a pGEX 5'-seq. Sekvence odhalila správné napojení insertu a požadované nukleotidové pořadí v oblasti pokryté sekvenací (cca 1/3 genu od 5' konce a 1/3 genu od 3' konce).

Gen ORF7 byl vyštěpen enzymy *Eco*RI a *Not*I z vektoru pBSc KS+/ORF7, který jsem izoloval podle protokolu 4.2.2.1.3. Vyštěpený gen byl izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Naštěpený fragment byl ligován metodou 4.2.2.4.3 spolu s vektorem pGEX4T2\_TEV štěpeným v polylinkeru enzymy *Eco*RI a *Not*I, který byl po štěpení izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Část ligační směsi byla vnesena do buněk *E. coli* XL-1 Blue elektroporací protokolem 4.2.2.5.1. Transformované buňky byly vysety na misky 2xTYA s ampicilinem. Vybrané monokolonie byly testovány na přítomnost rekombinantních vektorů tak, že z nich byla izolována DNA vektorů plasmidového typu minipreparací podle protokolu 4.2.2.1.1, a izolované vektory podrobeny restričnímu štěpení enzymy *Eco*RI a *Not*I s následnou elektroforetickou analýzou. Z buněk monokolonie, jejíž vektor po štěpení vykazoval přítomnost vektoru i insertu správné délky, byl vektor izolován metodou 4.2.2.1.2 a připraven k sekvenaci metodou 4.2.2.6.6 pomocí primeru pGEX 3'-seq. Sekvence odhalila správné napojení insertu a požadované nukleotidové pořadí v oblasti celého genu, ale také adici jedné báze za oblastí kódující stopkodón v 5' → 3' směru, která ovšem ničemu nevadí.

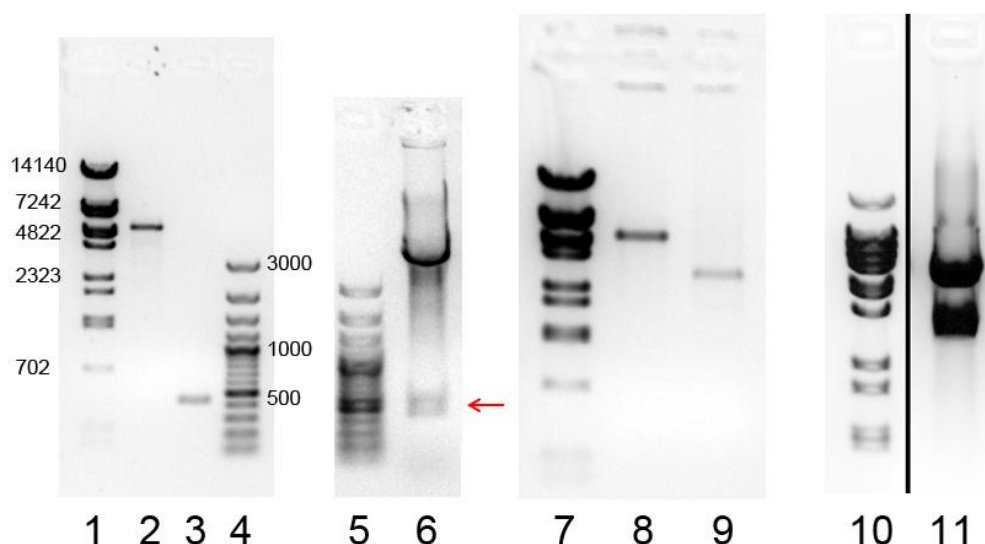
Přípravevé vektory pGEX4T2\_TEV\_ORF6 a pGEX4T2\_TEV\_ORF7 izolované metodou 4.2.2.1.2 byly vneseny do buněk *E. coli* Rosetta<sup>TM</sup>(DE3) a Rosetta-gami2(DE3) elektroporací. Transformované buňky byly vysety na misky 2xTYA s ampicilinem a chloramfenikolem. V narostlých buňkách obou transformovaných kmenů byla indukována exprese rekombinantních proteinů a pokusil jsem se o detekci a purifikaci těchto proteinů viz následující kapitola. Schéma přípravy vektorů je zobrazeno na Obrázku 20. Elektroforetogramy některých kroků přípravy vektorů jsou zobrazeny na Obrázku 21.

**Závěr:** Plánované vektory pro expresi v bakteriálním systému se podařilo vytvořit.





**Obrázek 20:** Schéma přípravy vektorů pro produkci RNAP lineárních plasmidů v bakteriálním expresním systému. Gen ORF7 byl vyštěpen z vektoru pBSc KS+/ORF7 restrikčními enzymy *EcoRI* a *NotI* a vložen do vektoru pGEX4T2\_TEV, který byl také naštěpen restrikčními enzymy *EcoRI* a *NotI*. Ligované úseky jsou zobrazeny fialově. Gen ORF6 byl namnožen pomocí metody PCR z templátu pBSc KS+/ORF6, a výsledný produkt byl štěpen restrikčními enzymy *BamHI* a *SalI*. Naštěpený produkt byl vložen do vektoru pGEX4T2\_TEV, který byl štěpen restrikčními enzymy *BamHI* a *SalI*. Ligované úseky jsou zobrazeny fialově. V připravených vektorech kódujících ORF6 a ORF7 jako GST-fúzní proteiny je exprese rekombinantních proteinů pod kontrolou Tac promotoru. U každého vektoru je uvedena jeho velikost v párech bází.

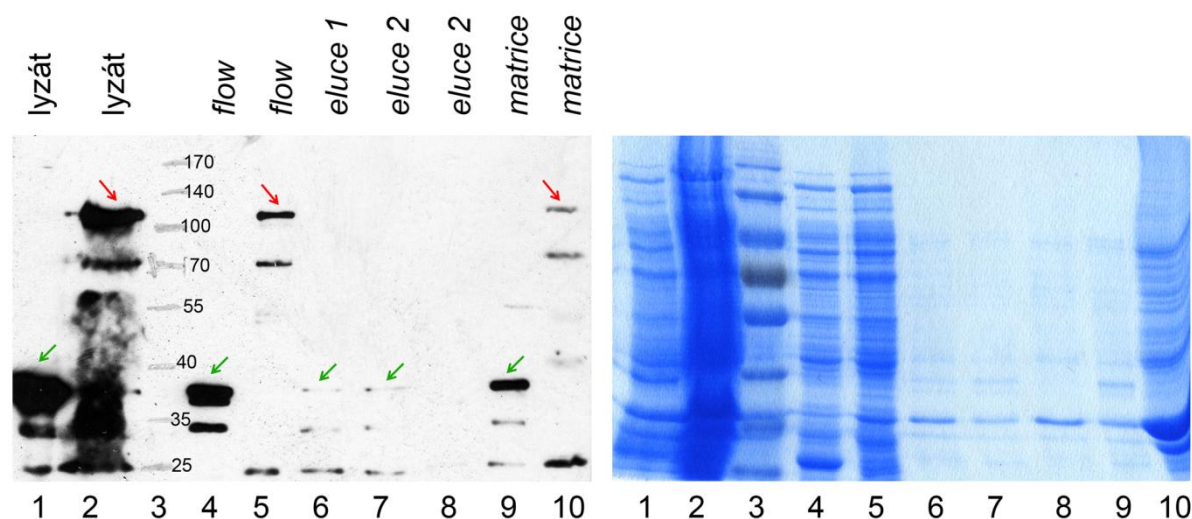


**Obrázek 21:** Elektroforetogramy některých kroků přípravy vektorů pro produkci RNAP lineárních plasmidů v bakteriálním expresním systému. Elektroforetogramy jsou zobrazeny v invertovaných barvách. Červená šipka označuje špatně viditelný pruh. U některých standardů molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů v párech bází. **1, 7, 10:** Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker, 15; **4, 5:** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; **2:** Vyizolovaný fragment vektoru pGEX4T2\_TEV štěpeného enzymy *EcoRI* a *NotI*, velikost 4955 párů bází (bp); **3:** Vyizolovaný fragment genu ORF7 vyštěpený z vektoru pBSc KS+/ORF7 enzymy *EcoRI* a *NotI*, velikost 435 bp; **6:** Vektor pGEX4T2\_TEV\_ORF7 štěpený enzymy *EcoRI* a *NotI*; **8:** Vyizolovaný fragment vektoru pGEX4T2\_TEV štěpeného enzymy *BamHI* a *Sall*, velikost 4956 bp; **9:** Vyizolovaný fragment genu ORF6 namnoženého pomocí PCR a štěpeného enzymy *BamHI* a *Sall*, velikost 2931 bp; **11:** Vektor pGEX4T2\_TEV\_ORF6 štěpený enzymy *BamHI* a *Sall*.

## 5.2.2 Purifikace a detekce rekombinantních proteinů

Produkce proteinu GST-ORF6 a GST-ORF7 byla vyzkoušena v každém kmeni expresních buněk *E. coli* pouze jednou. V kmeni Rosetta™(DE3) jsem se pokusil proteiny detekovat a purifikovat z 50 ml vstupní kultury. V kmeni Rosetta-gami2(DE3) jsem se pokusil proteiny detekovat a purifikovat ze 400 ml vstupní kultury. V buňkách byla indukována exprese podle protokolu 4.2.1.6, a potom byly z buněk připraveny lyzáty podle protokolu 4.2.3.1. Z lyzátů jsem se GST-fúzní proteiny pokusil purifikovat metodou 4.2.3.2. Vzorky lyzátů a některých kroků purifikace byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou podle protokolu 4.2.3.9. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* podle protokolu 4.2.3.10 s použitím protilátky anti-GST (3D4) ředěné 2000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. V případě vzorků z buněk Rosetta™(DE3) byla použita nitrocelulózová membrána a chemiluminiscenční detekce na rentgenový film, v případě vzorků z buněk Rosetta-gami2(DE3) byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem

ImageQuant™ LAS 4000. V lyzátech buněk Rosetta-gami2(DE3) se mi podařilo detekovat několik degradačních produktů obou rekombinantních proteinů, které měly menší molekulovou hmotnost, než očekávané rekombinantní proteiny, a protein, který by svojí molekulovou hmotností mohl odpovídat rekombinantnímu proteinu GST-ORF7 (data nezobrazena). V lyzátech buněk Rosetta™(DE3) se mi podařilo detekovat proteiny, které by svojí molekulovou hmotností mohly odpovídat rekombinantním proteinům GST-ORF6 a GST-ORF7 v plné délce, ale degradační produkty obou rekombinantních proteinů byly také patrné. Vzorky lyzátů buněk Rosetta™(DE3) a některých kroků purifikace rekombinantních proteinů zobrazené na vysušeném polyakrylamidovém gelu po proteinové elektroforéze obarveném pomocí *Coomassie Blue* (protokoly 4.2.3.12.1 a 4.2.3.13) a rentgenovém filmu, na kterém byly detekovány proteiny s GST-epitopem pomocí metody *Western blot*, jsou zachyceny na Obrázku 22.



**Obrázek 22:** Vlevo rentgenový film zobrazující detekované proteiny s GST-epitopem. Vpravo vysušený polyakrylamidový gel obarvený pomocí *Coomassie Blue*, na kterém byly děleny stejné vzorky, které byly použity pro *Western blot*. Velikost proteinu GST-ORF6 je cca 139 kDa. Velikost proteinu GST-ORF7 je cca 43 kDa. Dělení proběhlo na 9 % gelu. Zelenou šipkou je označen předpokládaný protein GST-ORF7. Červenou šipkou je označen předpokládaný protein GST-ORF6. 1: 1  $\mu$ l lyzátu buněk Rosetta™(DE3), v kterých byla indukována exprese proteinu GST-ORF7; 2: 25  $\mu$ l lyzátu buněk Rosetta™(DE3), v kterých byla indukována exprese proteinu GST-ORF7; 3: PageRuler™ Prestained Protein Ladder s vyznačenými velikostmi proteinů v kDa; 4, 6, 7, 9: některé kroky purifikace proteinu GST-ORF7, popisky nad obrázkem rentgenového filmu; 5, 6, 8, 10: některé kroky purifikace proteinu GST-ORF6, popisky nad obrázkem rentgenového filmu. Vzorky *eluce* 1 proteinu GST-ORF6 a GST-ORF7 byly nedopatřením sloučeny v jeden vzorek. U vzorku 4, 5 a 9 nanáška 10  $\mu$ l. U vzorku 6, 7 a 8 nanáška 15  $\mu$ l. U vzorku 10 nanáška 20  $\mu$ l.

**Závěr:** Je možné produkovat GST-ORF6 a GST-ORF7 v bakteriálním expresním systému. Produkce ve větším měřítku s následnou purifikací by mohla vést k získání dostatečného množství enzymu pro otestování předpokládané RNA polymerázové aktivity.

## 5.3 Produkce RNA polymerázy v kvasinkovém expresním systému

Díky zkušenostem s nepříliš úspěšnou expresí produktů genů lineárních plasmidů v bakteriálních expresních systémech jsme se rozhodli paralelně vyzkoušet expresi RNA polymerázy v kvasinkovém systému. Rozhodli jsme se pro systém v kvasince *Kluyveromyces lactis*, neboť ve vnitřním prostředí těchto buněk se proteiny lineárních plasmidů běžně nacházejí. Zvolený systém využívá vektoru integrativního typu jménem pKLAC1, který se v recipientních buňkách integruje homologní rekombinací do promotoru genu *LAC4*, jenž kóduje  $\beta$ -galaktosidázu. Systém umožňuje produkovat protein zájmu ve fúzi s  $\alpha$ -párovacím faktorem *K. lactis*, a tím sekreci rekombinantního proteinu do média. Produkce rekombinantního proteinu je pod kontrolou promotoru LAC4-PBI, v kterém byla mutována sekvence připomínající Pribnovův box bakterie *E. coli*, aby do vektoru při jeho přípravě mohly být vloženy sekvence kódující proteiny toxické pro bakterii *E. coli*. Před samotným vnesením vektoru do recipientního kmene musí být vektor linearizován, a pouze část vektoru tvořící expresní kazetu se přenese do kvasinkových buněk. Pro selekci buněk s integrovanou expresní kazetou slouží gen pro acetamidázu, který je pod kontrolou ADH1 promotoru. Buňky produkující acetamidázu jsou schopny růst v médiích, v kterých se jako jediný zdroj dusíku nachází acetamid. Tento selekční systém favorizuje buňky, které mají expresní kazetu integrovanou vícekrát, což může vést k větší produkci proteinu zájmu. Pro expresi rekombinantních proteinů jsou buňky s integrovanými kazetami kultivovány v bohatém médiu s galaktosou. Rozhodli jsme se pokusit produkovat podjednotky RNA polymerázy jako GST-fúzní proteiny intracelulárně, bez sekrece do média.

### 5.3.1 Příprava vektorů a kontrola integrace v recipientních buňkách

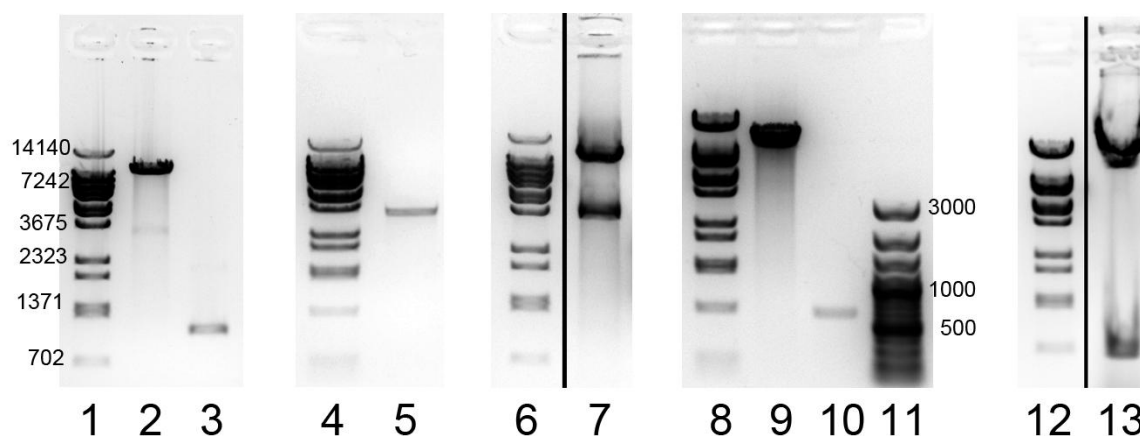
Pro produkci bylo třeba připravit vektory. Jako zdroj sekvence kódující GST-ORF6 a GST-ORF7 byly použity vytvořené vektory pro bakteriální expresní systém pGEX4T2\_TEV\_ORF6 a pGEX4T2\_TEV\_ORF7, takže i zde by bylo možné GST-epitop v případě potřeby z fúzního proteinu odštěpit TEV proteázou.

Gen GST-ORF6 byl namnožen pomocí PCR s primery KLex\_5\_GST\_Hind a ORF6\_R\_SalI. Jako templát byl použit vektor pGEX4T2\_TEV\_ORF6, který jsem vyizoloval metodou 4.2.2.1.2. Produkt reakce PCR byl přečištěn metodou 4.2.2.1.7. Přečištěný produkt byl štěpen enzymy *HindIII* a *Sall*, a posléze izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Naštěpený fragment byl ligován metodou 4.2.2.4.3 spolu s vektorem pKLAC1 štěpeným enzymy *HindIII* a *Sall* tak, aby se vyštěpila sekvence  $\alpha$ -párovacího faktoru. Vektor byl po štěpení izolován

z agarosového gelu. Vektor pKLAC1 jsem dostal od svého školitele vyizolovaný metodou 4.2.2.1.3. Část ligační směsi byla vnesena do buněk *E. coli* XL-1 Blue elektroporací protokolem 4.2.2.5.1. Transformované buňky byly vysety na misky 2xTYA s ampicilinem. Vybrané monokolonie byly testovány na přítomnost rekombinantních vektorů tak, že z nich byla izolována DNA vektorů plasmidového typu minipreparací podle protokolu 4.2.2.1.1, a izolované vektory podrobeny restričnímu štěpení enzymy *HindIII* a *Sall* s následnou elektroforetickou analýzou. Z buněk monokolonie, jejíž vektor po štěpení vykazoval přítomnost vektoru i insertu správné délky, byl vektor izolován metodou 4.2.2.1.2 a připraven k sekvenaci metodou 4.2.2.6.6 pomocí primerů pKLAC1\_Forwseq2 a pKLAC1\_Rev\_Seq. Sekvence odhalila správné napojení insertu a požadované nukleotidové pořadí v oblasti pokryté sekvenací (cca 1/4 genu GST-ORF6 od 5' konce a 1/4 genu od 3' konce).

Gen GST-ORF7 byl namnožen pomocí PCR s primery KLex\_5\_GST\_Hind a pGEX 3'-seq. Jako templát byl použit vektor pGEX4T2\_TEV\_ORF7, který jsem vyizoloval metodou 4.2.2.1.2. Produkt reakce PCR byl přečištěn metodou 4.2.2.1.7. Přečištěný produkt byl štěpen enzymy *HindIII* a *Sall*, a posléze izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Naštěpený fragment byl ligován metodou 4.2.2.4.3 spolu s vektorem pKLAC1 štěpeným enzymy *HindIII* a *Sall* tak, aby se vyštěpila sekvence  $\alpha$ -párovacího faktoru. Vektor byl po štěpení izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Část ligační směsi byla vnesena do buněk *E. coli* XL-1 Blue elektroporací protokolem 4.2.2.5.1. Transformované buňky byly vysety na misky 2xTYA s ampicilinem. Vybrané monokolonie byly testovány na přítomnost rekombinantních vektorů tak, že z nich byla izolována DNA vektorů plasmidového typu minipreparací podle protokolu 4.2.2.1.1. Izolované vektory byly podrobeny restričnímu štěpení enzymy *HindIII* a *Sall* s následnou elektroforetickou analýzou. Z buněk monokolonie, jejíž vektor po štěpení vykazoval přítomnost vektoru i insertu správné délky, byl vektor izolován metodou 4.2.2.1.2 a připraven k sekvenaci metodou 4.2.2.6.6 pomocí primeru pKLAC1\_Rev\_Seq. Navzdory třem nezávislým pokusům o celý postup sekvenace vektorů všech pozitivních monokolonií vždy odhalila špatné napojení insertu se záměnou 7 nukleotidů a delecí 15 nukleotidů v oblasti stopkodónu genu GST-ORF7. Z vzniklého defektního vektoru, izolovaného metodou 4.2.2.1.2, byla větší část genu GST-ORF7 s chybným místem vyštěpena enzymy *SmaI* a *NotI*, vektor byl izolován z agarosového gelu a ligován s větší částí genu GST-ORF7, vyštěpeného enzymy *SmaI* a *NotI* z vektoru pGEX4T2\_TEV\_ORF7 a izolovaného z agarosového gelu. Část ligační směsi byla vnesena do buněk *E. coli* XL-1 Blue elektroporací protokolem 4.2.2.5.1. Transformované buňky byly vysety na misky 2xTYA s ampicilinem. Vybrané monokolonie byly testovány na přítomnost rekombinantních vektorů tak, že z nich byla izolována DNA vektorů plasmidového typu minipreparací podle protokolu 4.2.2.1.1, a izolované vektory podrobeny restričnímu štěpení

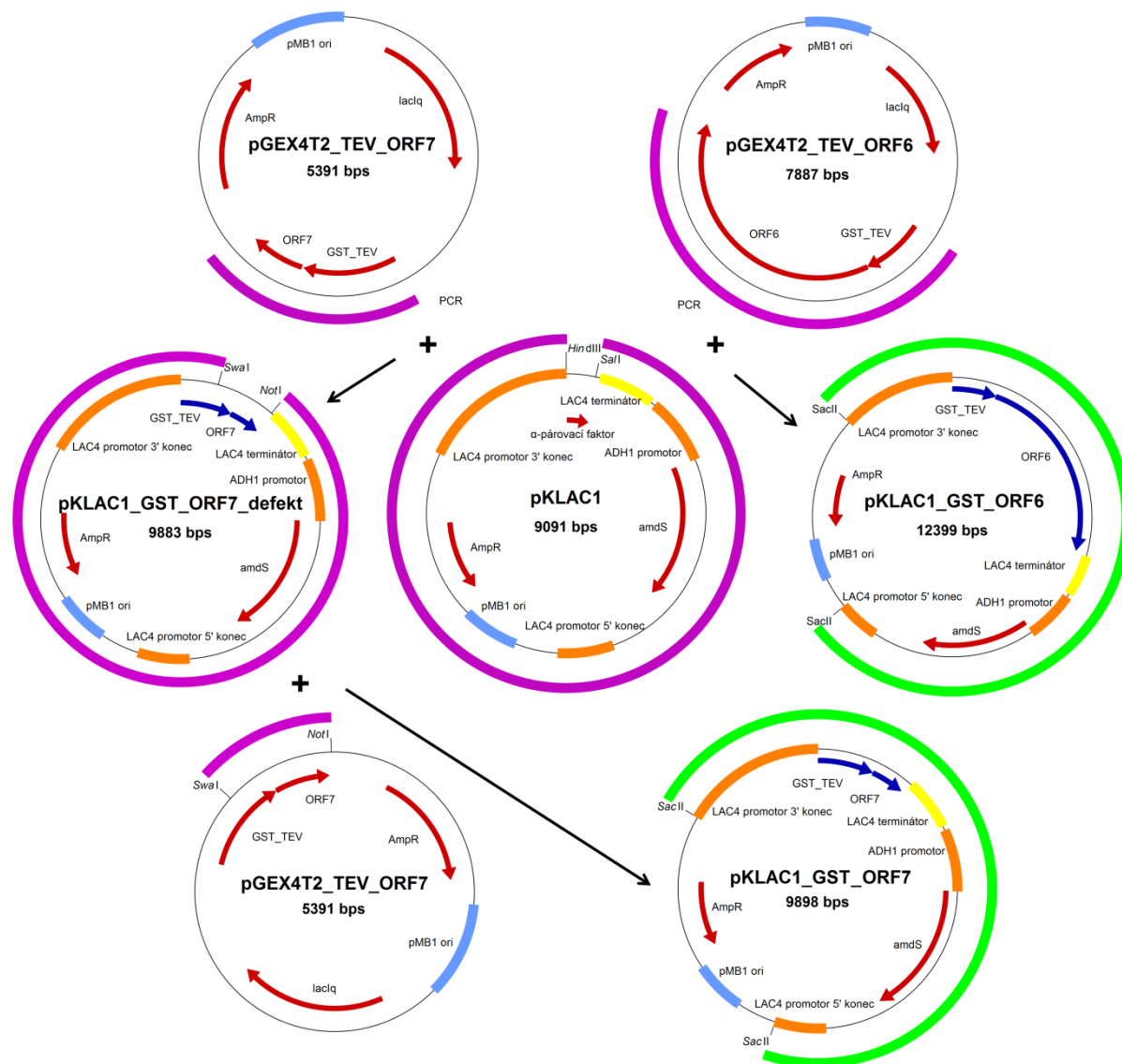
enzymy *SwaI* a *NotI* s následnou elektroforetickou analýzou. Z buněk monoklonie, jejíž vektor po štěpení vykazoval přítomnost vektoru i insertu správné délky, byl vektor izolován metodou 4.2.2.1.2 a připraven k sekvenaci metodou 4.2.2.6.6 pomocí primerů pKLAC1\_Forwseq2 a pKLAC1\_Rev\_Seq. Sekvence odhalila správné napojení insertu a požadované nukleotidové pořadí celého genu GST-ORF7. Elektroforetogramy některých kroků přípravy obou vektorů jsou zobrazeny na Obrázku 23.



**Obrázek 23:** Elektroforetogramy některých kroků přípravy vektorů pro produkci RNAP lineárních plasmidů v kvasinkovém expresním systému. Elektroforetogramy jsou zobrazeny v invertovaných barvách. U některých standardů molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů v párech bází. **1, 4, 6, 8, 12:** Lambda DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker, 15; **11:** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; **2:** Vyizolovaný fragment vektoru pKLAC1 štěpeného enzymy *HindIII* a *Sall*, velikost 8784 bp; **3:** Vyizolovaný fragment genu GST-ORF7 namnoženého z vektoru pGEX4T2\_TEV\_ORF7 pomocí PCR a štěpeného enzymy *HindIII* a *Sall*, velikost 1099 bp; **5:** Vyizolovaný fragment genu GST-ORF6 namnoženého z vektoru pGEX4T2\_TEV\_ORF6 pomocí PCR a štěpeného enzymy *HindIII* a *Sall*, velikost 3615 bp; **7:** Vektor pKLAC1\_GST\_ORF6 štěpený enzymy *HindIII* a *Sall*; **9:** Vyizolovaný fragment defektního vektoru pKLAC1\_GST\_ORF7 štěpeného enzymy *SwaI* a *NotI*, velikost 9201 bp; **10:** Vyizolovaný fragment genu GST-ORF7 vyštěpeného z vektoru pGEX4T2\_TEV\_ORF7 pomocí enzymů *SwaI* a *NotI*, velikost 697 bp; **13:** Vektor pKLAC1\_GST\_ORF7 štěpený enzymy *SwaI* a *NotI*.

Připravené vektory pKLAC1\_GST\_ORF6 a pKLAC1\_GST\_ORF7 byly štěpeny enzymem *SacII* pro tvorbu integračních kazet. Integrační kazety byly izolovány z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6 a vneseny do recipientních buněk *K. lactis* IFO 1267 metodou 4.2.2.5.2. Transformované buňky byly vysety na misky YCBA s acetamidem. Několik vybraných monoklonií bylo testováno na přítomnost integrované kazety pomocí PCR. Z vybraných monoklonií byla izolována DNA pro účely PCR reakce podle protokolu 4.2.2.1.8 – metoda 1 a metoda 2. Pro zjištění integrace byla provedena PCR reakce s primery in\_GEX\_seq\_rev a Integration\_1, pro zjištění násobné integrace byla provedena PCR reakce s primery in\_GEX\_seq\_rev a Integration\_3. Ve všech analyzovaných klonech, kde se integrační kazeta

vyskytovala, byla kazeta integrována vícekrát. Ve čtyřech klonech s integrovaným vektorem pKLAC1\_GST\_ORF6 a čtyřech klonech s integrovaným vektorem pKLAC1\_GST\_ORF7 jsem se pokusil o detekci a purifikaci rekombinantních proteinů viz následující kapitola. Schéma přípravy vektorů je zobrazeno na Obrázku 24.



**Obrázek 24:** Schéma přípravy vektorů pro produkci RNAP lineárních plasmidů v kvasinkovém expresním systému. Gen GST-ORF7 byl namnožen pomocí metody PCR z templátu pGEX4T2\_TEV\_ORF7, výsledný produkt byl štěpen restričními enzymy *HindIII* a *SalI* a vložen do vektoru pKLAC1, který byl naštěpen stejnými restričními enzymy. Výsledný defektní vektor byl štěpen restričními enzymy *SmaI* a *NotI*, a byla do něj vložena větší částí genu GST-ORF7 vyštěpeného enzymy *SmaI* a *NotI* z vektoru pGEX4T2\_TEV\_ORF7. Gen GST-ORF6 byl namnožen pomocí metody PCR z templátu pGEX4T2\_TEV\_ORF6, výsledný produkt byl štěpen restričními enzymy *HindIII* a *SalI* a vložen do vektoru pKLAC1, který byl naštěpen stejnými restričními enzymy. Pro tvorbu integračních kazet byly výsledné vektory štěpeny restričním enzymem *SacII*. Ligované úseky jsou zobrazeny fialově. Integrační kazety jsou zobrazeny zeleně. V připravených vektorech kódujících ORF6 a ORF7 jako GST-fúzní proteiny je exprese rekombinantních proteinů pod kontrolou LAC4-PBI promotoru. U každého vektoru je uvedena jeho velikost v párech bází.

**Závěr:** Plánované vektory pro expresi v kvasinkovém systému se podařilo vytvořit. Vektory byly vneseny do recipientních buněk a u několika klonů byla potvrzena integrace vektorů do genomu.

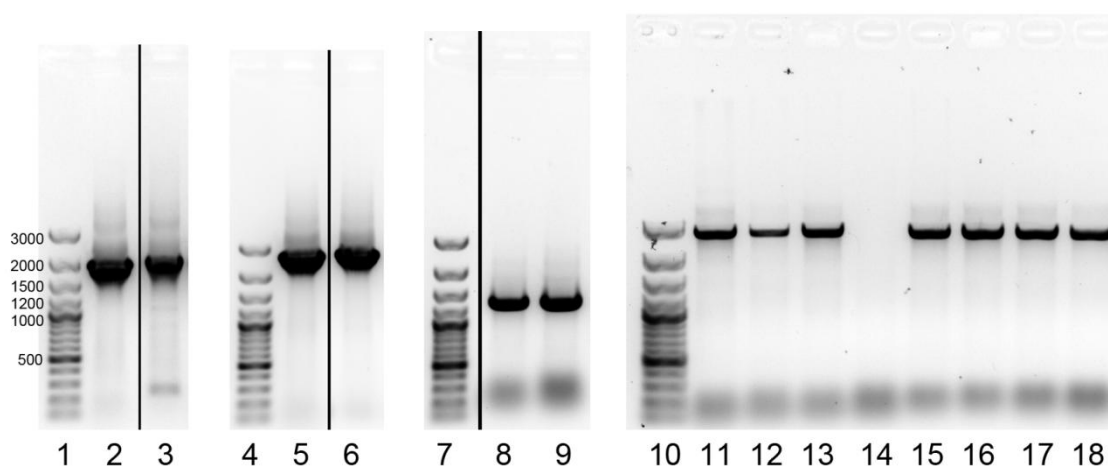
### 5.3.2 Purifikace a detekce rekombinantních proteinů

O produkci proteinu GST-ORF6 jsem se pokusil ve čtyřech nezávislých klonech (pojmenování klonů 6.1-6.4). O produkci proteinu GST-ORF7 jsem se pokusil ve čtyřech nezávislých klonech (pojmenování klonů 7.1-7.4). Kvasinkové kultury byly pěstovány přes noc při teplotě 28 °C v 50 ml média YPGal. Druhý den byly přeočkovány do 50 ml vytemperovaného média YPGal teploty 28 °C na optickou densitu 0,1 při 600 nm. Po 24 hodinách kultivace byl z 1 ml kultury každého klonu připraven lyzát podle protokolu 4.2.3.5.1, a z 1 ml kultury každého klonu byl připraven lyzát metodou 4.2.3.5.2. Optická densita všech klonů po 24 hodinách kultivace dosahovala průměrné hodnoty 10. Po 48 hodinách kultivace byl z 1 ml kultury každého klonu připraven lyzát podle protokolu 4.2.3.5.1, a z 1 ml kultury každého klonu byl připraven lyzát metodou 4.2.3.5.2. Optická densita všech klonů po 48 hodinách kultivace dosahovala průměrné hodnoty 14. Vzorky lyzátů byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou podle protokolu 4.2.3.9. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* podle protokolu 4.2.3.10 s použitím protilátky anti-GST (3D4) ředěné 2000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Byla použita nitrocelulósová membrána a chemiluminiscenční detekce na rentgenový film. V lyzátech se nepodařilo žádné rekombinantní proteiny detekovat. Ze zbývajících 46 ml kultury po 48 hodinách kultivace byly připraveny lyzáty podle protokolu 4.2.3.5.2 s použitím 3 ml roztoku Y-PER™ Yeast Protein Extraction Reagent a intenzivního promíchávání s 0,5 ml skleněných kuliček. Z těchto lyzátů jsem se GST-fúzní proteiny pokusil purifikovat metodou 4.2.3.2. Vzorky těchto lyzátů a některých kroků purifikace byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-GST (3D4) ředěné 2000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Byla použita nitrocelulósová membrána a chemiluminiscenční detekce na rentgenový film. Ani v těchto vzorcích se nepodařilo žádné rekombinantní proteiny detekovat.

Neúspěch mě přiměl k přezkoumání integrace vektorů v analyzovaných klonech. Předchozí výsledky zjištěné integrace pomocí PCR reakce využívající primery in\_GEX\_seq\_rev a Integration\_1 dokazují přítomnost integrační kazety v genomu analyzovaných klonů obsahující alespoň část genu GST, ale přítomnost kompletní sekvence genů ORF6 a ORF7 a celého genu GST v integrovaných kazetách touto reakcí prokázat nelze. Pro zjištění přítomnosti přibližně 270 nukleotidů z 5' konce genu ORF7 v integrovaných kazetách 4 klonů byla provedena PCR reakce



s primery Integration\_1 a 5RACE\_O7\_K2. Pro zjištění přítomnosti přibližně 370 nukleotidů z 5' konce genu ORF6 v integrovaných kazetách 4 klonů byla provedena PCR reakce s primery Integration\_1 a 5RACE\_O6\_K2. DNA pro účely PCR reakce byla izolována podle protokolu 4.2.2.1.8 – metoda 2. Bylo zjištěno, že klon s označením 6.4 patrně nemá integrovanou kazetu v celé délce, neboť nedošlo k vytvoření očekávaného produktu reakce PCR (výsledek dvou nezávislých pokusů počínajících izolací DNA). U klonů 7.3 a 7.4 jsem se ještě pokusil detekovat přítomnost celého genu GST-ORF7 v genomu pomocí reakce PCR s primery GST\_TEV\_For a pKLAC1\_Rev\_Seq. Produkt očekávané délky se podařilo připravit. U všech osmi klonů byly také izolovány pGKL plasmidy metodou 4.2.2.1.4 a děleny elektroforeticky. Přítomnost integrovaných vektorů neměla žádný vliv na přítomnost a elektroforeticky rozlišitelnou velikost pGKL plasmidů v buňkách těchto klonů (data nezobrazena). Elektroforetogramy některých pokusů o detekci integrace vektorů jsou zobrazeny na Obrázku 25.



**Obrázek 25:** Elektroforetogramy pokusů o detekci integrace vektorů pro produkci RNAP lineárních plasmidů v kvasinkovém expresním systému. Elektroforetogramy jsou zobrazeny v invertovaných barvách. U jednoho standardu molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů v párech bází. **1, 4, 7, 10:** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; **2:** Fragment potvrzující integraci vektoru u klonu 6.1, velikost 1949 bp; **3:** Fragment potvrzující integraci vektoru u klonu 7.1, velikost 1949 bp; **5:** Fragment potvrzující mnohonásobnou integraci vektoru u klonu 6.1, velikost 2587 bp; **6:** Fragment potvrzující mnohonásobnou integraci vektoru u klonu 7.1, velikost 2587 bp; **8, 9:** Fragments potvrzující přítomnost genu GST-ORF7 plné délky v minimálně jedné kopii integrované kazety klonů 7.3 a 7.4, velikost 1264 bp; **11-14:** Fragments potvrzující přítomnost přibližně 370 nukleotidů z 5' konce genu ORF6 v minimálně jedné kopii integrované kazety klonů 6.1 až 6.4, velikost 2740 bp; **15-18:** Fragments potvrzující přítomnost přibližně 270 nukleotidů z 5' konce genu ORF7 v minimálně jedné kopii integrované kazety klonů 6.1 až 6.4, velikost 2650 bp.

**Závěr:** Produkovat GST-ORF6 a GST-ORF7 v kvasinkovém expresním systému se nepodařilo, ačkoliv produkce jiného kvasinkového proteinu ve stejném expresním systému se v naší laboratoři již podařila. I když u některých klonů byla prokázána přítomnost kódující sekvence

celého GST-fúzního proteinu v integrované kazetě, otázkou zůstává, zda u těchto klonů nedošlo k mutaci ovlivňující expresi.

## 5.4 Testování případné interakce RNA polymerázy a *capping* enzymu v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému

Pokusů o detekci interakce mezi jednotlivými produkty otevřených čtecích rámců pGKL plasmidů pomocí klasického dvouhybridního systému bylo již učiněno v naší laboratoři mnoho (VOPÁLENSKÝ 1999; SEKYROVÁ 2004). K zásadním počínům v této oblasti patří diplomová práce, která zkoumala interakci všech produktů otevřených čtecích rámců plasmidu pGKL2 mezi sebou, leč v této práci nebyla detekována jediná interakce (SEKYROVÁ 2004). I přes předchozí neúspěchy jsem se rozhodl zkusit detekovat interakci vybraných komponent transkripčního aparátu lineárních plasmidů v modifikované formě kvasinkového dvouhybridního systému, známého pod názvem *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC). Tato metoda využívá schopnosti zeleného fluorescenčního proteinu rozděleného na dvě části skládat se *in vivo* ve fluorescence schopný komplex, pokud se ony dvě části dostanou do blízkosti. Tento princip byl poprvé demonstrován spojením každé z rozdělených částí s jedním proteinem heterodimerního leucinového zipu v bakterii *E. coli* (GHOSH *et al.* 2000). Vektory, které umožňují využití této metody pro detekci interakce vybraných proteinů v kmenech *S. cerevisiae* běžně používaných pro dvouhybridní systém, se staly již dostupnými. Čtyři vektory, které jsme obdrželi, umožňují produkci proteinu zájmu fúzovaného na N- nebo C-konci s N- nebo C-koncovým fragmentem žlutého fluorescenčního proteinu varianty *Citrine*, pod kontrolou ADH1 promotoru (SKARP *et al.* 2008). Rozhodli jsme se zkusit detekovat interakci mezi podjednotkami RNA polymerázy a *capping* enzymem použitím těchto vektorů, buněk kmene *S. cerevisiae* pJ69-4A a analýzy prostřednictvím průtokového cytometru.

### 5.4.1 Příprava vektorů

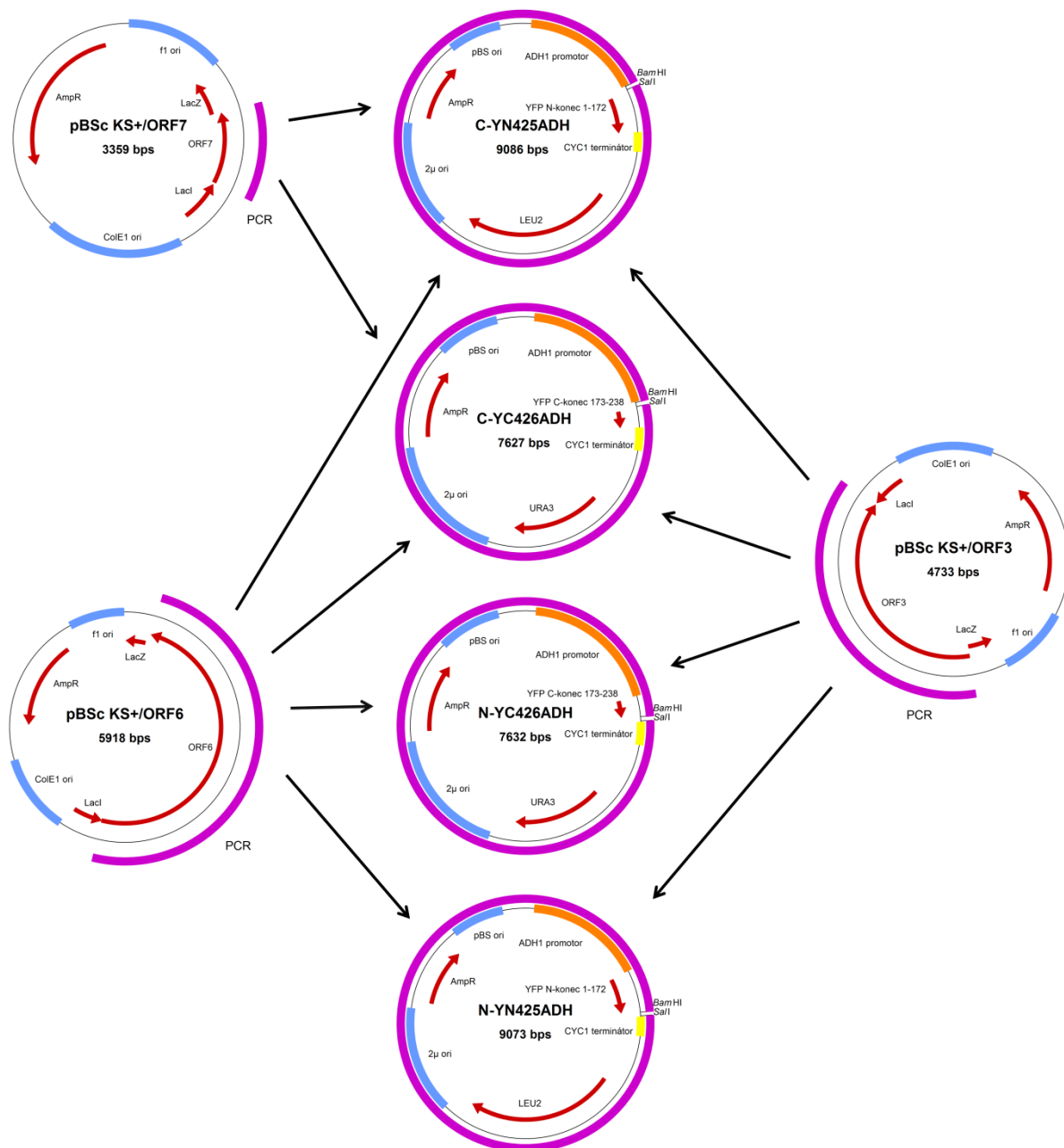
Pro účely kvasinkového fluorescenčního dvouhybridového systému bylo třeba vložit do vektorů sekvence kódující příslušné proteiny, jejichž interakce měla být testována. Sekvence kódující geny ORF3, ORF6 a ORF7 byly namnoženy pomocí PCR z vektorů pBSc KS+/ORF3, pBSc KS+/ORF6 a pBSc KS+/ORF7, produkty PCR reakcí byly štěpeny restrikcí enzymy *Bam*HI a *Sal*II a vloženy do shodně naštěpených cílových vektorů. Detailní popis strategie

klonování genů a ověřování nových rekombinantních vektorů byl již podán v předchozích kapitolách u přípravy vektorů pro expresní systémy, proto zde nebude zmíněn. Vektor pBSc KS+/ORF7 jsem izoloval metodou 4.2.2.1.3, vektory pBSc KS+/ORF6 a pBSc KS+/ORF3 jsem dostal izolované metodou 4.2.2.1.3 od svého školitele. Vektory C-YC426ADH C-YN425ADH, N-YC426ADH a N-YN425ADH jsem izoloval metodou 4.2.2.1.3. Produkty PCR reakcí byly před štěpením purifikovány metodou 4.2.2.1.7 nebo použitím FastBack DNA Minispin Kit bez předchozího elektroforetického dělení. Některé vektory izolované po štěpení byly defosforylovány SAP fosfatázou podle protokolu 4.2.2.4.2.

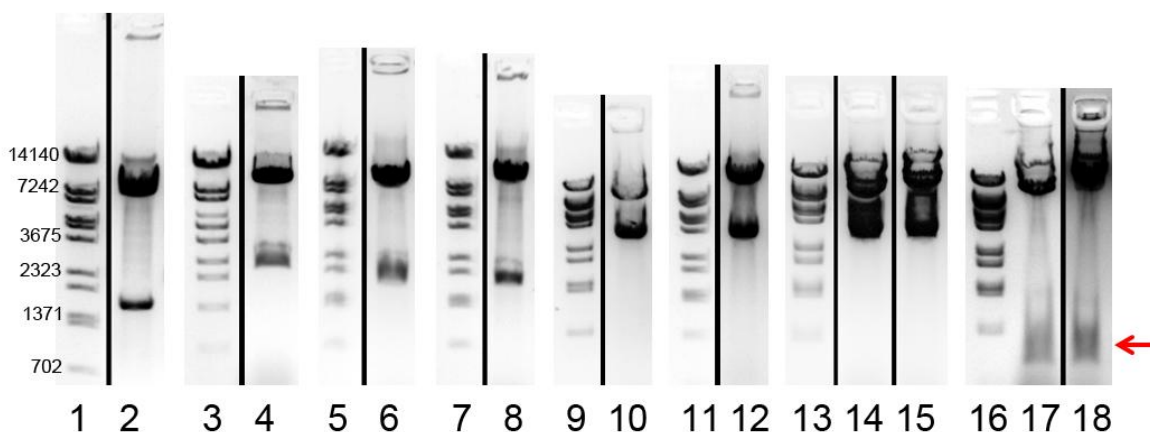
Gen ORF7 byl pro vložení do vektorů C-YN425ADH a C-YC426ADH namnožen pomocí PCR s primery O7\_BiFC\_F\_Bam a O7\_BiFC\_R\_Sal. Gen ORF6 byl pro vložení do vektorů C-YN425ADH a C-YC426ADH namnožen pomocí PCR s primery ORF6\_F\_BamHI a O6\_BiFC\_R\_Sal. Gen ORF6 byl pro vložení do vektoru N-YC426ADH namnožen pomocí PCR s primery O6\_BiFC\_F\_Bam a ORF6\_R\_SalI. Gen ORF6 byl pro vložení do vektoru N-YN425ADH namnožen pomocí PCR s primery ORF6\_F\_BamHI a ORF6\_R\_SalI. Gen ORF3 byl pro vložení do vektorů C-YN425ADH a C-YC426ADH namnožen pomocí PCR s primery ORF3\_F\_BamHI a O3\_BiFC\_R\_Sal. Gen ORF3 byl pro vložení do vektoru N-YC426ADH namnožen pomocí PCR s primery O3\_BiFC\_F\_Bam a ORF3\_R\_SalI. Gen ORF3 byl pro vložení do vektoru N-YN425ADH namnožen pomocí PCR s primery ORF3\_F\_BamHI a ORF3\_R\_SalI.

Z buněk monoklonií, jejichž vektory po štěpení vykazovaly přítomnost vektoru i insertu správné délky, byly vektory izolovány metodou 4.2.2.1.2 a připraveny k sekvenaci metodou 4.2.2.6.6. Vektory s vloženým genem ORF6 byly sekvenovány z genu směrem do vektoru primery 5RACE\_O6\_K2 a ORF6-K2\_tail\_2. Vektory s vloženým genem ORF7 byly sekvenovány z genu směrem do vektoru primery 5RACE\_O7\_K2 a ORF7-K2\_tail\_2. Vektory s vloženým genem ORF3 byly sekvenovány z genu směrem do vektoru primery vORF3-k2-rev\_2 a ORF3-K2\_tail\_2. Sekvence vždy odhalila správné napojení insertu a požadované nukleotidové pořadí v oblasti pokryté sekvenací. Schéma přípravy vektorů je zobrazeno na Obrázku 26. Elektroforetogramy výsledných vektorů štěpených restrikcí enzy *BamHI* a *SalI* jsou zobrazeny na Obrázku 27.

**Závěr:** Plánované vektory pro produkci RNA polymerázy a *capping* enzymu v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému se podařilo vytvořit.



**Obrázek 26:** Schéma přípravy vektorů pro produkci RNA polymeáry a *capping* enzymu lineárních plasmidů v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridovém systému. Geny ORF3, ORF6 a ORF7 byly namnoženy pomocí metody PCR z templátů pBSc KS+/ORF3, pBSc KS+/ORF6 a pBSc KS+/ORF7. Výsledné produkty byly štěpeny restrikcími enzymy *Bam*HI a *Sal*I a vloženy do vektorů vyznačených černými šipkami. Cílové vektory byly taktéž štěpeny restrikcími enzymy *Bam*HI a *Sal*I. Ligované úseky jsou zobrazeny fialově. V připravených vektorech kódujících ORF3, ORF6 a ORF7 jako fúzní proteiny s N- nebo C-koncovým fragmentem žlutého fluorescenčního proteinu na N- nebo C-konci je exprese rekombinantních proteinů pod kontrolou ADH1 promotoru. U každého vektoru je uvedena jeho velikost v párech bází.

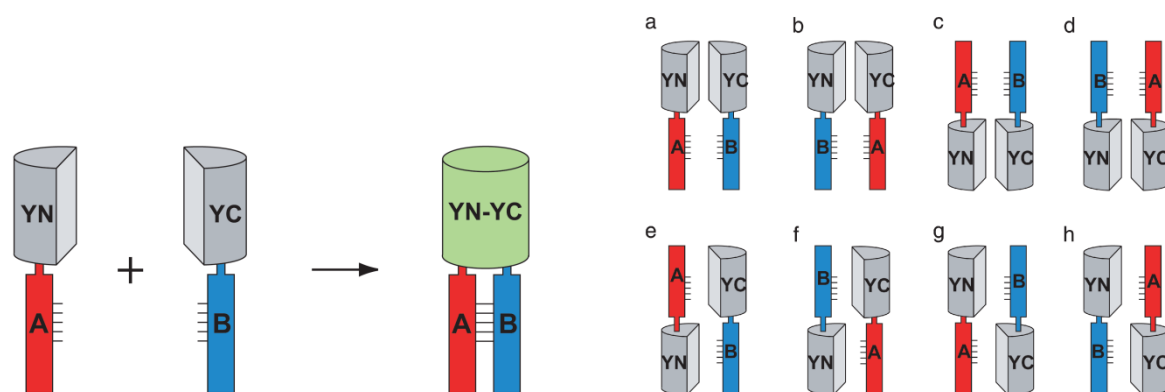


**Obrázek 27:** Elektroforetogramy výsledných vektorů pro produkci RNA polymerázy a *capping* enzymu lineárních plasmidů v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému po štěpení restrikcími enzymy *Bam*HI a *Sal*I. Elektroforetogramy jsou zobrazeny v invertovaných barvách. Červená šipka označuje špatně viditelné pruhy. U jednoho standardu molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů v párech bází. **1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 16:** Lambda DNA/*Eco*91I (*Bst*EII) Marker, **15:** Vektor C-YC426ADH\_ORF3, velikost fragmentů 7582 a 1788 bp; **4:** Vektor C-YN425ADH\_ORF3, velikost fragmentů 9041 a 1788 bp; **6:** N-YC426ADH\_ORF3, velikost fragmentů 7587 a 1792 bp; **8:** Vektor N-YN425ADH\_ORF3, velikost fragmentů 9028 a 1791 bp; **10:** Vektor C-YC426ADH\_ORF6, velikost fragmentů 7582 a 2928 bp; **12:** C-YN425ADH\_ORF6, velikost fragmentů 9041 a 2928 bp; **14:** Vektor N-YC426ADH\_ORF6, velikost fragmentů 7587 a 2932 bp; **15:** Vektor N-YN425ADH\_ORF6, velikost fragmentů 9028 a 2931 bp; **17:** Vektor C-YC426ADH\_ORF7, velikost fragmentů 7582 a 402 bp; **18:** Vektor C-YN425ADH\_ORF7, velikost fragmentů 9041 a 402 bp.

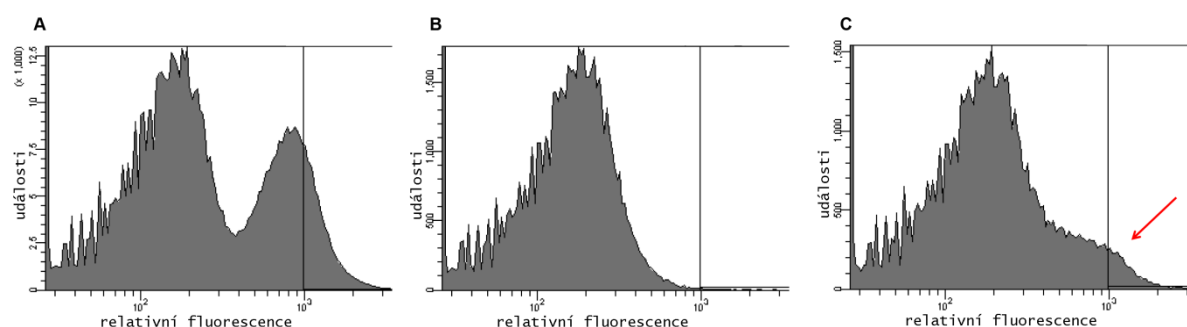
## 5.4.2 Detekce interakce mezi jednotlivými proteiny

S cílovými vektory, které máme k dispozici, může být každý zkoumaný protein produkován ve čtyřech různých variantách podle toho, kterou část žlutého fluorescenčního proteinu nese, a na kterém konci ji nese. Deset vektorů, které jsem vytvořil, umožňuje zkoumat interakci mezi proteinem ORF3 a ORF6 v osmi různých kombinacích, interakci mezi proteinem ORF6 a ORF7 ve čtyřech různých kombinacích a interakci mezi proteinem ORF3 a ORF7 ve čtyřech různých kombinacích. Pro ilustraci jednotlivých kombinací viz Obrázek 28. Příslušné dvojice vektorů pro jednotlivé kombinace byly vneseny do recipientních buněk *S. cerevisiae* pJ69-4A metodou 4.2.2.5.2. Transformované buňky byly vysety na misky se selekčním médiem bez leucinu a uracilu. Několik vybraných monoklonií bylo znovu přeneseno na misky se selekčním médiem bez leucinu a uracilu, pro přesvědčení se o fenotypu, který vykazují pouze buňky, které se transformovaly oběma vektory. Pro každou zkoumanou kombinaci bylo dále pracováno minimálně se třemi nezávislými klony. Buňky pro testované kombinace spolu s netransformovanými buňkami kmene pJ69-4A, buňkami kmene pJ69-4A transformovanými

vektory bez insertů, a buňkami kontrolního kmene *S. cerevisiae* GFP<sup>+</sup> byly připraveny pro detekci fluorescence podle protokolu 4.2.1.7. Analýzu na průtokovém cytometru BD™ LSRII Flow Cytometer provedl můj školitel. Buňky byly excitovány světlem o vlnové délce 488 nm laserem Coherent Sapphire 488-20 DPSS laser. Pro detekci byl zvolen *bandpass* emisní filtr 530/30 nm. Od každého zkoumaného klonu bylo změřeno 100000 buněk. Data byla analyzována v programu BD FACSDiva™ 6.1.2 (BD Biosciences). Celkem byly prověřeny buňky 52 klonů zkoumaných kombinací, a pouze jeden klon vykazoval jistou míru fluorescence, viz Obrázek 29.



**Obrázek 28:** Schématické znázornění principu metody *bimolecular fluorescence complementation*. Dva fragmenty (YN a YC) žlutého fluorescenčního proteinu nevydávající fluorescenci jsou fúzovány s předpokládanými interakčními partnery (A a B). Spojení interakčních partnerů vyústí ve formaci bimolekulárního fluorescenčního komplexu. Písmena **a-h** znázorňují všechny možné kombinace testování interakce pro dva proteiny. Interakce proteinů ORF3 a ORF6 byla zkoumána ve všech osmi orientacích. Pokud si pod písmenem B představíme ORF7, a pod písmenem A ORF3 a ORF6, tak byla interakce proteinů ORF3 a ORF7 zkoumána v orientacích jako na obrázku c, d, f a g. Ve stejných čtyřech orientacích byla zkoumána i interakce proteinů ORF6 a ORF7. Upraveno podle (HU a KERPPOLA 2005).



**Obrázek 29:** Ukázka analýzy fluorescence v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému. Grafy zobrazené jako histogramy udávají závislost relativní intenzity fluorescence (osa x) na počtu analyzovaných buněk (události). **A)** Buňky kmene *S. cerevisiae* GFP<sup>+</sup>. **B)** Buňky kmene *S. cerevisiae* pJ69-4A. Obdobný histogram vycházel i pro buňky transformované prázdnými vektory a buňky 51 klonů, ve kterých byly zkoumány interakce proteinů transkripčního aparátu lineárních plasmidů. **C)** Buňky klonu číslo 2, který nesl vektory N-YN425ADH\_ORF6 a C-YC426ADH\_ORF7. Červená šipka ukazuje na populaci buněk vykazující zvýšenou míru relativní fluorescence oproti kontrolním buňkám.

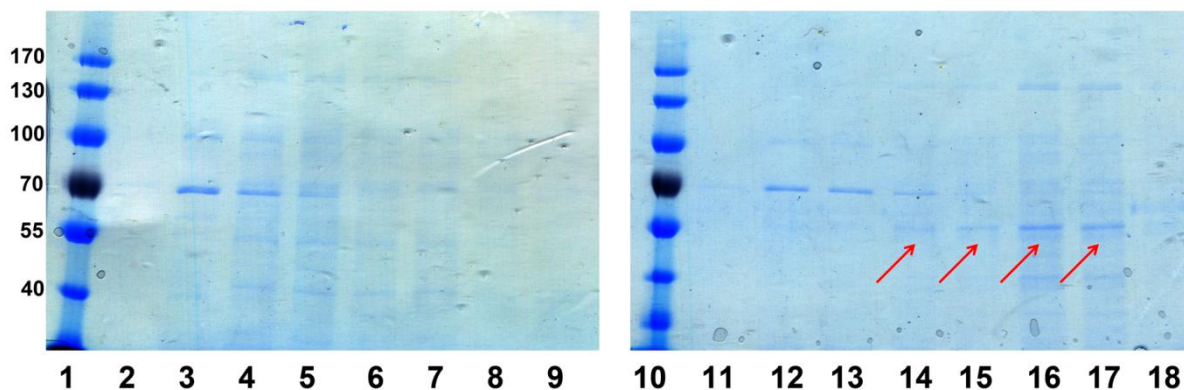
**Závěr:** Detekovat interakci podjednotek RNA polymerázy mezi sebou a jednotlivých podjednotek RNA polymerázy s *capping* enzymem v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému se nepodařilo. Jeden z pěti analyzovaných klonů s vektory N-YN425ADH\_ORF6 a C-YC426ADH\_ORF7 vykazuje zřejmě falešnou pozitivitu.

## 5.5 Produkce velké podjednotky RNA polymerázy v *in vitro* translačním systému

Protože se z mých a školitelových výsledků v bakteriálních expresních systémech zdá, že produkce a purifikace proteinu ORF7 by nemusela být problém, ale produkce a purifikace proteinu ORF6 by problematická být mohla, rozhodli jsme se zkusit produkovat protein ORF6 s HIS-epitopem na N-konci v *in vitro* systému spojené transkripce a translace Rapid Translation System RTS 500 odvozeném od lyzátu bakterie *E. coli*. V tomto systému jsem se také pokusil produkovat protein GFP s HIS-epitopem na N-konci jako kontrolu funkčnosti systému a protein ORF9 s HIS-epitopem na N-konci pro účely s diplomovou prací přímo nesouvisející.

Vektor pIVEX-GFP pro produkci HIS-GFP byl v požadovaném množství již součástí soupravy. Vektor pIVEX 2.4c\_ORF6 byl připraven, izolován metodou 4.2.2.1.3 a přečištěn protokolem 4.2.2.1.2 s použitím roztoku I místo roztoku S1 mým školitelem. Vektor pIVEX 2.4a\_ORF9 byl připraven mým školitelem. Já jsem tento vektor izoloval metodou 4.2.2.1.2 a přečistil protokolem 4.2.2.1.2 s použitím roztoku I místo roztoku S1. Produkce proteinů probíhala podle protokolu 4.2.3.3. Vzorky *reaction* roztoku po proběhlé reakci byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-polyHis (HIS1) ředěné 1000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Protein HIS-GFP byl ještě detekován metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-GFP(B-2) ředěné 1000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Vždy byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem ImageQuant<sup>TM</sup> LAS 4000. Protein HIS-ORF6 a HIS-ORF9 se nepodařilo detekovat. Protein HIS-GFP se podařilo detekovat v polyakrylamidovém gelu barveném pomocí *Coomassie Blue*, metodou *Western blot* s použitím protilátek proti GFP i HIS-epitopu, a přímo v mikrozkuhavce s *reaction* roztokem umístěné pod transluminátor generující UV záření (data nezobrazena). Z *reaction* roztoků jsem se pokusil proteiny HIS-ORF6 a HIS-ORF9 purifikovat metodou 4.2.3.4. Vzorky některých frakcí purifikace byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou a rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-polyHis (HIS1) ředěné 1000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x.

Protein HIS-ORF9 se na rozdíl od proteinu HIS-ORF6 podařilo detekovat v polyakrylamidovém gelu barveném pomocí *Coomassie Blue*, viz Obrázek 30. Metodou *Western blot* bylo detekováno několik nespecifických pruhů u obou vzorků a pruh, který by mohl odpovídat proteinu HIS-ORF9 (data nezobrazena).



**Obrázek 30:** Purifikace proteinů HIS-ORF6 a HIS-ORF9 z *in vitro* translačního systému. Zobrazeny jsou polyakrylamidové gely obarvené pomocí *Coomassie Blue*. Velikost proteinu HIS-ORF6 je cca 117 kDa. Velikost proteinu HIS-ORF9 je cca 60 kDa. Dělení proběhlo na 10 % gelu. Červenou šipkou je označen předpokládaný protein HIS-ORF9. U jednoho standardu molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů proteinů v kDa. Nanáška všech vzorků byla 15  $\mu$ l. **1, 10:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **2-9:** Vzorky frakcí purifikace proteinu HIS-ORF6; **2:** eluce pufrem 1; **3:** eluce pufrem 2 frakce 1; **4:** eluce pufrem 2 frakce 2; **5:** eluce pufrem 2 frakce 3; **6:** eluce pufrem 3 frakce 1; **7:** eluce pufrem 3 frakce 2; **8:** eluce pufrem 3 frakce 3; **9:** eluce pufrem 4; **11-18:** Vzorky frakcí purifikace proteinu HIS-ORF9; **11:** eluce pufrem 1; **12:** eluce pufrem 2 frakce 1; **13:** eluce pufrem 2 frakce 2; **14:** eluce pufrem 2 frakce 3; **15:** eluce pufrem 3 frakce 1; **16:** eluce pufrem 3 frakce 2; **17:** eluce pufrem 3 frakce 3; **18:** eluce pufrem 4.

**Závěr:** Produkovat protein ORF6 v *in vitro* translačním systému se nepodařilo. Produkce proteinu GFP jakožto kontroly funkčnosti celého systému se podařila ve velkém množství. Produkce proteinu ORF9 se podařila v malém množství patrném pouze po následné purifikaci.



## 5.6 Příprava rekombinantních plasmidů pGKL2 kódujících velkou podjednotku RNA polymerázy se značkou

Dalším cílem této práce bylo připravit rekombinantní plasmid pGKL2 homologní rekombinací *in vivo*, který by kódoval protein ORF6 s epitopem umožňujícím detekci a purifikaci tohoto proteinu i s jeho předpokládanými interakčními partnery. Pokud by bylo možné purifikovat obě podjednotky RNA polymerázy najednou, mohl by tento systém skýtat výhodu nad samostatnou produkcí obou podjednotek v expresních systémech a následnou *in vitro* rekonstitucí v heterodimerní komplex. Přípravou rekombinantních pGKL plasmidů již bylo docíleno označení esenciálního proteinu ORF5-pGKL2 c-myc značkou na C-konci a detekce rekombinantního proteinu pomocí metody *Western blot* (SCHAFRATH a MEACOCK 1996). Vyředěním pGKL plasmidů nesoucích protein ORF5 divokého typu bylo ukázáno, že značka c-myc na C-konci tohoto proteinu nemá výraznější vliv na jeho funkci (SCHAFRATH a MEACOCK 1996).

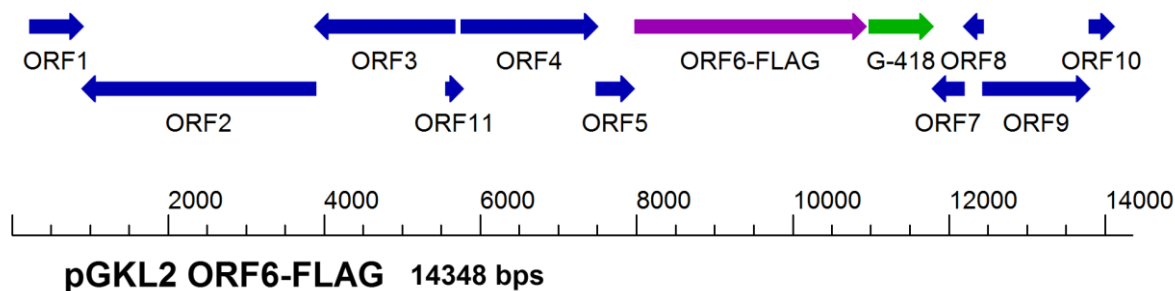
### 5.6.1 Plasmid pGKL2 ORF6-FLAG

#### 5.6.1.1 Příprava plasmidu

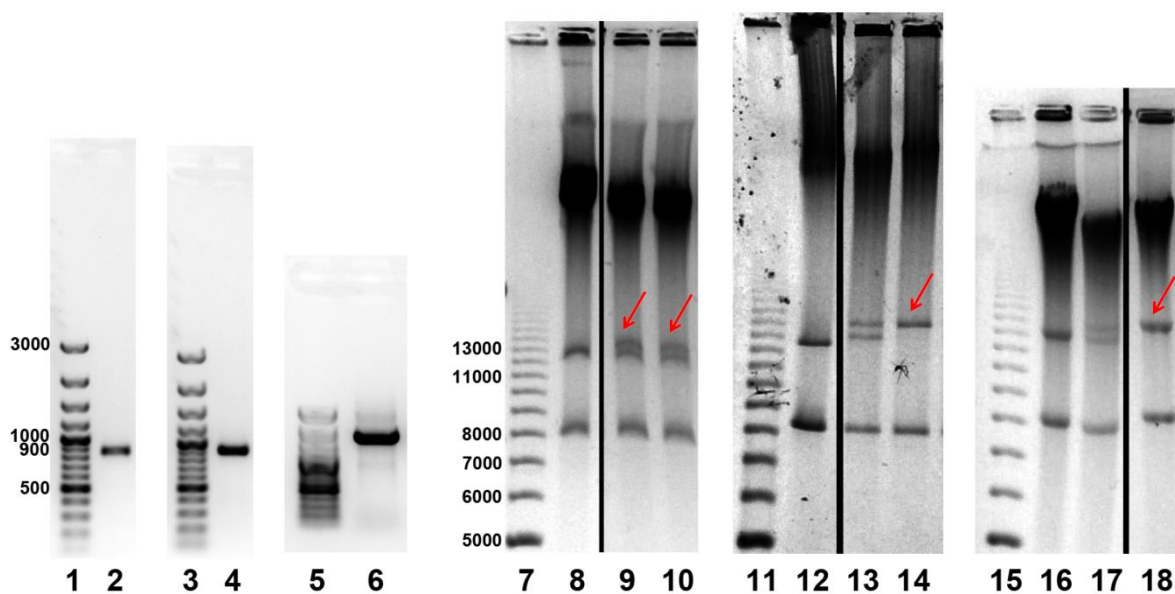
Nejdříve byl namnožen pomocí reakce PCR úsek 3' konce genu ORF6 s primery KL\_orf6C\_Flag2F a KL\_orf6C\_Flag1R, kterými byla zavedena do výsledného produktu reakce značka FLAG za sekvenci kódující C-konec proteinu ORF6. Jako templát sloužily pGKL plasmidy izolované mým školitelem ultracentrifugací v izopyknickém gradientu chloridu cesného. Dále byl pomocí reakce PCR namnožen úsek odpovídající genu G-418, před kterým se nacházela UCS genu ORF2 plasmidu pGKL1, a části genu ORF7. K reakci byly použity primery KL\_orf6C\_Flag2F a KL\_orf6C\_Flag2R a jako templát sloužily pGKL plasmidy kmene *K. lactis* IFO 1267 pGKL1 ORF2::G-418 izolované Petrou Sekyrovou ultracentrifugací v izopyknickém gradientu chloridu cesného (SEKYROVÁ 2004). Produkty obou reakcí s částečným vzájemným překryvem byly izolovány z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Izolované produkty sloužily jako templát fúzní PCR reakce s primery KL\_orf6C\_Flag1F a KL\_orf6C\_Flag2R. Produkt fúzní PCR reakce, tvořící kazetu integrující se do plasmidu pGKL2, byl izolován z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6 a vnesen do kmene *K. lactis* IFO 1267 metodou 4.2.2.5.2 a 4.2.2.5.3. Transformované buňky byly vysety na misky YPDA s G-418. Několik vybraných monoklonií bylo testováno na přítomnost rekombinantního plasmidu tak, že z nich byly pGKL plasmidy

minipreparovány metodou 4.2.2.1.4 a podrobeny elektroforetickému dělení při napětí 1 V/cm minimálně 22 hodin. Buňky dvou nezávislých klonů, které vykazovaly přítomnost pGKL plasmidů divokého typu a modifikovaného plasmidu nazvaného pGKL2 ORF6-FLAG, byly pasážovány v 5-10 ml tekutého média YPD + G-418 s cílem vyředit plasmid pGKL2 divokého typu. Jedna pasáž trvala přibližně 12-24 hodin. Zhruba po každé desáté pasáži byla část buněk vyseta na misky YPDA s G-418 a u šestnácti monoklonií bylo analyzováno složení pGKL plasmidů minipreparací a elektroforetickou analýzou. U jednoho klonu se podařilo detekovat monoklonií s vyřaděným plasmidem pGKL2 divokého typu po 10. pasáži, u druhého klonu se podařilo detekovat monoklonií s vyřaděným plasmidem pGKL2 divokého typu po 21. pasáži. U buněk těchto dvou monoklonií označených A a B byly pGKL plasmidy izolovány metodou 4.2.2.1.5. Takto izolované plasmidy sloužily jako templát pro PCR reakci s primery kanR2 a ORF6-K2\_tail\_2. Produkty PCR reakcí byly izolovány z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Izolované produkty byly připraveny k sekvenaci metodou 4.2.2.6.2 primerem in\_Kan\_rev1. Sekvence v oblasti kódující FLAG-epitop u obou monoklonií obsahujících pouze plasmid pGKL1 a pGKL2 ORF6-FLAG odhalila přítomnost stopkodónu před FLAG značkou ponechávající nativní C-konec proteinu ORF6. U jedné monoklonie po 10. pasáži vznikl stopkodón jednonukleotidovou záměnou báze prvního kodónu FLAG značky, u druhé monoklonie po 21. pasáži vznikl trinukleotidovou adicí mezi poslední kodón proteinu ORF6 a první kodón značky FLAG.

Celý proces od tvorby integrační kazety byl opakován ještě jednou, s tím rozdílem, že integrační kazeta a oblast modifikovaného plasmidu pGKL2 vzniklého transformací byla sekvenována v oblasti kódující značku FLAG. Sekvence odhalila, že sekvence kódující stopkodón není v integrační kazetě ani v rekombinantním plasmidu přítomná. Pasážováním buněk dvou nezávislých klonů byly po 20. pasáži opět detekovány monoklonie, u kterých byl plasmid pGKL2 divokého typu vyředen. Z buněk těchto dvou monoklonií a dalších dvou monoklonií, kde byl plasmid pGKL2 divokého typu zachován, byla izolována DNA protokolem 4.2.2.1.8 – metodou 2 a použita jako templát pro PCR reakci s primery kanR2 a inORF6\_forv3. Produkty PCR reakcí byly izolovány z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Izolované produkty byly připraveny k sekvenaci metodou 4.2.2.6.2 primerem in\_Kan\_rev1. Sekvence v oblasti kódující FLAG-epitop odhalila stopkodón ponechávající nativní C-konec proteinu ORF6 pouze u kolonií s vyřaděným plasmidem pGKL2 divokého typu. Schéma modifikovaného plasmidu viz Obrázek 31. Elektroforetogramy kroků přípravy rekombinantního plasmidu a detekce pGKL plasmidů v buňkách analyzovaných klonů viz Obrázek 32.



**Obrázek 31:** Schématické znázornění kódující kapacity plasmidu pGKL2 ORF6-FLAG. Šipky indikují otevřené čtecí rámce a jejich transkripční směr. Fialová šipka indikuje otevřený čtecí rámec kódující rekombinantní protein ORF6 se značkou FLAG na C-konci. Zelená šipka indikuje otevřený čtecí rámec kódující rezistenci k G-418. U plasmidu je uvedena jeho velikost v párech bází.



**Obrázek 32:** Elektroforetogramy kroků přípravy rekombinantního plasmidu pGKL2 ORF6-FLAG a detekce pGKL plasmidů v buňkách analyzovaných klonů. Elektroforetogramy jsou zobrazeny v invertovaných barvách. Červená šipka vždy označuje plasmid pGKL2 ORF6-FLAG. U dvou standardů molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů v párech bází. **1, 3, 5:** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; **2:** Fragment genu ORF6 namnoženého pomocí PCR, velikost 865 bp; **4:** Fragment kódující gen pro rezistenci k G-418 namnožený pomocí PCR, velikost 898 bp; **6:** Produkt fúzní reakce PCR s použitím předchozích dvou fragmentů jako templátů, produkt sloužil jako integrační kazeta, velikost 1729 bp; **8, 12, 16:** Izolované plasmidy pGKL z kmene *K. lactis* IFO 1267, velikost pGKL1 8874 bp, velikost pGKL2 13457 bp; **9, 10:** Izolované plasmidy pGKL nezávislého klonu 1 a 2 kmene *K. lactis* IFO 1267 transformovaného integrační kazetou, velikost pGKL2 ORF6-FLAG 14348 bp; **13, 14:** Izolované plasmidy pGKL dvou monoclonií získaných po 10 pasážích klonu 1, pouze kolonie z řady 14 označená jako kolonie A má vyředený plasmid pGKL2 divokého typu; **17, 18:** Izolované plasmidy pGKL dvou monoclonií získaných po 21 pasážích klonu 2, pouze kolonie z řady 18 označená jako kolonie B má vyředený plasmid pGKL2 divokého typu.

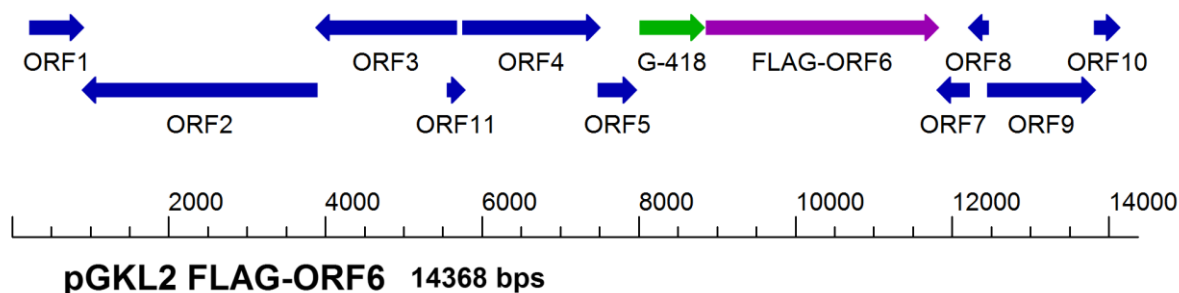
**Závěr:** Nativní C-konec proteinu ORF6 je esenciální pro udržení pGKL plasmidů v buňkách. Přidání proteinové značky C-konec proteinu ORF6 nějakým způsobem ovlivňuje funkci tohoto proteinu *in vivo*.

## 5.6.2 Plasmid pGKL2 FLAG-ORF6

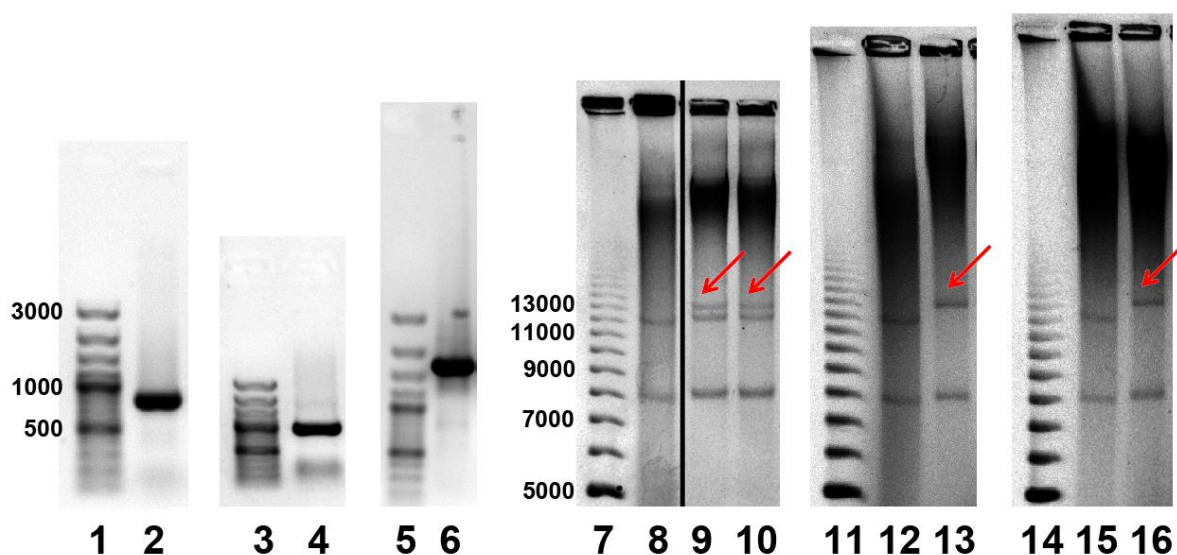
### 5.6.2.1 Příprava plasmidu

Nejprve byl namnožen pomocí reakce PCR úsek 5' konce genu ORF6 s primery KL\_orf6N\_Flag2F a inORF6rev, kterými byla zavedena do výsledného produktu reakce značka FLAG před sekvencí kódující N-konec proteinu ORF6. Jako templát sloužily pGKL plasmidy izolované z klonu A (viz kapitola 5.6.1.1) metodou 4.2.2.1.5. Dále byl pomocí reakce PCR namnožen úsek odpovídající genu G-418, před kterým se nacházela UCS genu ORF2 plasmidu pGKL1, a části genu ORF5. K reakci byly použity primery KL\_orf6N\_Flag1F a KL\_orf6N\_Flag1R, a jako templát sloužily pGKL plasmidy izolované z klonu A metodou 4.2.2.1.5. Produkty obou reakcí s částečným vzájemným překryvem byly izolovány z agarosového gelu metodou 4.2.2.1.6. Izolované produkty sloužily jako templát fúzní PCR reakce s primery KL\_orf6N\_Flag1F a inORF6rev. Produkt fúzní PCR reakce, tvořící kazetu integrující se do plasmidu pGKL2, byl izolován metodou 4.2.2.1.7 a vnesen do kmene *K. lactis* IFO 1267 metodou 4.2.2.5.2. Transformované buňky byly vysety na misky YPDA s G-418. Několik vybraných monoklonií bylo testováno na přítomnost rekombinantního plasmidu tak, že z nich byly pGKL plasmidy minipreparovány metodou 4.2.2.1.4 a podrobeny elektroforetické analýze. Buňky dvou nezávislých klonů, které vykazovaly přítomnost pGKL plasmidů divokého typu a modifikovaného plasmidu nazvaného pGKL2 FLAG-ORF6, byly pasážovány v 5-10 ml tekutého média YPD + G-418 s cílem vyředit plasmid pGKL2 divokého typu. Zhruba po každé páté pasáži byla část buněk vyseta na misky YPDA s G-418 a u šestnácti monoklonií bylo analyzováno složení pGKL plasmidů minipreparací a elektroforetickou analýzou. Kromě jednoho případu u všech analyzovaných monoklonií obou klonů byl plasmid pGKL2 divokého typu vyředěn již po 5. pasáži. Z buněk obou nezávislých klonů a dvou vybraných monoklonií po 5. pasáži nezávislých klonů byla izolována DNA protokolem 4.2.2.1.8 – metodou 1 a použita jako templát pro reakci PCR s primery kanR1 a inORF6rev. Produkty PCR reakcí byly izolovány pomocí FastBack DNA Minispin Kit bez předchozího elektroforetického dělení. Izolované produkty byly připraveny k sekvenaci metodou 4.2.2.6.2 primerem 5RACE\_O6\_K2. Sekvence odhalila správné napojení sekvence kódující značku FLAG na sekvenci N-konce proteinu ORF6.

Schéma modifikovaného plasmidu viz Obrázek 33. Elektroforetogramy kroků přípravy rekombinantního plasmidu a detekce pGKL plasmidů v buňkách analyzovaných klonů viz Obrázek 34.



**Obrázek 33:** Schématické znázornění kódující kapacity plasmidu pGKL2 FLAG-ORF6. Šípky indikují otevřené čtecí rámce a jejich transkripční směr. Fialová šipka indikuje otevřený čtecí rámec kódující rekombinantní protein ORF6 se značkou FLAG na N-konci. Zelená šipka indikuje otevřený čtecí rámec kódující rezistenci k G-418. U plasmidu je uvedena jeho velikost v párech bází.

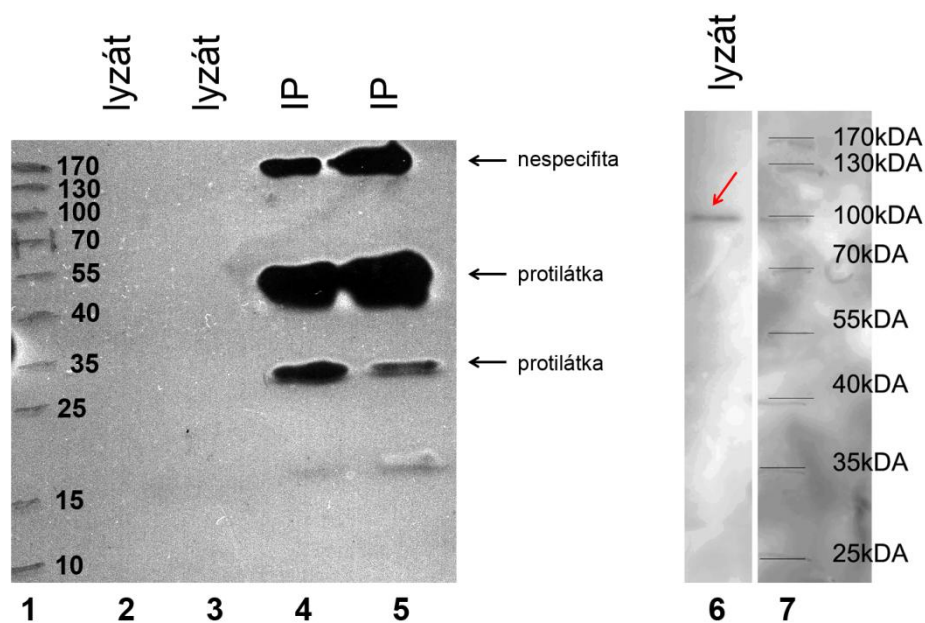


**Obrázek 34:** Elektroforetogramy kroků přípravy rekombinantního plasmidu pGKL2 FLAG-ORF6 a detekce pGKL plasmidů v buňkách analyzovaných klonů. Elektroforetogramy jsou zobrazeny v invertovaných barvách. Červená šipka vždy označuje plasmid pGKL2 FLAG-ORF6. U dvou standardů molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů v párech bází. **1, 3, 5:** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; **7, 11, 14:** EZ Load™ 1 kb Molecular Ruler; **2:** Fragment genu ORF6 namnoženého pomocí PCR, velikost 819 bp; **4:** Fragment kódující gen pro rezistenci k G-418 namnožený pomocí PCR, velikost 957 bp; **6:** Produkt fúzní reakce PCR s použitím předchozích dvou fragmentů jako templátů, produkt sloužil jako integrační kazeta, velikost 1733 bp; **8, 12, 15:** Izolované plasmidy pGKL z kmene *K. lactis* IFO 1267; **9, 10:** Izolované plasmidy pGKL nezávislých klonů kmene *K. lactis* IFO 1267 transformovaného integrační kazetou, velikost pGKL2 FLAG-ORF6 14368 bp; **13, 16:** Izolované plasmidy pGKL dvou monoklonií získaných po 5 pasážích obou nezávislých klonů, vyředený plasmid pGKL2 divokého typu měla i většina ostatních analyzovaných monoklonií.

**Závěr:** Na N-konec proteinu ORF6 se dá připojit značka FLAG bez vlivu na udržení pGKL plasmidů v buňkách.

### 5.6.2.2 Detekce a imunoprecipitace proteinu FLAG-ORF6

Detekovat rekombinantní protein FLAG-ORF6 v lyzátech buněk jednoho vybraného klonu, který měl plasmid pGKL2 divokého typu vyředěn, jsem se pokusil několikrát. Lyzáty kmene *K. lactis* IFO 1267 kultivovaného v médiu YPD a *K. lactis* IFO 1267 FLAG-ORF6 kultivovaného v médiu YPD + G-418 jsem připravil několikrát nezávisle na sobě z množství kultury 5-500 ml o optické denzitě 1-10 při 600 nm metodami 4.2.3.5.1, 4.2.3.5.2 a 4.2.3.5.3. Vzorky lyzátů byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-FLAG<sup>®</sup> (M2) ředěné 2000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. V případě některých vzorků byla použita nitrocelulózová membrána a chemiluminiscenční detekce na rentgenový film, v případě jiných vzorků byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem ImageQuant<sup>™</sup> LAS 4000. Protein, který by svojí molekulovou hmotností mohl odpovídat proteinu FLAG-ORF6, se podařilo detekovat pouze jedenkrát spojením lyzátu připraveného metodou 4.2.3.5.1 z 5 ml kultury o optické denzitě 10 při 600 nm, PVDF membrány a detekce přístrojem ImageQuant<sup>™</sup> LAS 4000 ve vyšším citlivostním režimu. Fotografie detekovaného proteinu je na Obrázku 35. Rekombinantní protein FLAG-ORF6 jsem se pokusil imunoprecipitovat dvakrát metodou 4.2.3.6 a jednou z lyzátu připraveného metodou 4.2.3.5.3 pomocí protilátky anti-FLAG<sup>®</sup> (M2). Objemy vstupní kultury byly 100-500 ml. Vzorky lyzátů a imunoprecipitátů byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-FLAG<sup>®</sup> (M2) ředěné 2000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. V případě některých vzorků byla použita nitrocelulózová membrána a chemiluminiscenční detekce na rentgenový film, v případě jiných vzorků byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem ImageQuant<sup>™</sup> LAS 4000. Ve vzorcích lyzátů a imunoprecipitátů se nepodařilo protein FLAG-ORF6 detekovat. Protein FLAG-ORF6 se nepodařilo detekovat ani v polyakrylamidových gelech obarvených *Coomassie Blue* a stříbrem (protokoly 4.2.3.12.2 a 4.2.3.12.3) po proběhlé proteinové elektroforéze. Rentgenový film, na kterém byly detekovány proteiny s FLAG-epitopem v lyzátech a imunoprecipitátech pomocí metody *Western blot*, jsou zachyceny na Obrázku 35.



**Obrázek 35:** Vlevo rentgenový film zobrazující detekované proteiny s FLAG-epitopem. Vpravo obrázek detekovaných proteinů s FLAG-epitopem pomocí přístroje ImageQuant™ LAS 4000. Velikost proteinu FLAG-ORF6 je cca 114 kDa. Dělení proběhlo na 10 % a 9 % gelu. Červenou šipkou je označen předpokládaný protein FLAG-ORF6. Černou šipkou je označen nespecifický signál a řetězce protilátky anti-FLAG® (M2). 1, 7: PageRuler™ Prestained Protein Ladder s vyznačenými velikostmi proteinů v kDa; 2: 25  $\mu$ l lyzátu kmene *K. lactis* IFO 1267; 3: 25  $\mu$ l lyzátu kmene *K. lactis* IFO 1267 FLAG-ORF6; 4: 25  $\mu$ l imunoprecipitátu kmene *K. lactis* IFO 1267; 5: 25  $\mu$ l imunoprecipitátu kmene *K. lactis* IFO 1267 FLAG-ORF6; 6: 25  $\mu$ l lyzátu kmene *K. lactis* IFO 1267 FLAG-ORF6 připraveného metodou 4.2.3.5.1.

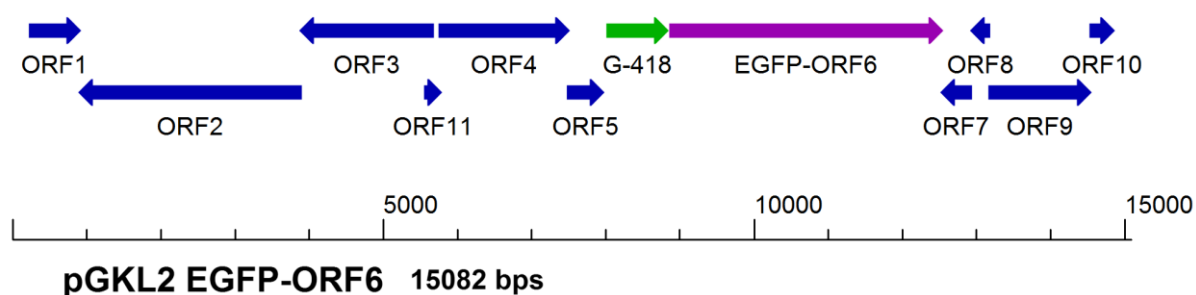
**Závěr:** Podařilo se detekovat protein FLAG-ORF6. Imunoprecipitovat tento protein se nepodařilo.

### 5.6.3 Plasmid pGKL2 EGFP-ORF6

#### 5.6.3.1 Příprava plasmidu

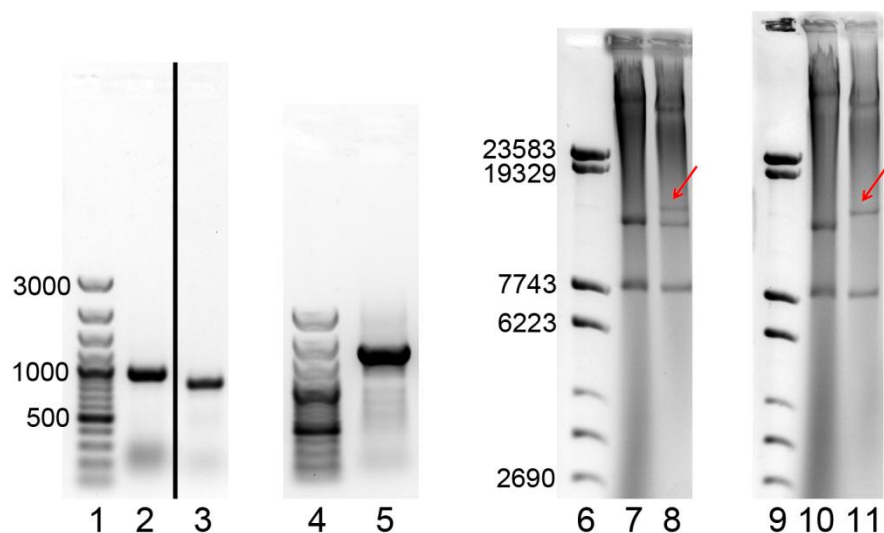
Jeden z hlavních důvodů pro přípravu dalšího rekombinantního plasmidu pGKL2 kódujícího protein ORF6 se značkou byl nepříliš velký úspěch při detekci a imunoprecipitaci proteinu FLAG-ORF6. Proto jsem se rozhodl připravit plasmid, který by kódoval protein ORF6 ve fúzi se zeleným fluorescenčním proteinem, což by mohlo sloužit i pro detekci rekombinantního proteinu v buňkách fluorescenční mikroskopii, i když na analýzy tohoto typu nezbyl čas. Jako zdroj výchozí sekvence genu GFP byl použit vektor pUG36 (GenBank číslo: AF298791.1), který kóduje kvasinkový posílený zelený fluorescenční protein 3 (yEGFP3), což je

varianta genu GFP, která má své složení kodónů optimalizované pro použití v kvasince *Candida albicans* a která kóduje oproti GFP divokého typu jiné aminokyselinové zbytky na dvou pozicích, jmenovitě zbytek glycinu místo serinu na pozici 65 a zbytek alaninu místo serinu na pozici 72. Tyto dvě substituce by měly protein yEGFP3 činit solubilnějším a jeho fluorescence by měla být až 75x větší než u proteinu GFP divokého typu (CORMACK *et al.* 1997). Postup přípravy rekombinantního plasmidu pGKL2 byl podobný jako v předchozích dvou případech, proto zde nebude tak podrobně popsán. Pomocí reakce PCR s primery KL\_orf6N\_EGFP2F a KL\_orf6N\_EGFP2R byl namnožen gen yEGFP3, dále jen již jako EGFP, s částí genu ORF6 kódující N-konec. Pomocí reakce PCR s primery KL\_orf6N\_Flag1F a KL\_orf6N\_EGFP1R byl namnožen úsek odpovídající genu G-418. Izolované produkty obou reakcí sloužily jako templát pro fúzní PCR reakci s primery KL\_orf6N\_Flag1F a KL\_orf6N\_EGFP2R. Produkt fúzní PCR reakce, tvořící integrační kazetu, byl vnesen do kmene *K. lactis* IFO 1267. Buňky dvou nezávislých transformovaných klonů, které vykazovaly přítomnost pGKL plasmidů divokého typu a modifikovaného plasmidu nazvaného pGKL2 EGFP-ORF6, byly pasážovány. Již po 4. pasáži bylo u některých monoklonií získaných z obou klonů patrné vyředení plasmidu pGKL2 divokého typu. Úsek plasmidu pGKL2 EGFP-ORF6 u dvou takovýchto vybraných monoklonií byl namnožen pomocí PCR s primery kanR1 a 5RACE\_O6\_K2 a sekvenován primery kanR1 a 5RACE\_O6\_K2. Sekvence odhalila správné napojení sekvence kódující EGFP na sekvenci N-konce proteinu ORF6 a správnost celé sekvence kódující EGFP, pouze s mutací jediného nukleotidu, která ovšem nemění kódovaný aminokyselinový zbytek. Schéma modifikovaného plasmidu viz Obrázek 36. Elektroforetogramy kroků přípravy rekombinantního plasmidu a detekce pGKL plasmidů v buňkách analyzovaných klonů viz Obrázek 37.



**Obrázek 36:** Schématické znázornění kódující kapacity plasmidu pGKL2 EGFP-ORF6. Šipky indikují otevřené čtecí rámce a jejich transkripční směr. Fialová šipka indikuje otevřený čtecí rámec kódující fúzní protein ORF6 s proteinem EGFP na N-konci. Zelená šipka indikuje otevřený čtecí rámec kódující rezistenci k G-418. U plasmidu je uvedena jeho velikost v párech bází.





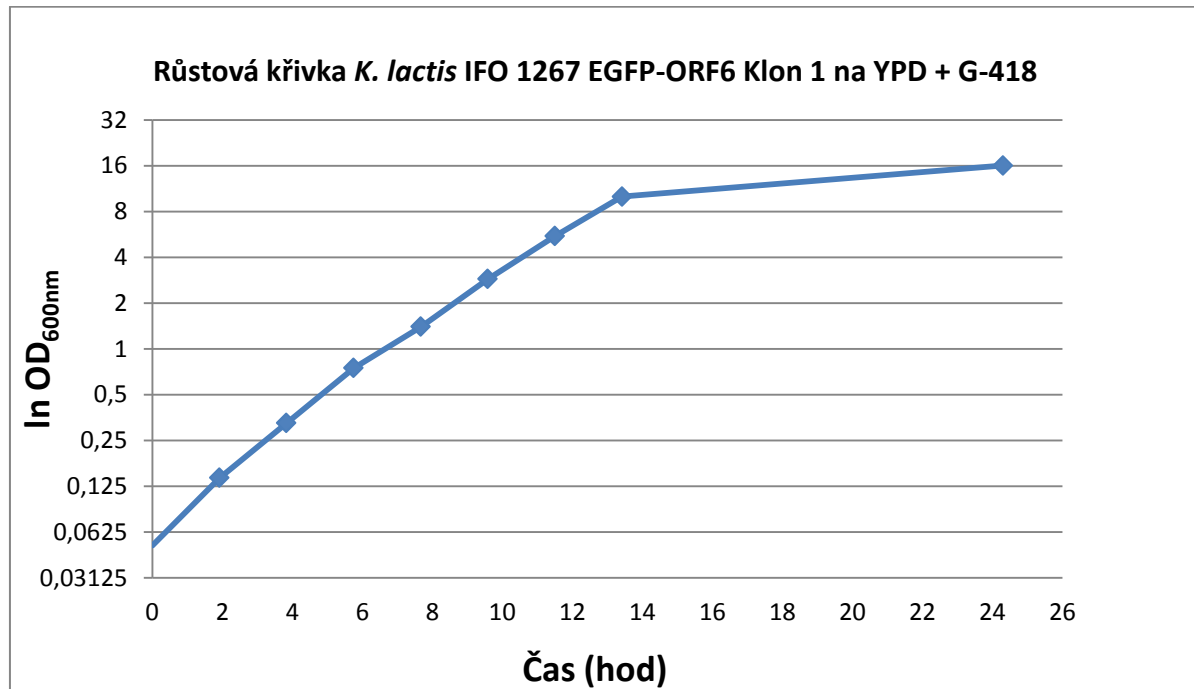
**Obrázek 37:** Elektroforetogramy kroků přípravy rekombinantního plasmidu pGKL2 EGFP-ORF6 a detekce pGKL plasmidů v buňkách analyzovaných klonů. Elektroforetogramy jsou zobrazeny v invertovaných barvách. Červená šipka vždy označuje plasmid pGKL2 EGFP-ORF6. U dvou standardů molekulových hmotností jsou vyznačeny velikosti některých pruhů v párech bází. **1, 4:** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; **6, 9:** Lambda DNA/*Eco130I* (*StyI*) Marker, 16; **2:** Fragment kódující gen pro rezistenci k G-418 namnožený pomocí PCR, velikost 957 bp; **3:** Fragment kódující gen EGFP namnožený pomocí PCR, velikost 817 bp; **5:** Produkt fúzní reakce PCR s použitím předchozích dvou fragmentů jako templátů, produkt sloužil jako integrační kazeta, velikost 1731 bp; **7, 10:** Izolované plasmidy pGKL z kmene *K. lactis* IFO 1267; **8:** Izolované plasmidy pGKL vybraného klonu kmene *K. lactis* IFO 1267 transformovaného integrační kazetou, velikost pGKL2 EGFP-ORF6 15082 bp; **11:** Izolované plasmidy pGKL monokolonie získané po 4 pasážích vybraného klonu, vyředěný plasmid pGKL2 divokého typu měla i většina ostatních analyzovaných monoklonií.

Buňky čtyř monoklonií kmene *K. lactis* IFO 1267 pGKL2 EGFP-ORF6 a kontrolního kmene *K. lactis* IFO 1267 kultur o optických denzitách 1 a 15 při 600 nm byly připraveny pro detekci fluorescence podle protokolu 4.2.1.7. Analýzu na průtokovém cytometru BD™ LSRII Flow Cytometer provedl můj školitel. Detekce a analýza probíhala stejně jako v kapitole 5.4.2. Buňky kmene nevykazovaly vyšší fluorescenci než buňky kontrolního kmene.

**Závěr:** Na N-konec proteinu ORF6 se dá připojit protein EGFP bez vlivu na udržení pGKL plasmidů v buňkách. Detekovat fúzní protein EGFP-ORF6 v buňkách kmene *K. lactis* IFO 1267 pGKL2 EGFP-ORF6 pomocí průtokového cytometru se nepodařilo.

### 5.6.3.2 Detekce a semikvantitativní analýza exprese proteinu EGFP-ORF6

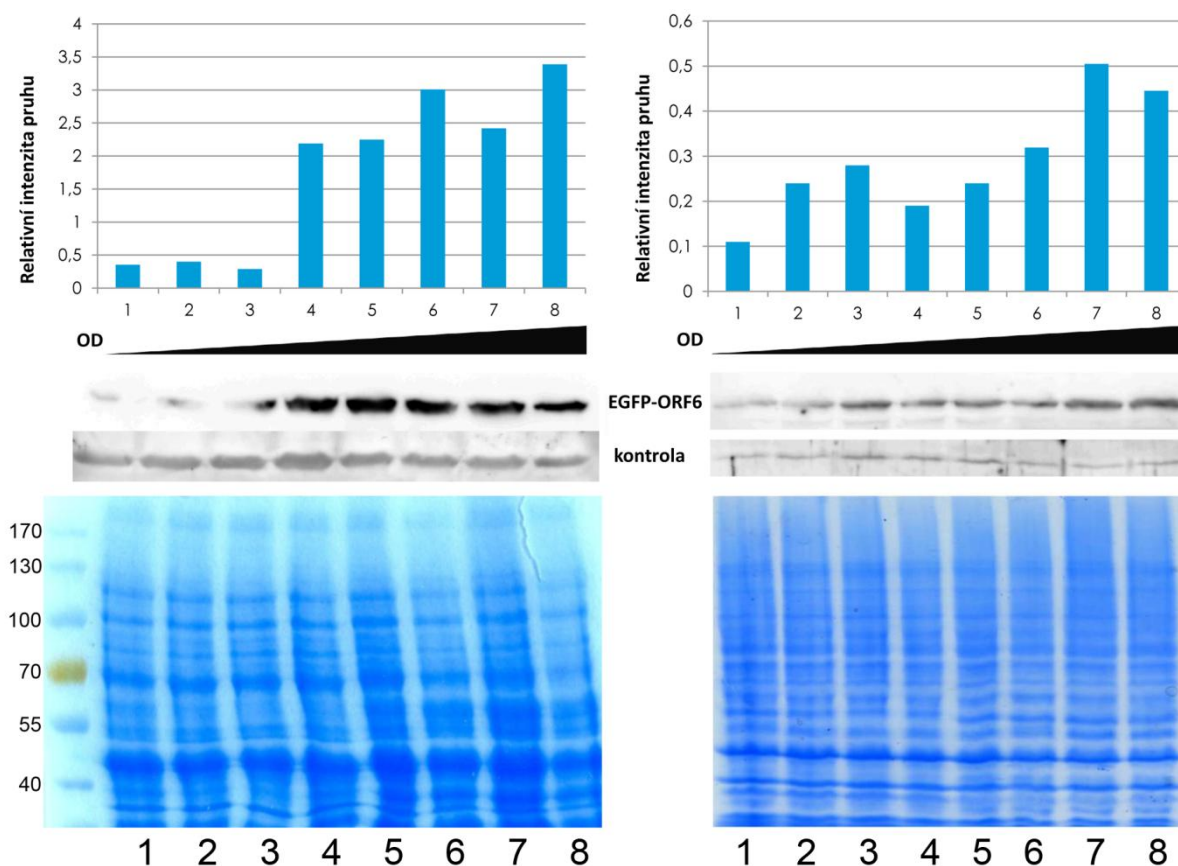
Pokusil jsem se detekovat rekombinantní protein EGFP-ORF6 v lyzátech buněk dvou vybraných klonů, které měly plasmid pGKL2 divokého typu vyředen. Lyzáty kmene *K. lactis* IFO 1267 kultivovaného v médiu YPD a dvou klonů kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 kultivovaného v médiu YPD + G-418 jsem připravil metodami 4.2.3.5.1 a 4.2.3.5.2. Vzorky lyzátů byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-GFP (B-2) ředěné 1000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem ImageQuant™ LAS 4000. Protein, který by svojí molekulovou hmotností mohl odpovídat proteinu EGFP-ORF6, se podařilo detekovat v lyzátech buněk obou klonů kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 připravených oběma metodami. Pokusil jsem se o semikvantitativní analýzu exprese proteinu EGFP-ORF6 podle protokolu 4.2.3.15, abychom zjistili, v které fázi růstu buněk je protein EGFP-ORF6 v buňkách přítomný a případně, jestli se hladina tohoto proteinu během růstu buněk nějakým výrazným způsobem nemění. Celkem bylo odebráno 8 vzorků kultury z různých hladin optické denzity, tyto odběry jsou vyznačeny jako body na Obrázku 38.



**Obrázek 38:** Růstová křivka vybraného klonu kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 v médiu YPD + G-418 při třepání 160 otáček za minutu. Na ose x vyneseny čas v hodinách od zaočkování do vytemperovaného média. Na ose y v logaritmickeém měřítku o základu 2 jsou vyneseny hodnoty optických denzit při 600 nm. Body znázorňují čas a optickou denzitu vzorků kultury odebraných pro semikvantitativní analýzu exprese proteinu EGFP-ORF6.

Od každého vzorku byl rozdělen objem odpovídající 150 ng celkových proteinů SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Protein EGFP-ORF6 byl detekován metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-GFP (B-2) ředěné 1000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem ImageQuant™ LAS 4000. Jako kontrolní protein byl vybrán ribozomální protein RPS0A, neboť jsme obdrželi z laboratoře dr. Valáška protilátku rozeznávající tento protein u *S. cerevisiae*. Aminokyselinové zbytky proteinu RPS0A u *K. lactis* jsou z více jak 95 % identické k proteinu RPS0A u *S. cerevisiae*. V jednom případě byly z již použité *Western blot* membrány odstraněny protilátky protokolem 4.2.3.14 a detekován protein RPS0A s použitím protilátky anti-RPS0A ředěné 500x a protilátky anti-rabbit IgG-HRP ředěné 5000x. Protein RPS0A má cca 28 kDa a na membráně se proteiny této velikosti nenacházely, neboť byly záměrně ponechány vyputovat z gelu použitého pro *Western blot* pro docílení dělení proteinů větších molekulových hmotností na delší vzdálenosti gelu. Pro semikvantifikaci tak byly použity pruhy proteinu nespecificky detekovaného kombinací těchto protilátek, jejichž intenzita se jevila býti u všech vzorků obdobná. V druhém případě byla membrána po blotování rozstřížena a na jedné její části byl detekován protein EGFP-ORF6 a na druhé části byl detekován protein RPS0A. Bohužel díky nevhodné intenzitě pruhů předpokládaného proteinu RPS0A byly pro semikvantifikaci i v tomto případě použity pruhy proteinu nespecificky detekovaného kombinací protilátek anti-RPS0A a anti-rabbit IgG-HRP, jejichž intenzita se jevila býti u všech vzorků obdobná. Výsledek dvou nezávislých pokusů o semikvantifikaci exprese proteinu EGFP-ORF6 je zobrazen na Obrázku 39.

**Závěr:** Protein EGFP-ORF6 je snadněji detekovatelný než protein FLAG-ORF6. Protein EGFP-ORF6 se podařilo detekovat v lyzátech kultury *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 všech vzorků odebraných na semikvantifikaci. Protein EGFP-ORF6 se v buňkách vyskytuje v exponenciální fázi růstu, v pozdně exponenciální fázi růstu a ve fázi zpomaleného růstu. Výsledky semikvantitativní analýzy naznačují, že hladina proteinu EGFP-ORF6 by se mohla průběhem kultivace mírně zvyšovat.

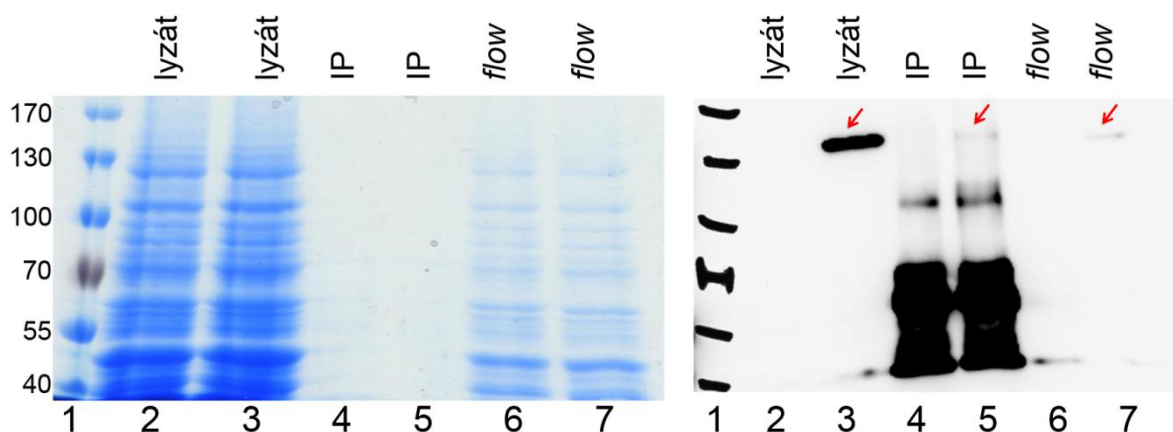


**Obrázek 39:** Výsledky dvou semikvantitativních analýz exprese proteinu EGFP-ORF6. Sloupcový graf udává podíl relativní sumy intenzity kontrolního proteinu a relativní sumy intenzity proteinu EGFP-ORF6 pro vzorky 1 až 8. Pod sloupci grafu každého vzorku je zobrazen protein EGFP-ORF6 a kontrolní protein detekovaný metodou *Western blot* a použitý ke kvantifikaci. Pod detekovanými proteiny jsou zobrazeny polyakrylamidové gely obarvené pomocí *Coomassie Blue*, jako kontrola nanášky. Na gelu vlevo byly souběžně děleny stejné vzorky jako na gelu, který byl použit pro blotování. Gel vpravo je gel použitý pro blotování, který byl posléze obarven. Dělení probíhalo na 8 % a 10 % gelu. **1-8:** Vzestupně číslované vzorky odebrané z různých hladin optické denzity, zobrazené na předchozím obrázku.

### 5.6.3.3 Imunoprecipitace proteinu EGFP-ORF6

Rekombinantní protein EGFP-ORF6 jsem se pokusil imunoprecipitovat dvakrát metodou 4.2.3.6 pomocí protilátky anti-GFP (B-2). Objemy vstupních kultur byly vždy 100 ml a jejich optická denzita byla 1 a 8. Vzorky lyzátů a imunoprecipitátů byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-GFP (B-2) ředěné 1000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem ImageQuant™ LAS 4000. Ve vzorcích lyzátů a imunoprecipitátů se podařilo protein EGFP-ORF6 detekovat.

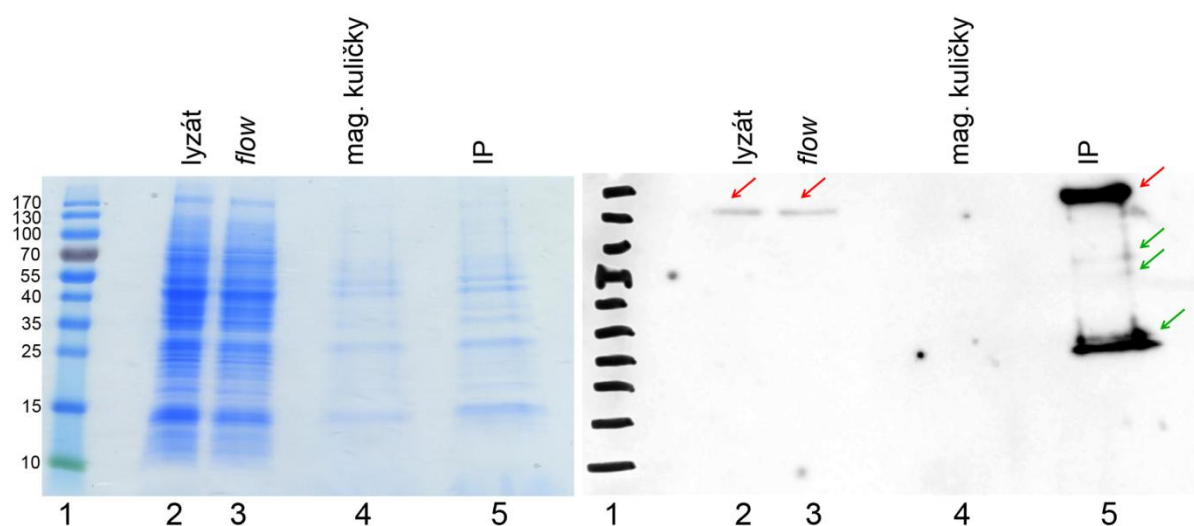
Ve vzorcích imunoprecipitátů však byl protein EGFP-ORF6 patrný pouze při použití vyššího citlivostního režimu přístroje ImageQuant™ LAS 4000. K zakoncentrování proteinu EGFP-ORF6 imunoprecipitací nedošlo. Protein EGFP-ORF6 ani jeho předpokládaní interakční partneri nebyli ve vzorcích imunoprecipitátů, rozdělených proteinovou elektroforézou a barvených pomocí *Coomassie Blue* a stříbra, patrné. Vzorky lyzátů a imunoprecipitátů zobrazené na polyakrylamidovém gelu po proteinové elektroforéze obarveném pomocí *Coomassie Blue* a fotografie detekovaných proteinů s GFP-epitopem pomocí metody *Western blot*, jsou zachyceny na Obrázku 40.



**Obrázek 40:** Vlevo polyakrylamidový gel obarvený pomocí *Coomassie Blue*, na kterém byly děleny stejné vzorky, které byly použity pro *Western blot*. Vpravo obrázek detekovaných proteinů s EGFP-epitopem pomocí přístroje ImageQuant™ LAS 4000, složený ze 4 fotografií o expozici 5 min. v režimu Super. Velikost proteinu EGFP-ORF6 je cca 140 kDa. Dělení proběhlo na 8 % gelu. Červenou šipkou je označen předpokládaný protein EGFP-ORF6. 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, v jednom případě s vyznačenými velikostmi proteinů v kDa; 2: 20  $\mu$ l lyzátu kmene *K. lactis* IFO 1267; 3: 20  $\mu$ l lyzátu kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6; 4: 20  $\mu$ l imunoprecipitátu kmene *K. lactis* IFO 1267; 5: 20  $\mu$ l imunoprecipitátu kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6; 6: 20  $\mu$ l 3x naředěného lyzátu po imunoprecipitaci (*flow*) kmene *K. lactis* IFO 1267; 7: 20  $\mu$ l 3x naředěného lyzátu zbylého po imunoprecipitaci (*flow*) kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6.

Protein EGFP-ORF6 jsem se pokusil imunoprecipitovat třikrát pomocí GFP-Trap®\_M metodou 4.2.3.7. Tento komerční výrobek využívá monoklonální anti-GFP protilátky z lamy, kovalentně vázané na magnetických kuličkách. Dvakrát jsem připravil lyzáty podle protokolů 4.2.3.5.3 a 4.2.3.6. Objemy vstupních kultur byly 100 ml a 200 ml. Jejich optická densita se vždy pohybovala kolem hodnoty 6. Vzorky lyzátů a imunoprecipitátů byly rozděleny SDS-PAGE proteinovou elektroforézou. Rekombinantní proteiny byly detekovány metodou *Western blot* s použitím protilátky anti-GFP (B-2) ředěné 1000x a protilátky anti-mouse IgG-HRP ředěné 5000x. Byla použita PVDF membrána a chemiluminiscenční detekce přístrojem ImageQuant™ LAS 4000. Ve vzorcích lyzátů a imunoprecipitátů se podařilo protein EGFP-ORF6 detekovat.

Ve vzorcích imunoprecipitátů bylo patrné zakoncentrování proteinu EGFP-ORF6. Protein EGFP-ORF6 ani jeho předpokládaní interakční partneři nebyli ve vzorcích imunoprecipitátů, rozdělených proteinovou elektroforézou a barvených pomocí *Coomassie Blue* a stříbra, patrné. Ve vzorcích imunoprecipitátů byla patrná kromě specifické vazby proteinu s GFP-epitopem nesespecifická vazba většiny proteinů lyzátu na magnetické kuličky. Tato nesespecifická vazba všech proteinů tvořící nečistoty ve vzorku, které mohou bránit detekci proteinu EGFP-ORF6 barvením stříbrem, se u imunoprecipitátů vyskytovala nezávisle na celkové koncentraci detergentu Nodidet P-40 v lyzátu, době inkubace lyzátu s GFP-Trap®\_M a přečištění lyzátu samotnými magnetickými kuličkami bez anti-GFP protilátky. Vzorky lyzátu a imunoprecipitátů, připravené pomocí GFP-Trap®\_M, zobrazené na polyakrylamidovém gelu po proteinové elektroforéze a obarvené pomocí *Coomassie Blue* a fotografie detekovaných proteinů s GFP-epitopem pomocí metody *Western blot*, jsou zachyceny na Obrázku 41.



**Obrázek 41:** Vlevo polyakrylamidový gel obarvený pomocí *Coomassie Blue*, na kterém byly děleny stejné vzorky, které byly použity pro *Western blot*. Vpravo obrázek detekovaných proteinů s EGFP-epitopem pomocí přístroje ImageQuant™ LAS 4000, složený ze 3 fotografií o expozici 5 min. v režimu High. Velikost proteinu EGFP-ORF6 je cca 140 kDa. Dělení proběhlo na 5-20 % gradientovém gelu. Červenou šipkou je označen předpokládaný protein EGFP-ORF6. Zelenou šipkou jsou označeny degradační produkty proteinu EGFP-ORF6. **1:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder, v jednom případě s vyznačenými velikostmi proteinů v kDa; **2:** 20  $\mu$ l lyzátu kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6; **3:** 20  $\mu$ l lyzátu kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 po imunoprecipitaci pomocí GFP-Trap®\_M (*flow*); **4:** 20  $\mu$ l proteinů kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 zachycených na magnetické kuličky; **5:** 20  $\mu$ l proteinů kmene *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 imunoprecipitovaných pomocí GFP-Trap®\_M.

**Závěr:** Imunoprecipitace proteinu EGFP-ORF6 protilátkou anti-GFP (B-2) není účinná. Imunoprecipitace proteinu EGFP-ORF6 pomocí GFP-Trap<sup>®</sup>\_M je účinná, ale imunoprecipitáty obsahují nečistoty. Protein EGFP-ORF6 ani žádné interakční partnery se zatím nepodařilo detekovat barvením polyakrylamidových gelů po proběhlé proteinové elektroforéze se vzorky imunoprecipitátů.

## 5.7 Příprava rekombinantního plasmidu pGKL2 s mutovaným předpokládaným SAM vazebným místem proteinu ORF6

Tvorbou rekombinantního plasmidu pGKL2, který by měl mutované předpokládané SAM vazebné místo, které by se mohlo nacházet v insertu I proteinu ORF6 (kapitola 5.1.1), jsme se chtěli přesvědčit o esenciálnosti tohoto místa pro udržení pGKL plasmidů v buňkách. Motiv DxxK byl mutován na AxxA. Mutace obdobného motivu DxxR u methyltransferázy Alfavirů má za následek ztrátu schopnosti vázat SAM (HUANG *et al.* 2004). Postup přípravy rekombinantního plasmidu pGKL2 byl podobný jako v předchozích případech. Pro tvorbu integrační kazety byly použity stejné primery jako při výrobě integrační kazety pro plasmid pGKL2 FLAG-ORF6 (viz kapitola 5.6.2.1), pouze místo primeru inORF6rev byl použit primer K2ORF6\_SAM\_del. Integrační kazeta byla vnesena do kmene *K. lactis* IFO 1267. U transformovaných klonů, které vykazovaly přítomnost pGKL plasmidů divokého typu a modifikovaného plasmidu nazvaného pGKL2 ORF6 $\Delta$ SAM, byl namnožen pomocí reakce PCR úsek genu s místem zaváděných mutací primery kanR1 a inORF6rev a sekvenován primerem inORF6rev. Protože integrační kazeta obsahovala zaváděné mutace na jednom ze svých konců, některé modifikované plasmidy v rámci klonu mutace nesly a některé ne. Modifikované plasmidy pGKL2 transformovaných klonů tak byly pro zaváděné mutace heterozygotní. Již po 5. pasáži jednoho klonu se podařilo detekovat monokolonii, která měla vyředený plasmid pGKL2 divokého typu a její plasmidy pGKL2 ORF6 $\Delta$ SAM vykazovaly přítomnost zaváděných mutací. Modifikované plasmidy této monokolonie se tak podle detekčních limitů jeví jako homozygotní pro zaváděné mutace. Elektroforetogramy kroků přípravy rekombinantního plasmidu a detekce pGKL plasmidů v buňkách analyzovaných klonů zde nejsou zobrazeny.

**Závěr:** Aminokyselinové zbytky předpokládaného SAM vazebného místa v insertu I proteinu ORF6 nejsou nezbytné pro udržení pGKL plasmidů v buňkách.

## 6 DISKUZE

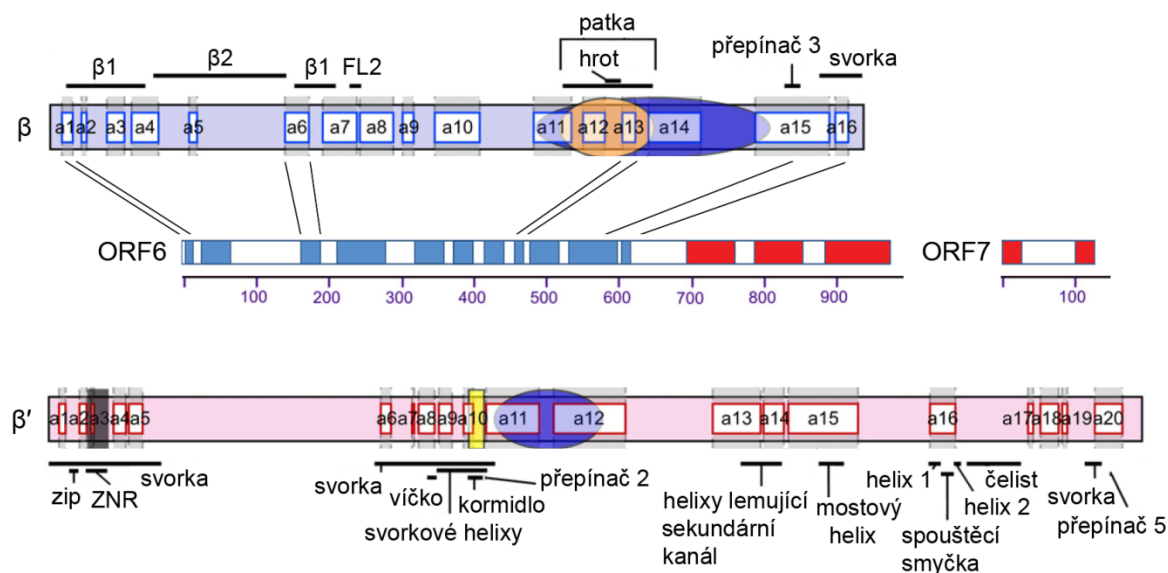
### 6.1 Bioinformatická charakterizace transkripčního aparátu lineárních plasmidů

Analýzou aminokyselinové sekvence RNA polymerázy a methyltransferázové domény *capping* enzymu lineárních plasmidů kvasinky *K. lactis* jsem se přesvědčil o tom, že již publikované hypotézy vedoucí k předpokladu funkcí proteinů ORF6, ORF7 a ORF3 plasmidu pGKL2 jsou pravdivé. Pomocí sekvenčních srovnání se mi podařilo potvrdit předpokládanou podobnost proteinů ORF7 kódovaných kvasinkovými lineárními plasmidy ke konzervovaným oblastem  $\beta'a16$  a  $\beta'a20$   $\beta'$  podjednotky kanonických vícepodjednotkových RNAP. Podobnost proteinu ORF7-pGKL2 k RNA polymerázám není příliš známá, neboť článek se schématem zobrazujícím tuto skutečnost není dobře dostupný. Přítomnost proteinu ORF7, jakožto menší podjednotky nekanonické RNAP lineárních plasmidů, v heterodimerním komplexu RNAP bude zřejmě potřebná pro experimenty dokazující RNA polymerázovou aktivitu. Protein ORF7 totiž obsahuje spouštěcí smyčku, což je důležitý strukturní prvek pro katalytické přidání nukleotidu do vznikajícího vlákna RNA. Delece spouštěcí smyčky u bRNAP *Thermus aquaticus* nebo u *E. coli* snižuje rychlost přidání nukleotidu cca 10000x (TEMLIAKOV *et al.* 2005; TOULOKHONOV *et al.* 2007). Některé nekanonické RNAP však možná ke svým katalytickým aktivitám spouštěcí smyčku a mostový helix nepotřebují, neboť u RNAP virů čeledi *Baculoviridae* a proteinu NCg11702 *Corynebacterium glutamicum* tyto prvky nebyly detekovány.

Insert I u proteinů ORF6 lineárních plasmidů by podle bioinformatických analýz mohl obsahovat potenciální SAM vazebné místo. Proti tomu hovoří fakt, že mutace aminokyselinových zbytků tohoto místa neměla vliv na udržení pGKL plasmidů v buňkách. Naproti tomu mutace aminokyselinových zbytků SAM vazebného místa proteinu ORF3-pGKL2, což byl společný projekt s mým školitelem, vliv na udržení pGKL plasmidů v buňkách měla. Výše uvedená zjištění naznačují, že podobnost insertu I s methyltransferázami Alfavirů bude zřejmě jen čistě náhodná. V insertu I proteinů ORF6 jsem pomocí modelování terciální struktury proteinu ORF6-pGKL2 našel oblast vykazující sekvenční podobnost ke konzervované oblasti  $\beta'a6$  kanonických RNAP. Vzhledem k tomu, že mezi oblastmi  $\beta'a4$  a  $\beta'a6$  kanonických RNAP se mezi sebou všechny RNA polymerázy sekvenčně velmi liší, předpokládám, že insert I mezi oblastmi  $\beta'a4$  a  $\beta'a6$  RNAP lineárních plasmidů vlastně žádným insertem není, ale že se jedná o oblast odvozenou od kanonických RNAP. V insertu II u proteinů ORF6 jsem pomocí sekvenčních porovnání našel oblast vykazující sekvenční podobnost k části  $\beta'a15$  oblasti a k  $\beta'a16$  oblasti. Tuto podobnost registrovali ve stejném období



i jiní (IYER a ARAVIND 2012). Zbytek insertu II bude pravděpodobně tvořit *linker* mezi oblastmi  $\beta$ a16 a  $\beta$ 'a11. Pomocí modelování terciální struktury proteinu ORF6-pGKL2 se mi navíc podařilo nalézt oblast vykazující sekvenční podobnost ke konzervované oblasti  $\beta$ a1 a  $\beta$ a13 kanonických RNAP. U všech vytvořených sekvenčních porovnání jsem zkontroloval jejich lokální spolehlivost, která vždy vykazovala průměrné nebo vysoké hodnoty. Schématické zobrazení mnou detekovaných konzervovaných oblastí katalytických podjednotek RNAP zachovaných u RNA polymerázy lineárních plasmidů viz Obrázek 42.



**Obrázek 42:** Schématické zobrazení oblastí RNA polymerázy lineárních plasmidů kvasinek vykazujících podobnost ke konzervovaným oblastem katalytických podjednotek kanonických vícepodjednotkových RNAP. Zobrazení je stejné jako na Obrázku 8, pouze schéma primární sekvence proteinu ORF6 je doplněno o nově detekovanou sekvenční podobnost proteinu ORF6 s  $\beta$ a1,  $\beta$ a6,  $\beta$ a13,  $\beta$ a15 a  $\beta$ a16 oblastmi kanonických RNAP. Upraveno podle (SCHAFFRATH *et al.* 1995a; LANE a DARST 2010a; RUPRICH-ROBERT a THURIAUX 2010).

Ze sekvenčních dat je patrné, že RNA polymeráza lineárních plasmidů se od kanonických RNAP odlišuje především delecí téměř celého strukturního prvku svorky. Je u ní zachována pouze bazální část svorky tvořená oblastmi  $\beta$ a15,  $\beta$ a16 a  $\beta$ 'a20. RNA polymeráza lineárních plasmidů neobsahuje víčko a pravděpodobně ani kormidlo, takže by při transkripci jednovláknových DNA templátů mohly vznikat stabilní DNA:RNA hybridní molekuly. Navíc její elongační komplexy budou pravděpodobně méně stabilní než elongační komplexy kanonických RNA polymeráz. Dalším nápadným rozdílem je zjevná absence helixů lemujících sekundární kanál. Kromě konzervovaných oblastí  $\beta$ a2,  $\beta$ a5 a  $\beta$ a9  $\beta$  podjednotek kanonických RNAP byla již ke všem ostatním konzervovaným oblastem  $\beta$  podjednotek nalezena v proteinu ORF6 sekvenční podobnost. Strukturní přítomnost těchto tří nedetekovaných oblastí v proteinu ORF6 však nelze zcela vyloučit. Z konzervovaných oblastí  $\beta'$  podjednotek by RNAP lineárních

plasmidů teoreticky mohla obsahovat ještě oblasti  $\beta'a17$ ,  $\beta'a18$  a  $\beta'a19$ , i když sekvenční podobnost proteinu ORF7 s těmito oblastmi se detekovat nepodařilo.

Ve snaze získat představu o odlišnostech mezi některými známými nekanonickými vícepodjednotkovými RNA polymerázami jsem uplatnil strategii tvorby modelu terciální struktury proteinu na serveru Robetta (<http://robetta.bakerlab.org/>) pro vybrané sekvence RNAP viru čeledi *Baculoviridae* a proteinu NCgl1702. I v tomto případě se podařilo vytvořit komparativní modely alespoň částí vybraných sekvencí podle experimentálně určených struktur kanonických RNAP. I když na podrobnější analýzu nebyl čas, podařilo se mi najít zatím nepopsanou sekvenční podobnost bakulovirového proteinu Lef-8 k oblastem  $\beta a1$ ,  $\beta a3$ ,  $\beta a4$ ,  $\beta a7$ ,  $\beta a8$ ,  $\beta a10$ ,  $\beta a12$  a  $\beta a15$   $\beta$  podjednotky kanonických RNAP a také sekvenční podobnost proteinu NCgl1702 k oblastem  $\beta'a8$ ,  $\beta'a13$ ,  $\beta'a14$  a  $\beta'a15$   $\beta'$  podjednotky kanonických RNAP. Protein NCgl1702 mi subjektivně připadá sekvenčně podobnější bakteriálním RNAP. Díky jeho velikosti, přibližně odpovídající fúzi  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotek kanonických RNAP, by se spíše než o zástupce dávné diverzifikace polymeráz *two-barrel* rodiny mohlo jednat o protein odvozený od bRNAP, který se evolucí stal sekvenčně značně odlišným od kanonických RNAP. Nalezené sekvenční podobnosti proteinu Lef-8 k dalším konzervovaným oblastem  $\beta$  podjednotky by mohly posloužit k tvorbě fylogenetického stromu. Tento strom by mohl osvětlit, zda je protein Lef-8 podobnější orthologu  $\beta$  podjednotky eRNAP I, eRNAP II nebo eRNAP III, neboť původ genu tohoto proteinu je předpokládán z genu orthologu  $\beta$  podjednotky některé eukaryotické RNA polymerázy. Zdá se, že RNAP virů *Baculoviridae* a lineárních plasmidů kvasinek mají mnoho společného. Nalezená sekvenční podobnost naznačuje, že obě RNAP mají zachované takřka všechny konzervované oblasti  $\beta$  podjednotky kanonických RNAP, ale oblastí  $\beta'$  podjednotky kanonických RNAP obsahují pouze několik. Velikost proteinu Lef-9 naznačuje, že pokud tento protein obsahuje svorku, tak bude zřejmě také redukovaná jako u RNAP lineárních plasmidů. Zdá se, že většina proteinů rodiny Lef-9 končí ihned za částí oblasti  $\beta'a15$  tvořící sekundární kanál. RNAP virů *Baculoviridae* by tak neobsahovala mostový helix a spouštěcí smyčku, což jsou důležité strukturní prvky podílející se na katalytických aktivitách kanonických RNAP. Pokud RNAP virů *Baculoviridae* tyto prvky opravdu neobsahuje, tak by byla ještě více redukovaná než RNAP lineárních plasmidů. Nelze však vyloučit, že se některý z těchto prvků nachází na proteinu p47 nebo Lef-5, tvořících podjednotky RNAP virů *Baculoviridae*.

Výsledek mojí fylogenetické analýzy RNA polymeráz cytoplasmatických lineárních plasmidů naznačuje, že jejich sekvence jsou nejpodobnější virovým RNA polymerázám nukleocytoplasmatických virů. V literatuře se obvykle uvádí původ genů kódujících *capping* enzym a helikázu lineárních plasmidů z genů nukleocytoplasmatických virů (JESKE *et al.* 2007; KLASSEN a MEINHARDT 2007), ale stejný původ genů RNA polymerázy předpokládán není. Mnou

sestrojené fylogenetické stromy jsou prvotní informace, které původ RNAP lineárních plasmidů z genů nukleocytoplasmatických virů naznačují. Teorie, že všechny dosud pouze *in silico* předpokládané komponenty specifického transkripčního aparátu lineárních plasmidů mají stejný původ, je vcelku logická. Je až s podivem, že se tato teorie zatím v literatuře nikde neobjevila. Nutno dodat, že dokud jsem fylogenetické stromy nesestrojil, tak to nenapadlo ani mě. Je však žádoucí, aby fylogenetické stromy překontroloval někdo, kdo se fylogenetice věnuje delší dobu. Za dobré znamení považuji, že při tvorbě fylogramu  $\beta'$  podjednotek bylo alespoň v jednom případě docíleno dnes uznávaného větvení sekvencí virů *Iridoviridae* a *Phycodnaviridae* (YUTIN a KOONIN 2012).

## 6.2 Produkce RNA polymerázy v expresních systémech a *in vitro* translačním systému

Byly připraveny vektory pro produkci velké a malé podjednotky RNA polymerázy s GST-epitopem na N-konci v bakteriálním expresním systému. V lyzátech buněk kmene Rosetta<sup>TM</sup>(DE3), v kterých byla indukována exprese rekombinantních proteinů, byly pomocí metody *Western blot* detekovány proteiny, které by svojí molekulovou hmotností mohly odpovídat rekombinantním proteinům GST-ORF6 a GST-ORF7 v plné délce. Produkce proteinu GST-ORF6 se zdá být lepší než již testovaná produkce proteinu HIS-ORF6 v naší laboratoři v odlišném bakteriálním expresním systému (VOPÁLENSKÝ 1999). V lyzátech buněk kmene Rosetta-gami2(DE3) se mi protein, který by svojí molekulovou hmotností mohl odpovídat proteinu GST-ORF6, detekovat nepodařilo. Buňky kmene Rosetta-gami2(DE3), v kterých jsem se pokusil indukovat expresi proteinu GST-ORF6, rostly pomaleji od přeočkování do čerstvého média do indukce exprese, než buňky, v kterých sem se pokusil indukovat expresi proteinu GST-ORF7, což by mohlo značit nějaký problém. Buňky kmene Rosetta<sup>TM</sup>(DE3) s vektory pGEX4T2\_TEV\_ORF6 a pGEX4T2\_TEV\_ORF7 po přeočkování do čerstvého média do doby indukce exprese rostly přibližně stejně rychle. Produkované proteiny GST-ORF6 a GST-ORF7 se váží na Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow *in vitro* a protein GST-ORF7 je očividně možno v určitém množství z této matrice eluovat. Pokusy o produkci a purifikaci proteinů GST-ORF6 a GST-ORF7 ve větším množství nebyly provedeny, neboť jsem čekal, jestli produkce těchto proteinů nebude vypadat lépe v kvasinkovém expresním systému, popřípadě jestli produkce proteinu ORF6 nebude vypadat lépe v *in vitro* translačním systému.

Vektory pro produkci velké a malé podjednotky RNA polymerázy s GST-epitopem na N-konci v kvasinkovém expresním systému se po jistých komplikacích podařilo připravit. Vektory byly vneseny do recipientních buněk kmene *K. lactis* IFO 1267 a u několika nezávislých klonů byla potvrzena vícenásobná integrace vektorů do genomu. U vybraných nezávislých klonů nebyla sekvence kazet po integraci plně charakterizována. Výsledky u jednoho klonu naznačují přestavbu integrační kazety blíže neurčeného rozsahu. V lyzátech nezávislých klonů buněk kmene *K. lactis* IFO 1267 s integrovanými expresními kazetami, v kterých jsem se pokusil o expresi proteinů GST-ORF6 a GST-ORF7, se rekombinantní proteiny detekovat nepodařilo. Nepodařilo se detekovat ani proteiny, které by mohly být degradačními produkty produkovaných rekombinantních proteinů. Rekombinantní proteiny ani jejich degradační produkty se nepodařilo detekovat ani po purifikaci z lyzátní směsi prostřednictvím Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow. Jelikož se produkce jiného kvasinkového proteinu ve stejném expresním systému se v naší laboratoři u několika vybraných nezávislých klonů potvrdit podařila, nezdá se mi moc pravděpodobné, že by všechny mnou vybrané nezávislé klony nesly mutace v integrační kazetě bránící expresi rekombinantních proteinů.

Použití soupravy *in vitro* translačního systému Rapid Translation System RTS 500 pro produkci rekombinantních proteinů by, na rozdíl od bakteriálních expresních systémů, mělo poskytovat výhodu zejména při produkci proteinů toxických pro expresní buňky, spolu s výhodou přítomnosti aminoacylovaných transferových RNA, rozeznávajících všechny kodóny mající smysl, v nadbytku. Kontrolní produkce proteinu HIS-GFP prokázala funkčnost soupravy cca 10 let po datu spotřeby. Produkce proteinu HIS-ORF6 v tomto systému se nepodařila detekovat, ale produkce jiného proteinu lineárních plasmidů v tomto systému, proteinu HIS-ORF9, se po purifikaci detekovat podařila.

### **6.3 Testování případné interakce RNA polymerázy a *capping* enzymu v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému**

Ačkoliv již byly testovány předpokládané interakce mezi komponentami transkripčního aparátu pGKL plasmidů pomocí klasického dvouhybridního systému, rozhodl jsem se otestovat případné interakce pomocí kvasinkového fluorescenčního dvouhybridního systému. Důvodů, proč jsem doufal v úspěch s využitím tohoto nového systému, je několik. Zaprvé pro fluorescenční dvouhybridní systém nemusí být předpokládání interakční partneři lokalizováni v jádře buněk, jak tomu je v případě klasického dvouhybridního systému. Protože se lineární

plasmidy nacházejí v cytoplasmě, je možné, že prostředí jádra je pro proteiny transkripčního aparátu lineárních plasmidů nefyziologické, a k předpokládané interakci tak zde docházet nemusí. Další výhodou fluorescenčního dvouhybridního systému by měla být citlivost umožňující detekovat i slabé interakce; případně i interakce při nízké expresi předpokládaných interakčních partnerů (KERPPOLA 2006; FAN *et al.* 2008). Plánované vektory pro testování interakcí se podařilo vytvořit. Interakci podjednotek RNA polymerázy mezi sebou a jednotlivých podjednotek RNAP s *capping* enzymem se nepodařilo detekovat. Pouze jediný klon, v kterém byla testována interakce proteinu ORF6 a ORF7, vykazoval vyšší míru fluorescence než kontrolní buňky. Z buněk tohoto klonu izolovali moji spolupracovníci v mé nepřítomnosti vektory minipreparací, izolované vektory vnesli elektroporací do buněk *E. coli* XL-1 Blue. Transformované buňky byly vysety na misky 2xTYA s ampicilinem. Z několika vybraných monoklonií byla izolována DNA vektorů plasmidového typu minipreparací a izolované vektory podrobeny restričnímu štěpení enzymy *Bam*HI a *Sal*I s následnou elektroforetickou analýzou. Vzorec štěpení vektorů neodpovídal vzorci štěpení, který by měly vykazovat vektory N-YN425ADH\_ORF6 a C-YC426ADH\_ORF7, jež by se v kvasinkovém klonu testované interakce proteinu ORF6 a ORF7 měly vyskytovat. Tato skutečnost podporuje teorii, že klon se zvýšenou mírou fluorescence vykazuje falešnou pozitivitu. Otázkou zůstává, proč se nějakou interakci nepodařilo detekovat. Spojení proteinu zájmu s fragmentem fluorescenčního proteinu může měnit skládání nebo strukturu proteinu zájmu. Nedetekování interakce může nastat také díky sterickým zábranám, kdy fragmenty fluorescenčního proteinu nemají dostatečnou svobodu pohybu k tomu, aby se složily ve fluorescenční komplex. Je také možné, že *capping* enzym interaguje pouze s oběma podjednotkami RNA polymerázy najednou. Tato hypotéza by se dala testovat například prostřednictvím tříhybridního systému. Produkci rekombinantních proteinů ve fluorescenčním dvouhybridním systému jsem nijak neověřoval. Díky získaným výsledkům předpokládám, že metoda fluorescenčního dvouhybridního systému nenajde v naší laboratoři širší uplatnění, i když se jedná o elegantní metodu, jejíž jediným časově limitujícím krokem je příprava vektorů.

## 6.4 Příprava rekombinantních plasmidů pGKL2 kódujících velkou podjednotku RNA polymerázy se značkou

Pokusy s přidáním značek na protein ORF6 homologní rekombinací *in vivo* vedly hned k několika výsledkům. Prvním výsledkem je zjištění, že nativní C-konec proteinu ORF6 je esenciální pro udržení pGKL plasmidů v buňkách. Podle sekvenčních porovnání a vytvořeného

modelu terciální struktury proteinu ORF6 se na C-konci tohoto proteinu nachází mostový helix, přičemž poslední aminokyselinový zbytek je součástí tohoto  $\alpha$ -helikálního strukturního prvku. Přidání značky na C-konec by tak mohlo narušovat konformační změny, kterými mostový helix prochází během cyklu přidání nukleotidu do rostoucího vlákna RNA. Protože se konec mostového helixu proteinu ORF6 nalézá poblíž začátku helixu 1 spouštěcí smyčky, který se pravděpodobně nachází na N-konci proteinu ORF7 (jejich vzdálenost je cca 1,3 nm ve vytvořeném modelu), mohla by přidaná značka na C-konci proteinu ORF6 například stericky bránit vzájemné interakci obou podjednotek RNA polymerázy pGKL plasmidů. Požadavek na ukončení proteinu ORF6 v místě, kde tento protein končí na nemodifikovaných plasmidech, je zřejmě velký, neboť u všech klonů se sekvenovaným soběstačným modifikovaným plasmidem pGKL2 ORF6-FLAG se stopkodón vytvořil tak, aby vznikal protein ORF6 divokého typu bez jediného aminokyselinového zbytku navíc na C-konci. To by mohlo opravdu znamenat, že přidaná značka tvoří nějakou sterickou zábranu. Nerealizovatelnost značení proteinu ORF6-pGKL2 na C-konci se současným zachováním funkce tohoto proteinu *in vivo* lze zřejmě extrapolovat na proteiny ORF6 ostatních kvasinkových lineárních plasmidů, neboť C-konce těchto proteinů se podle sekvenčního porovnání nachází na stejném místě.

Pokusy s přidáním značky na N-konec proteinu ORF6 bylo zjištěno, že na tento konec lze připojit menší značku typu FLAG, ale i větší značku velikosti proteinu GFP, bez vlivu na udržení pGKL plasmidů v buňkách. V lyzátech buněk nesoucích modifikované plasmidy pGKL2 FLAG-ORF6 a pGKL2 EGFP-ORF6 byly rekombinantní proteiny ORF6 se značkami detekovány. Semikvantitativní analýzou exprese proteinu EGFP-ORF6 pomocí metody *Western blot* bylo zjištěno, že se tento protein vyskytuje v buňkách v exponenciální fázi růstu, v pozdně exponenciální fázi růstu a ve fázi zpomaleného růstu. Pokud by byl expresní profil produktů ostatních čtecích rámců podílejících se na transkripci pGKL plasmidů stejný, dalo by se předpokládat, že transkripce pGKL plasmidů probíhá ve všech třech zmíněných fázích růstu buněk. I když semikvantitativní analýza exprese proteinu EGFP-ORF6 díky použitým kontrolám nebyla provedena úplně korektně a žádný signifikantní rozdíl v expresi touto analýzou není patrný, bylo pro imunoprecipitační experimenty dále pracováno převážně s kulturami v pozdně exponenciální fázi růstu s hladinami optických denzit cca 4-8 při 600 nm. Pro relativně nízkou expresi proteinu EGFP-ORF6 by mohlo hovořit nedetekování fluorescence u buněk nesoucích plasmid pGKL2 EGFP-ORF6, které naznačuje přítomnost proteinu EGFP-ORF6 v méně než  $10^5$  kopiích na buňku za předpokladu správného složení naprosté většiny proteinů EGFP (TSIEN 1998).

K zakoncentrování proteinu EGFP-ORF6 imunoprecipitací pomocí protilátky anti-GFP (B-2) nedošlo. Je možné, že dva aminokyselinové zbytky substituované v použitém kvasinkovém EGFP se nacházejí v oblasti tvořící epitop rozeznávaný protilátkou anti-GFP (B-2), a díky tomu imunoprecipitace funguje suboptimálně. Je však třeba počítat s tím, že daná protilátka nemusí být pro metodu imunoprecipitace vůbec vhodná, ačkoliv to výrobce uvádí. Pokud je mi známo, tato protilátka v naší laboratoři k imunoprecipitaci jakékoliv varianty GFP před mými pokusy použita nebyla. Zakoncentrování proteinu EGFP-ORF6 došlo pomocí komerčního produktu GFP-Trap<sup>®</sup>\_M. Protože imunoprecipitáty vždy obsahovaly nečistoty ve formě nespecificky imunoprecipitovaných proteinů, potýkal jsem se s otázkou, co dělám špatně. Pokusy mojí spolupracovnice Veronicy Venturi ukázaly, že nečistoty obsahují i imunoprecipitované proteiny z lyzátů buněk savčích tkáňových kultur, takže se nejednalo o záležitost specifickou pro lyzáty kvasinkových buněk. Moje pokusy tak výrazně přispěly k demonstrování faktu, že produkt GFP-Trap<sup>®</sup>\_M nefunguje tak, jak bylo deklarováno. Proto nám byly bezplatně všechny zakoupené produkty GFP-Trap<sup>®</sup>\_M vyměněny za produkty GFP-Trap<sup>®</sup>\_A, kde jsou nosičem anti-GFP protilátky agarosové a ne magnetické kuličky. Tento produkt podle pokusů Veronicy Venturi funguje podstatně lépe, ale já jsem již neměl čas ho k imunoprecipitaci proteinu EGFP-ORF6 vyzkoušet. I když imunoprecipitáty proteinu EGFP-ORF6 pomocí GFP-Trap<sup>®</sup>\_M obsahovaly nečistoty, domnívám se, že v takto připravených imunoprecipitátech by se již dala otestovat RNA polymerázová aktivita. Bohužel jsem nebyl schopen ověřit, zda se v imunoprecipitátech nachází i zakoncentrovaný protein ORF7. Kdysi existující polyklonální protilátkou proti proteinu ORF7 její autoři v dnešní době již nedisponují (SCHAFFRATH *et al.* 1997). Máme v plánu připojit značku na protein ORF7 v kmeni *K. lactis* IFO 1267 EGFP-ORF6 homologní rekombinací *in vivo*, aby se dalo případné zakoncentrování proteinu ORF7 imunoprecipitací proteinu EGFP-ORF6 detekovat metodou *Western blot*. Imunoprecipitací proteinu EGFP-ORF6 se také podařilo detekovat degradační produkty tohoto proteinu, které nebyly v lyzátech patrné. Zakoncentrování degradačních produktů tak zřejmě probíhá s větší účinností, patrně díky jejich menší velikosti. Nedá se však říct, zda je stabilita proteinu EGFP-ORF6 v buňkách odlišná od stability proteinu ORF6 divokého typu.

## 7 SOUHRN

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat nekanonickou RNA polymerázu kódovanou otevřeným čtecím rámcem 6 a 7 plasmidu pGKL2 u *Kluyveromyces lactis* bioinformatickými, genetickými a biochemickými metodami.

Bioinformatická charakterizace *in silico*:

- Důkazy vedoucí k předpokladu, že ORF6 a ORF7 kódují nekanonickou polymerázu, se podařilo rozšířit tvorbou modelu terciální struktury větší části obou proteinů a následnou tvorbou sekvenčního porovnání s kanonickými RNA polymerázami.
- Insert I proteinu ORF6 vykazuje sekvenční podobnost ke konzervované oblasti  $\beta$ 6  $\beta$  podjednotky kanonických RNA polymeráz. Insert II proteinu ORF6 vykazuje sekvenční podobnost ke konzervované oblasti  $\beta$ 15 a  $\beta$ 16  $\beta$  podjednotky kanonických RNA polymeráz.
- Důkazy vedoucí k předpokladu, že ORF3 obsahuje N<sup>7</sup>-cap-methyltransferázovou doménu, se podařilo rozšířit.

Genetická a biochemická charakterizace:

- Vytvořit vektory pro produkci ORF6 a ORF7 v bakteriálním expresním systému se podařilo. Rekombinantní proteiny ORF6 a ORF7 se podařilo v tomto systému nadprodukovat a částečně purifikovat. K otestování RNA polymerázové aktivity nedošlo.
- Vytvořit vektory pro produkci ORF6 a ORF7 v kvasinkovém expresním systému se podařilo. Rekombinantní proteiny ORF6 a ORF7 se nepodařilo v tomto systému nadprodukovat.
- Vytvořit vektory pro produkci ORF6, ORF7 a ORF3 v kvasinkovém fluorescenčním dvouhybridním systému se podařilo. V tomto systému se nepodařilo detekovat žádnou interakci mezi jednotlivými proteiny.
- Nepodařilo se produkovat ORF6 v *in vitro* translačním systému.
- Podařilo se připravit dva rekombinantní plasmidy pGKL2 *in vivo* kódující ORF6 se značkami FLAG a EGFP. Podařilo se detekovat a částečně purifikovat protein EGFP-ORF6. Ve vzorcích purifikovaného proteinu EGFP-ORF6 se zatím nepodařilo detekovat žádný z předpokládaných interakčních partnerů.



## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahlquist, P. (2002): RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, 296(5571), 1270-1273.
- Ahn, B. Y., Gershon, P. D., Moss, B. (1994): RNA polymerase-associated protein Rap94 confers promoter specificity for initiating transcription of vaccinia virus early stage genes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7552-7557.
- Achberger, E. C., Whiteley, H. R. (1980): The interaction of Escherichia coli core RNA polymerase with specificity-determining subunits derived from unmodified and SP82-modified Bacillus subtilis RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 11957-11964.
- Andrecka, J., Treutlein, B., Arcusa, M. A., Muschielok, A., Lewis, R., Cheung, A. C., Cramer, P., Michaelis, J. (2009): Nano positioning system reveals the course of upstream and nontemplate DNA within the RNA polymerase II elongation complex. *Nucleic Acids Research*, 37(17), 5803-5809.
- Arslan, D., Legendre, M., Seltzer, V., Abergel, C., Claverie, J. M. (2011): Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), 17486-17491.
- Benarroch, D., Smith, P., Shuman, S. (2008): Characterization of a trifunctional mimivirus mRNA capping enzyme and crystal structure of the RNA triphosphatase domain. *Structure*, 16(4), 501-512.
- Bergslund, K. J., Haselkorn, R. (1991): Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the rpoC1 gene of Anabaena sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 173(11), 3446-3455.
- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S., Rossmann, M. G., Suzan-Monti, M., La Scola, B., Koonin, E. V., Raoult, D. (2009): Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21848-21853.
- Broyles, S. S., Li, J., Moss, B. (1991): Promoter DNA contacts made by the vaccinia virus early transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15539-15544.
- Broyles, S. S., Moss, B. (1986): Homology between RNA polymerases of poxviruses, prokaryotes, and eukaryotes: nucleotide sequence and transcriptional analysis of vaccinia virus genes encoding 147-kDa and 22-kDa subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3141-3145.
- Brueckner, F., Cramer, P. (2008): Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8), 811-818.
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S. A. (2001): Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*, 104(6), 901-912.
- Castillo, R. M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T. L., Murzin, A. G. (1999): A six-stranded double-psi beta barrel is shared by several protein superfamilies. *Structure*, 7(2), 227-236.
- Cermakian, N., Ikeda, T. M., Miramontes, P., Lang, B. F., Gray, M. W., Cedergren, R. (1997): On the evolution of the single-subunit RNA polymerases. *Journal of Molecular Evolution*, 45(6), 671-681.
- Clark, S., Losick, R., Pero, J. (1974): New RNA polymerase from Bacillus subtilis infected with phage PBS2. *Nature*, 252(5478), 21-24.
- Colson, P., de Lamballerie, X., Fournous, G., Raoult, D. (2012): Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order Megavirales. *Intervirology*, 55(5), 321-332.

- Colson, P., Pagnier, I., Yoosuf, N., Fournous, G., La Scola, B., Raoult, D. (2013): "Marseilleviridae", a new family of giant viruses infecting amoebae. *Archives of Virology*, 158(4), 915-920.
- Colson, P., Yutin, N., Shabalina, S. A., Robert, C., Fournous, G., La Scola, B., Raoult, D., Koonin, E. V. (2011): Viruses with more than 1,000 genes: Mamavirus, a new *Acanthamoeba* polyphaga mimivirus strain, and reannotation of Mimivirus genes. *Genome Biology and Evolution*, 3, 737-742.
- Cong, Y. S., Yarrow, D., Li, Y. Y., Fukuhara, H. (1994): Linear DNA plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*. *Microbiology*, 140 (Pt 6), 1327-1335.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., Brown, A. J. (1997): Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 143 (Pt 2), 303-311.
- Cornelissen, A., Hardies, S. C., Shaburova, O. V., Krylov, V. N., Mattheus, W., Kropinski, A. M., Lavigne, R. (2012): Complete genome sequence of the giant virus OBP and comparative genome analysis of the diverse PhiKZ-related phages. *Journal of Virology*, 86(3), 1844-1852.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., Kornberg, R. D. (2000): Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, 288(5466), 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2001): Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, 292(5523), 1863-1876.
- Dailidiene, D., Tan, S., Ogura, K., Zhang, M., Lee, A. H., Severinov, K., Berg, D. E. (2007): Urea sensitization caused by separation of *Helicobacter pylori* RNA polymerase beta and beta' subunits. *Helicobacter*, 12(2), 103-111.
- De la Peña, M., Kyrieleis, O. J., Cusack, S. (2007): Structural insights into the mechanism and evolution of the vaccinia virus mRNA cap N7 methyl-transferase. *The EMBO Journal*, 26(23), 4913-4925.
- Deng, L., Shuman, S. (1998): Vaccinia NPH-I, a DExH-box ATPase, is the energy coupling factor for mRNA transcription termination. *Genes & Development*, 12(4), 538-546.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitz, M., Montanyola, A., Chang, J. M., Taly, J. F., Notredame, C. (2011): T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server Issue), W13-W17.
- Dixon, L. K., Twigg, S. R., Baylis, S. A., Vydelingum, S., Bristow, C., Hammond, J. M., Smith, G. L. (1994): Nucleotide sequence of a 55 kbp region from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate (Malawi LIL20/1). *Journal of General Virology*, 75 (Pt 7), 1655-1684.
- Doherty, G. P., Fogg, M. J., Wilkinson, A. J., Lewis, P. J. (2010): Small subunits of RNA polymerase: localization, levels and implications for core enzyme composition. *Microbiology*, 156(Pt 12), 3532-3543.
- Ederth, J., Artsimovitch, I., Isaksson, L. A., Landick, R. (2002): The downstream DNA jaw of bacterial RNA polymerase facilitates both transcriptional initiation and pausing. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37456-37463.
- Fabrega, C., Hausmann, S., Shen, V., Shuman, S., Lima, C. D. (2004): Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. *Molecular Cell*, 13(1), 77-89.
- Fan, J.-Y., Cui, Z.-Q., Wei, H.-P., Zhang, Z.-P., Zhou, Y.-F., Wang, Y.-P., Zhang, X.-E. (2008): Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(1), 47-53.
- Fouqueau, T., Zeller, M. E., Cheung, A. C., Cramer, P., Thomm, M. (2013): The RNA polymerase trigger loop functions in all three phases of the transcription cycle. *Nucleic Acids Research*, In Press.

- Ghosh, A., Lima, C. D.** (2010): Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 1(1), 152-172.
- Ghosh, I., Hamilton, A. D., Regan, L.** (2000): Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society*, 122(23), 5658-5659.
- Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D.** (2001): Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, 292(5523), 1876-1882.
- Gong, X. Q., Zhang, C., Feig, M., Burton, Z. F.** (2005): Dynamic error correction and regulation of downstream bubble opening by human RNA polymerase II. *Molecular Cell*, 18(4), 461-470.
- Gray, M. W., Lang, B. F., Burger, G.** (2004): Mitochondria of protists. *Annual Review of Genetics*, 38, 477-524.
- Gross, C. H., Shuman, S.** (1998): RNA 5'-triphosphatase, nucleoside triphosphatase, and guanylyltransferase activities of baculovirus LEF-4 protein. *Journal of Virology*, 72(12), 10020-10028.
- Guarino, L. A., Dong, W., Jin, J.** (2002): In vitro activity of the baculovirus late expression factor LEF-5. *Journal of Virology*, 76(24), 12663-12675.
- Guarino, L. A., Xu, B., Jin, J., Dong, W.** (1998): A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *Journal of Virology*, 72(10), 7985-7991.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O.** (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.
- Gunge, N.** (1986): Linear DNA killer plasmids from the yeast *Kluyveromyces*. *Yeast*, 2(3), 153-162.
- Gunge, N., Murata, K., Sakaguchi, K.** (1982): Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with linear DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 151(1), 462-464.
- Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F., Sakaguchi, K.** (1981): Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology*, 145(1), 382-390.
- Gunge, N., Yamane, C.** (1984): Incompatibility of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* with mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 159(2), 533-539.
- Haag, J. R., Pikaard, C. S.** (2011): Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), 483-492.
- Haag, J. R., Pontes, O., Pikaard, C. S.** (2009): Metal A and metal B sites of nuclear RNA polymerases Pol IV and Pol V are required for siRNA-dependent DNA methylation and gene silencing. *PLoS One*, 4(1), e4110.
- Hagler, J., Shuman, S.** (1992): A freeze-frame view of eukaryotic transcription during elongation and capping of nascent mRNA. *Science*, 255(5047), 983-986.
- Hajdukiewicz, P. T., Allison, L. A., Maliga, P.** (1997): The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO Journal*, 16(13), 4041-4048.
- Hall, T. A.** (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Harris, N., Rosales, R., Moss, B.** (1993): Transcription initiation factor activity of vaccinia virus capping enzyme is independent of mRNA guanylylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), 2860-2864.
- Hausner, W., Lange, U., Musfeldt, M.** (2000): Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12393-12399.

- Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., Korchevskii, R., Robben, J., Mesyanzhinov, V., Krylov, V. N., Volckaert, G. (2005): Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *Journal of Molecular Biology*, 354(3), 536-545.
- Hirata, A., Klein, B. J., Murakami, K. S. (2008): The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature*, 451(7180), 851-854.
- Hishinuma, F., Hirai, K. (1991): Genome organization of the linear plasmid, pSKL, isolated from *Saccharomyces kluyveri*. *Molecular and General Genetics*, 226(1-2), 97-106.
- Holm, L., Rosenström, P. (2010): Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server Issue), W545-W549.
- Holmes, S. F., Erie, D. A. (2003): Downstream DNA sequence effects on transcription elongation. Allosteric binding of nucleoside triphosphates facilitates translocation via a ratchet motion. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35597-35608.
- Howe, C. J. (1992): Plastid origin of an extrachromosomal DNA molecule from *Plasmodium*, the causative agent of malaria. *Journal of Theoretical Biology*, 158(2), 199-205.
- Hu, C.-D., Kerppola, T. K. (2005): Direct Visualization of Protein Interactions in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation Analysis. *In: Adams, P. D., Golemis, E. A., (eds.): Protein-Protein Interactions*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Huang, G. H., Wang, Y. S., Wang, X., Garretson, T. A., Dai, L. Y., Zhang, C. X., Cheng, X. W. (2012): Genomic sequence of *Heliothis virescens* ascovirus 3g isolated from *Spodoptera exigua*. *Journal of Virology*, 86(22), 12467-12468.
- Huang, Y. L., Han, Y. T., Chang, Y. T., Hsu, Y. H., Meng, M. (2004): Critical residues for GTP methylation and formation of the covalent m<sup>7</sup>GMP-enzyme intermediate in the capping enzyme domain of bamboo mosaic virus. *Journal of Virology*, 78(3), 1271-1280.
- Chakraborty, A., Wang, D., Ebright, Y. W., Korlann, Y., Kortkhonjia, E., Kim, T., Chowdhury, S., Wigneshweraraj, S., Irschik, H., Jansen, R., Nixon, B. T., Knight, J., Weiss, S., Ebright, R. H. (2012): Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp. *Science*, 337(6094), 591-595.
- Christen, L. M., Sanders, M., Wiler, C., Niles, E. G. (1998): Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I is an essential viral early gene transcription termination factor. *Virology*, 245(2), 360-371.
- Iyer, L. M., Aravind, L. (2012): Insights from the architecture of the bacterial transcription apparatus. *Journal of Structural Biology*, 179(3), 299-319.
- Iyer, L. M., Aravind, L., Koonin, E. V. (2001): Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *Journal of Virology*, 75(23), 11720-11734.
- Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V., Aravind, L. (2006): Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Research*, 117(1), 156-184.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Aravind, L. (2003): Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Structural Biology*, 3, 1.
- James, P., Halladay, J., Craig, E. A. (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4), 1425-1436.
- Jehle, J. A., Abd-Alla, A. M. M., Wang, Y. (2013): Phylogeny and evolution of Hytrosaviridae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S62-S67.
- Jeske, S., Meinhardt, F. (2006): Autonomous cytoplasmic linear plasmid pPac1-1 of *Pichia acaciae*: molecular structure and expression studies. *Yeast*, 23(6), 479-486.
- Jeske, S., Meinhardt, F., Klassen, R. (2007): Extranuclear Inheritance: Virus-Like DNA-Elements in Yeast. *In: Esser, K., Löttge, U., Beyschlag, W., Murata, J., (eds.): Progress in Botany*, 68. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 98-129.

- Jeske, S., Tiggemann, M., Meinhardt, F.** (2006): Yeast autonomous linear plasmid pGKL2: ORF9 is an actively transcribed essential gene with multiple transcription start points. *FEMS Microbiology Letters*, 255(2), 321-327.
- Jokerst, R. S., Weeks, J. R., Zehring, W. A., Greenleaf, A. L.** (1989): Analysis of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase II in *Drosophila*. *Molecular and General Genetics*, 215(2), 266-275.
- Kämper, J., Esser, K., Gunge, N., Meinhardt, F.** (1991): Heterologous gene expression on the linear DNA killer plasmid from *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetics*, 19(2), 109-118.
- Kämper, J., Meinhardt, F., Gunge, N., Esser, K.** (1989): In vivo construction of linear vectors based on killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*: selection of a nuclear gene results in attachment of telomeres. *Molecular and Cellular Biology*, 9(9), 3931-3937.
- Kang, X., Hu, Y., Li, Y., Guo, X., Jiang, X., Lai, L., Xia, B., Jin, C.** (2006): Structural, biochemical, and dynamic characterizations of the hRPB8 subunit of human RNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 18216-18226.
- Kempken, F., Hermanns, J., Osiewacz, H. D.** (1992): Evolution of linear plasmids. *Journal of Molecular Evolution*, 35(6), 502-513.
- Kerppola, T. K.** (2006): Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nature Methods*, 3(12), 969-971.
- Kettenberger, H., Armache, K. J., Cramer, P.** (2004): Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS. *Molecular Cell*, 16(6), 955-965.
- Kikuchi, Y., Hirai, K., Hishinuma, F.** (1984): The yeast linear DNA killer plasmids, pGKL1 and pGKL2, possess terminally attached proteins. *Nucleic Acids Research*, 12(14), 5685-5692.
- Kim, D. E., Chivian, D., Baker, D.** (2004): Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server Issue), W526-W531.
- Klassen, R., Meinhardt, F.** (2007): Linear Protein-Primed Replicating Plasmids in Eukaryotic Microbes. In: Meinhardt, F., Klassen, R., (eds.): *Microbial Linear Plasmids*, 7. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 187-226.
- Klassen, R., Tontsidou, L., Larsen, M., Meinhardt, F.** (2001): Genome organization of the linear cytoplasmic element pPE1B from *Pichia etchellsii*. *Yeast*, 18(10), 953-961.
- Knutson, B. A., Broyles, S. S.** (2008): Expansion of poxvirus RNA polymerase subunits sharing homology with corresponding subunits of RNA polymerase II. *Virus Genes*, 36(2), 307-311.
- Kohler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., Roos, D. S.** (1997): A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*, 275(5305), 1485-1489.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., Elkins, J. G.** (2007): Orthologs of the small RPB8 subunit of the eukaryotic RNA polymerases are conserved in hyperthermophilic Crenarchaeota and "Korarchaeota". *Biology Direct*, 2, 38.
- Kouba, T., Dányi, I., Gunišová, S., Munzarová, V., Vlčková, V., Cuchalová, L., Neueder, A., Milkereit, P., Valášek, L. S.** (2012): Small ribosomal protein RPS0 stimulates translation initiation by mediating 40S-binding of eIF3 via its direct contact with the eIF3a/TIF32 subunit. *PLoS One*, 7(7), e40464.
- Kuznedelov, K., Korzheva, N., Mustaev, A., Severinov, K.** (2002): Structure-based analysis of RNA polymerase function: the largest subunit's rudder contributes critically to elongation complex stability and is not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length. *The EMBO Journal*, 21(6), 1369-1378.
- Kwapisz, M., Beckouët, F., Thuriaux, P.** (2008): Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Trends in Genetics*, 24(5), 211-215.
- Lane, W. J., Darst, S. A.** (2010a): Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis. *Journal of Molecular Biology*, 395(4), 671-685.

- Lane, W. J., Darst, S. A. (2010b): Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis. *Journal of Molecular Biology*, 395(4), 686-704.
- Lang, B. F., Burger, G., Okelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M. W. (1997): An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387(6632), 493-497.
- Larsen, M., Gunge, N., Meinhardt, F. (1998): *Kluyveromyces lactis* killer plasmid pGKL2: evidence for a viral-like capping enzyme encoded by ORF3. *Plasmid*, 40(3), 243-246.
- Larsen, M., Meinhardt, F. (2000): *Kluyveromyces lactis* killer system: identification of a new gene encoded by pGKL2. *Current Genetics*, 38(5), 271-275.
- Li, J., Broyles, S. S. (1993a): The DNA-dependent ATPase activity of vaccinia virus early gene transcription factor is essential for its transcription activation function. *Journal of Biological Chemistry*, 268(27), 20016-20021.
- Li, J., Broyles, S. S. (1993b): Recruitment of vaccinia virus RNA polymerase to an early gene promoter by the viral early transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(4), 2773-2780.
- López de Saro, F. J., Yoshikawa, N., Helmann, J. D. (1999): Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15953-15958.
- Lu, A., Miller, L. K. (1994): Identification of three late expression factor genes within the 33.8- to 43.4-map-unit region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, 68(10), 6710-6718.
- Luo, J., Hall, B. D. (2007): A multistep process gave rise to RNA polymerase IV of land plants. *Journal of Molecular Evolution*, 64(1), 101-112.
- Luo, Y., Mao, X., Deng, L., Cong, P., Shuman, S. (1995): The D1 and D12 subunits are both essential for the transcription termination factor activity of vaccinia virus capping enzyme. *Journal of Virology*, 69(6), 3852-3856.
- Majovski, R. C., Khapersky, D. A., Ghazy, M. A., Ponticelli, A. S. (2005): A functional role for the switch 2 region of yeast RNA polymerase II in transcription start site utilization and abortive initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34917-34923.
- Mao, X., Shuman, S. (1994): Intrinsic RNA (guanine-7) methyltransferase activity of the vaccinia virus capping enzyme D1 subunit is stimulated by the D12 subunit. Identification of amino acid residues in the D1 protein required for subunit association and methyl group transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 269(39), 24472-24479.
- Marcussen, T., Oxelman, B., Skog, A., Jakobsen, K. S. (2010): Evolution of plant RNA polymerase IV/V genes: evidence of subneofunctionalization of duplicated NRPD2/NRPE2-like paralogs in *Viola* (Violaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 45.
- Mathew, R., Chatterji, D. (2006): The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends in Microbiology*, 14(10), 450-455.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., Severinov, K. (2001): Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 892-897.
- Monson, R., Foulds, I., Foweraker, J., Welch, M., Salmond, G. P. (2011): The *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage phiPA3 is a new member of the phiKZ-like group of 'jumbo' phages, and infects model laboratory strains and clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Microbiology*, 157(Pt 3), 859-867.
- Mukhamedyarov, D., Makarova, K. S., Severinov, K., Kuznedelov, K. (2011): Francisella RNA polymerase contains a heterodimer of non-identical alpha subunits. *BMC Molecular Biology*, 12, 50.
- Murakami, K. S. (2013): X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9126-9134.

- Naji, S., Bertero, M. G., Spitalny, P., Cramer, P., Thomm, M.** (2008): Structure-function analysis of the RNA polymerase cleft loops elucidates initial transcription, DNA unwinding and RNA displacement. *Nucleic Acids Research*, 36(2), 676-687.
- Naryshkina, T., Kuznedelov, K., Severinov, K.** (2006): The role of the largest RNA polymerase subunit lid element in preventing the formation of extended RNA-DNA hybrid. *Journal of Molecular Biology*, 361(4), 634-643.
- Nedialkov, Y. A., Opron, K., Assaf, F., Artsimovitch, I., Kireeva, M. L., Kashlev, M., Cukier, R. I., Nudler, E., Burton, Z. F.** (2013): The RNA polymerase bridge helix YFI motif in catalysis, fidelity and translocation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829(2), 187-198.
- Nissimov, J. I., Worthy, C. A., Rooks, P., Napier, J. A., Kimmance, S. A., Henn, M. R., Ogata, H., Allen, M. J.** (2012): Draft genome sequence of four coccolithoviruses: *Emiliania huxleyi* virus EhV-88, EhV-201, EhV-207, and EhV-208. *Journal of Virology*, 86(5), 2896-2897.
- Passarelli, A. L., Todd, J. W., Miller, L. K.** (1994): A baculovirus gene involved in late gene expression predicts a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerases. *Journal of Virology*, 68(7), 4673-4678.
- Pejznochová, M.** (2004): *Pravděpodobná cytoplasmatická helikasa lineárních plasmidů pGKL*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Rabatinová, A., Šanderová, H., Jiráť Matějčková, J., Korelusová, J., Sojka, L., Barvík, I., Papoušková, V., Sklenář, V., Židek, L., Krásný, L.** (2013): The  $\delta$  Subunit of RNA Polymerase Is Required for Rapid Changes in Gene Expression and Competitive Fitness of the Cell. *Journal of Bacteriology*, 195(11), 2603-2611.
- Rackwitz, H. R., Rohde, W., Sanger, H. L.** (1981): DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature*, 291(5813), 297-301.
- Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J. K., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Paša-Tolić, L., Pikaard, C. S.** (2009): Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Molecular Cell*, 33(2), 192-203.
- Rodríguez, J. M., Salas, M. L.** (2013): African swine fever virus transcription. *Virus Research*, 173(1), 15-28.
- Rohe, M., Schründer, J., Tudzynski, P., Meinhardt, F.** (1992): Phylogenetic relationships of linear, protein-primed replicating genomes. *Current Genetics*, 21(2), 173-176.
- Rohrmann, G. F.** (2011): *Baculovirus Molecular Biology*. Second Edition. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
- Romanos, M. A., Boyd, A.** (1988): A transcriptional barrier to expression of cloned toxin genes of the linear plasmid k1 of *Kluyveromyces lactis*: evidence that native k1 has novel promoters. *Nucleic Acids Research*, 16(15), 7333-7350.
- Rozanov, M. N., Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E.** (1992): Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 73 (Pt 8), 2129-2134.
- Ruan, W., Lehmann, E., Thomm, M., Kostrewa, D., Cramer, P.** (2011): Evolution of two modes of intrinsic RNA polymerase transcript cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18701-18707.
- Ruprich-Robert, G., Thuriaux, P.** (2010): Non-canonical DNA transcription enzymes and the conservation of two-barrel RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 38(14), 4559-4569.
- Salgado, P. S., Koivunen, M. R., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., Stuart, D. I., Grimes, J. M.** (2006): The structure of an RNAi polymerase links RNA silencing and transcription. *PLoS Biology*, 4(12), e434.
- Satwika, D., Klassen, R., Meinhardt, F.** (2012): Anticodon nuclease encoding virus-like elements in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 345-356.
- Sekyrová, P.** (2004): *Proteom lineárních plasmidů kvasinky Kluyveromyces lactis*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.

- Severinov, K., Mooney, R., Darst, S. A., Landick, R.** (1997): Tethering of the large subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24137-24140.
- Severinov, K., Mustaev, A., Kukarin, A., Muzzin, O., Bass, I., Darst, S. A., Goldfarb, A.** (1996): Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27969-27974.
- Sharma, N., Kumari, R.** (2012): Rpb4 and Rpb7: multifunctional subunits of RNA polymerase II. *Critical Reviews in Microbiology*, 0(0), 1-11.
- Shatzer, A. N., Kato, S. E., Condit, R. C.** (2008): Phenotypic analysis of a temperature sensitive mutant in the large subunit of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. *Virology*, 375(1), 236-252.
- Shuman, S.** (2002): What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(8), 619-625.
- Schaffrath, R., Meacock, P. A.** (1996): A cytoplasmic gene-shuffle system in *Kluyveromyces lactis*: use of epitope tagging to detect a killer plasmid-encoded gene product. *Molecular Microbiology*, 19(3), 545-554.
- Schaffrath, R., Meinhardt, F., Meacock, P. A.** (1997): ORF7 of yeast plasmid pGKL2: analysis of gene expression in vivo. *Current Genetics*, 31(2), 190-192.
- Schaffrath, R., Soond, S. M., Meacock, P. A.** (1995a): Cytoplasmic gene expression in yeast: a plasmid-encoded transcription system in *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Society Transactions*, 23(1), 128S.
- Schaffrath, R., Soond, S. M., Meacock, P. A.** (1995b): The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance. *Microbiology*, 141 (Pt 10), 2591-2599.
- Schaffrath, R., Stark, M. J., Gunge, N., Meinhardt, F.** (1992): *Kluyveromyces lactis* killer system: ORF1 of pGKL2 has no function in immunity expression and is dispensable for killer plasmid replication and maintenance. *Current Genetics*, 21(4-5), 357-363.
- Schickel, J., Helmig, C., Meinhardt, F.** (1996): *Kluyveromyces lactis* killer system: analysis of cytoplasmic promoters of the linear plasmids. *Nucleic Acids Research*, 24(10), 1879-1886.
- Schründer, J., Gunge, N., Meinhardt, F.** (1996): Extranuclear expression of the bacterial xylose isomerase (xylA) and the UDP-glucose dehydrogenase (hasB) genes in yeast with *Kluyveromyces lactis* linear killer plasmids as vectors. *Current Microbiology*, 33(5), 323-330.
- Schründer, J., Meinhardt, F.** (1995): An extranuclear expression system for analysis of cytoplasmic promoters of yeast linear killer plasmids. *Plasmid*, 33(2), 139-151.
- Schwer, B., Hausmann, S., Schneider, S., Shuman, S.** (2006): Poxvirus mRNA cap methyltransferase. Bypass of the requirement for the stimulatory subunit by mutations in the catalytic subunit and evidence for intersubunit allostery. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 18953-18960.
- Skarp, K.-P., Zhao, X., Weber, M., Jääntti, J.** (2008): Use of Bimolecular Fluorescence Complementation in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Vancura, A., (ed.): *Membrane Trafficking*, 457. Humana Press, 165-175.
- Skurnik, M., Hyytiäinen, H. J., Happonen, L. J., Kiljunen, S., Datta, N., Mattinen, L., Williamson, K., Kristo, P., Szeliga, M., Kalin-Mänttari, L., Ahola-Iivarinen, E., Kalkkinen, N., Butcher, S. J.** (2012): Characterization of the genome, proteome, and structure of yersiniophage varphiR1-37. *Journal of Virology*, 86(23), 12625-12642.
- Sor, F., Fukuhara, H.** (1985): Structure of a linear plasmid of the yeast *Kluyveromyces lactis*; Compact organization of the killer genome. *Current Genetics*, 9(2), 147-155.
- Sosunov, V., Zorov, S., Sosunova, E., Nikolaev, A., Zakeyeva, I., Bass, I., Goldfarb, A., Nikiforov, V., Severinov, K., Mustaev, A.** (2005): The involvement of the aspartate triad of the active center in all catalytic activities of multisubunit RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 33(13), 4202-4211.
- Sosunova, E., Sosunov, V., Kozlov, M., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Mustaev, A.** (2003): Donation of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor Gre. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15469-15474.



- Stam, J. C., Kwakman, J., Meijer, M., Stuitje, A. R.** (1986): Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of *Kluyveromyces lactis*: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nucleic Acids Research*, 14(17), 6871-6884.
- Stark, M. J., Boyd, A., Mileham, A. J., Romanos, M. A.** (1990): The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast*, 6(1), 1-29.
- Steitz, T. A.** (1998): Structural biology - A mechanism for all polymerases. *Nature*, 391(6664), 231-232.
- Sweetser, D., Nonet, M., Young, R. A.** (1987): Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5), 1192-1196.
- Temiakov, D., Zenkin, N., Vassilyeva, M. N., Perederina, A., Tahirov, T. H., Kashkina, E., Savkina, M., Zorov, S., Nikiforov, V., Igarashi, N., Matsugaki, N., Wakatsuki, S., Severinov, K., Vassilyev, D. G.** (2005): Structural basis of transcription inhibition by antibiotic streptolydigin. *Molecular Cell*, 19(5), 655-666.
- Thomas, J. A., Rolando, M. R., Carroll, C. A., Shen, P. S., Belnap, D. M., Weintraub, S. T., Serwer, P., Hardies, S. C.** (2008): Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201varphi2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology*, 376(2), 330-338.
- Tiggemann, M., Jeske, S., Larsen, M., Meinhardt, F.** (2001): *Kluyveromyces lactis* cytoplasmic plasmid pGKL2: heterologous expression of Orf3p and proof of guanylyltransferase and mRNA-triphosphatase activities. *Yeast*, 18(9), 815-825.
- Tokunaga, M., Wada, N., Hishinuma, F.** (1987): Expression and identification of immunity determinants on linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 in *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, 15(3), 1031-1046.
- Tommasino, M., Ricci, S., Galeotti, C. L.** (1988): Genome organization of the killer plasmid pGK12 from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 5863-5878.
- Touloukhonov, I., Zhang, J., Palangat, M., Landick, R.** (2007): A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing. *Molecular Cell*, 27(3), 406-419.
- Tsien, R. Y.** (1998): The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509-544.
- Vassilyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S., Yokoyama, S.** (2002): Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, 417(6890), 712-719.
- Vassilyev, D. G., Vassilyeva, M. N., Perederina, A., Tahirov, T. H., Artsimovitch, I.** (2007a): Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, 448(7150), 157-162.
- Vassilyev, D. G., Vassilyeva, M. N., Zhang, J. W., Palangat, M., Artsimovitch, I., Landick, R.** (2007b): Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. *Nature*, 448(7150), 163-168.
- Vopálenský, V.** (1999): *Lineární plasmidy kvasinek*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Vopálenský, V.** (2007): *Role 5' koncových struktur u eukaryotických mRNA*. Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Walmacq, C., Kireeva, M. L., Irvin, J., Nedialkov, Y., Lubkowska, L., Malagon, F., Strathern, J. N., Kashlev, M.** (2009): Rpb9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19601-19612.
- Wang, D., Bushnell, D. A., Huang, X., Westover, K. D., Levitt, M., Kornberg, R. D.** (2009): Structural basis of transcription: backtracked RNA polymerase II at 3.4 angstrom resolution. *Science*, 324(5931), 1203-1206.
- Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., Kornberg, R. D.** (2006): Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, 127(5), 941-954.

- Wang, Y., Bininda-Emonds, O. R., van Oers, M. M., Vlak, J. M., Jehle, J. A.** (2011): The genome of *Oryctes rhinoceros nudivirus* provides novel insight into the evolution of nuclear arthropod-specific large circular double-stranded DNA viruses. *Virus Genes*, 42(3), 444-456.
- Werner, F.** (2008): Structural evolution of multisubunit RNA polymerases. *Trends in Microbiology*, 16(6), 247-250.
- Werner, F., Eloranta, J. J., Weinzierl, R. O.** (2000): Archaeal RNA polymerase subunits F and P are bona fide homologs of eukaryotic RPB4 and RPB12. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4299-4305.
- Werner, F., Grohmann, D.** (2011): Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 85-98.
- Westover, K. D., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D.** (2004): Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*, 119(4), 481-489.
- Wild, T., Cramer, P.** (2012): Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 99-105.
- Wilson, D. W., Meacock, P. A.** (1988): Extranuclear gene expression in yeast: evidence for a plasmid-encoded RNA polymerase of unique structure. *Nucleic Acids Research*, 16(16), 8097-8112.
- Wojtas, M. N., Mogni, M., Millet, O., Bell, S. D., Abrescia, N. G.** (2012): Structural and functional analyses of the interaction of archaeal RNA polymerase with DNA. *Nucleic Acids Research*, 40(19), 9941-9952.
- Yáñez, R. J., Rodríguez, J. M., Bournell, M., Rodríguez, J. F., Viñuela, E.** (1993): Two putative African swine fever virus helicases similar to yeast 'DEAH' pre-mRNA processing proteins and vaccinia virus ATPases D11L and D6R. *Gene*, 134(2), 161-174.
- Yutin, N., Koonin, E. V.** (2012): Hidden evolutionary complexity of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses of eukaryotes. *Virology Journal*, 9, 161.
- Zaros, C., Briand, J. F., Boulard, Y., Labarre-Mariotte, S., Garcia-Lopez, M. C., Thuriaux, P., Navarro, F.** (2007): Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 634-647.
- Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S. A.** (1999): Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98(6), 811-824.
- Zhang, J., Palangat, M., Landick, R.** (2010): Role of the RNA polymerase trigger loop in catalysis and pausing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), 99-104.