

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Genetics and Microbiology

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie

Ph.D. study program: Molecular and cell biology, genetics and virology

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



RNA polymeráza: průsečík regulačních sítí

RNA polymerase: The “meeting point” of regulatory networks

Mgr. Jana Wiedermannová

Školitel/Supervisor: Mgr. Libor Krásný, PhD

Praha, 2014

Obsah / Contents

Abstrakt	2
Abstract	3
1. Úvod.....	4
1.1 Bakteriální RNA polymeráza	4
1.2 Podjednotky RNAP	5
1.3 Regulace transkripce	7
1.3.1 Proteinové transkripční faktory	7
1.3.2 Neproteinové transkripční regulátory: 6S RNA a malé molekuly	8
2. Cíle práce.....	8
3. Metody	9
4. Výsledky a diskuse.....	10
5. Závěry.....	12
6. Introduction	13
6.1 Bacterial RNA polymerase.....	14
6.2 Subunits of bacterial RNAP	14
6.3 Regulation of transcription.....	16
6.3.1 Protein transcription factors	16
6.3.2 Non-protein transcription regulators: 6S RNA and small molecules.....	17
7. Aims of the study	18
8. Methods.....	18
9. Results and discussion.....	19
10. Conclusions	21
11. Použitá literatura / References.....	22
12. Strukturovaný životopis	27
13. Curriculum vitae.....	28
14. Seznam publikací / Publications	30

Abstrakt

Bakteriální RNA polymeráza (RNAP) je proteinový komplex nepostradatelný pro přepis DNA do RNA. Jakožto klíčový enzym zodpovědný za regulaci genové exprese shromažďuje signály z buňky a reaguje na ně přesným nastavením úrovně transkripce jednotlivých genů. Tento proces ovlivňují jak vlastní podjednotky RNAP tak i další transkripční faktory (TF), které přímo nebo nepřímo interagují s RNAP.

Cílem této disertace bylo prohloubit znalosti o komplexitě transkripční regulační sítě a o provázanosti jejích jednotlivých nitek, které jsou stále objevovány.

Hlavním tématem této PhD práce je protein HelD, nově objevený vazebný partner RNAP z bakterie *Bacillus subtilis*. Ukázali jsme, že HelD se váže mezi sekundární kanál RNA polymerázy a alfa podjednotky tohoto enzymu. HelD se váže na RNAP ve formě jádra (bez přítomnosti sigma faktoru). Dokázali jsme, že HelD stimuluje transkripci v závislosti na ATP tím, že napomáhá jejímu cyklování a elongaci. Stimulační efekt proteinu HelD je násoben působením podjednotky delta, malé podjednotky RNA polymerázy specifické pro gram pozitivní (G+) bakterie. Tento fakt odhalil nové vztahy v provázanosti komplikované transkripční sítě.

Další dvě publikace této práce pojednávají o vlastní delta podjednotce. Pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) jsme vyřešili 3D strukturu a ukázali jsme, že delta ovlivňuje regulaci RNA polymerázy pomocí koncentrace iniciačních nukleosid trifosfátů (iNTP).

V další publikaci jsme prověřili geny přímo regulované pleiotrofním transkripčním faktorem Spx. Spx hraje klíčovou roli v udržení redoxní homeostáze buněk *B. subtilis* vystavených disulfidickému stresu. Pomocí korelace mezi vazebnými místy Spx-RNAP komplexu (nalezenými pomocí chromatinové imunoprecipitace) a srovnání transkriptomických dat divokého kmene a kmene mutantního v Spx, vystavených diamidovému stresu či nikoli, jsme identifikovali 144 transkripčních jednotek přímo regulovaných faktorem Spx.

Poslední část disertace pomohla zdokonalit bioanalytickou metodu pro hledání malých nekódujících RNA (ncRNA). Současně byl nalezen nový typ vysoce exprimované ncRNA v bakterii *Mycobacterium smegmatis*.

Abstract

Bacterial RNA polymerase (RNAP) is a multisubunit complex essential for transcription of DNA into RNA. As a key enzyme responsible for regulation of gene expression it interprets regulatory signals from the cell and based on these cues RNAP adjusts transcription level of particular genes. This process is affected both by the regular subunits of RNAP as well as other transcription factors (TFs) directly or indirectly interacting with RNAP.

The general focus of this Thesis was to extend the knowledge about the complex transcriptional regulatory networks and about the connections between individual pathways.

The main specific topic and the main publication of the thesis are focused on the Held protein, a novel binding partner of RNAP in *Bacillus subtilis*. We showed that Held binds between the secondary channel of RNAP and alpha subunits of the core form of the enzyme. We proved that Held stimulates transcription in an ATP dependent manner by enhancing transcriptional cycling and elongation. We revealed a new connection in the transcription regulatory machinery when we demonstrated that the stimulatory effect of Held can be amplified by delta, a small subunit of RNAP specific for gram positive (G+) bacteria.

Two other publications of the thesis are dealing with the delta subunit. We solved the 3D structure of delta by nucleic magnetic resonance (NMR) and we showed that delta affects the regulation of RNAP by the concentration of the initiating nucleoside triphosphate (iNTP).

In the next paper, we examined genes directly regulated by a pleiotropic TF Spx. Spx plays a key role in maintaining the redox homeostasis of *B. subtilis* cells exposed to disulfide stress. By correlation of Spx-RNAP binding sites found by chromatin immunoprecipitation (ChIP-chip) and gene differential expression in wild-type and Spx-mutant strains, exposed or not to diamide, we identified 144 transcription units potentially under direct Spx regulation and verified selected results by *in vitro* transcriptions.

The last part of the thesis improved the method for biocomputational searches of small non-coding RNAs (ncRNAs) and coincidentally also discovered a new type of a highly expressed ncRNA in *Mycobacterium smegmatis*.

1. Úvod

Bakterie jsou dominantní životní formou na Zemi. Díky jejich schopnosti přizpůsobit svou genovou expresi měnícím se podmínkám prostředí je můžeme najít i v takových biotopech jako jsou sopečné krátery, arktické oblasti nebo uvnitř jiných buněk. Jsou dokonce schopné přežít ve vesmíru.

Naše laboratoř se zabývá regulací genové exprese gram pozitivní (G+) modelové bakterie *Bacillus subtilis*. Její genom obsahuje více než 4100 kódujících sekvencí (Kunst et al., 1997), funkce 1800 z nich však není dosud známa (Ogasawara, 2000).

Základním regulačním krokem bakteriální genové exprese je transkripce. Proces transkripce probíhá pomocí DNA dependentní RNA polymerázy (RNAP), která přepisuje DNA do RNA. RNAP slouží jako centrální uzel regulační sítě – místo, kde se setkávají přímé i nepřímé signály z buňky jako odpovědi na vnější podněty. Tyto signály mohou být přeneseny k RNAP mnoha různými způsoby: regulace genové exprese může být zprostředkována malými efektorovými molekulami [např. iniciační nukleosid trifosfáty (iNTP), guanosine tetra/pentafosfát (ppGpp/pppGpp)], regulačními RNA nebo proteinovými transkripčními faktory (TF). Právě tyto „zprostředkovatelé signálu“ jsou hlavní náplní mojí disertační práce. Ta pojednává o podjednotce δ , specifické pro G+ bakterie, proteinech interagujících s RNAP G+ bakterií (Spx, HelD) a také o malé regulační RNA (6S RNA), která ovlivňuje vlastnosti RNAP mnoha organismů.

1.1 Bakteriální RNA polymeráza

RNA polymeráza je esenciální protein genové exprese. Zatímco eukaryota mají více typů RNAP, Archea a bakterie mají ve svých buňkách pouze jeden typ DNA dependentní RNAP. Ta přepisuje mRNA stejně jako i nekódující RNA. Katalytické jádro RNAP se skládá z pěti podjednotek: $\alpha_2\beta\beta'\omega$ (Sweetser et al., 1987), a je schopné elongace transkripce, není však schopné transkripci iniciovat. Tento komplex je sekvenčně, strukturně i funkčně konzervovaný od bakterií až k lidem (Cramer, 2002; Ebright, 2000; Sweetser et al., 1987). Až teprve vazba příslušného σ faktoru k jádru RNAP umožní holoenzymu rozpoznat promotorovou sekvenci na DNA a zahájit transkripci (Campbell et al., 2002; Mooney et al., 2005). Mimo σ faktorů se váže na RNAP i spousta jiných proteinů a neproteinových faktorů, které ovlivňují různé fáze procesu transkripce.

Tvar RNAP připomíná krabí klepeto. „Čelisti“ klepeta jsou tvořena převážně β a β' podjednotkami a mezi nimi vzniká DNA kanál (~27 Å široký) (Zhang et al., 1999), do

kterého se vejde dvouvláknová DNA jakožto templát pro transkripci. Katalytické místo se nachází v místě spojení „čelistí“ klepeta a pro jeho správné fungování jsou důležité dva Mg^{2+} ionty (Severinov, 2000). Skrz RNAP vede i úzký sekundární kanál. Ten začíná blízko Mg^{2+} iontů, končí na zadní straně enzymu a slouží jako brána pro nukleosid trifosfáty (NTP) do aktivního centra. Syntetizovanou RNA odvádí z enzymu RNA-výstupní kanál. Právě vazba transkripčních faktorů dovnitř nebo blízko těchto kanálů je běžným způsobem regulace aktivity RNAP.

1.2 Podjednotky RNAP

β a β' jsou největší podjednotky RNAP (geny *rpoB*, *rpoC*; 133 respektive 134 kDa). Dohromady tvoří aktivní centrum zodpovědné za syntézu RNA. Jsou důležité pro interakci s templátovým a netemplátovým vláknem promotorové DNA a účastní se také procesu terminace (Gentry and Burgess, 1993; Murakami et al., 2002). Některá antibiotika se vážou na β podjednotku: např. rifampicin, sorangicin a streptolydigin (Campbell et al., 2005; Gentry and Burgess, 1993; Yang and Price, 1995).

α je třetí největší podjednotkou a v každé molekule enzymu se vyskytuje ve dvou kopiích, je kódována genem *rpoA* (35 kDa). Jedna z kopií se váže na β a druhá na β' podjednotku (Minakhin et al., 2001). Součástí α proteinu je větší N-koncová (α NTD) a menší C-koncová doména (α CTD). α NTD slouží k vazbě na RNAP. α CTD interaguje s promotorovou DNA pomocí sekvenčně nespecifických vazeb s elementy v oblasti kolem pozice -50 vzhledem k transkripčnímu startu (Gourse et al., 2000; Ross et al., 1993). α CTD je také důležitá pro vazbu některých transkripčních faktorů jako je např. Spx (Nakano et al., 2003; Zuber, 2004).

ω podjednotka je nejmenší součást RNAP. V *B. subtilis* je kódována genem *yloH* (7.6 kDa). ω je vysoce konzervována v rámci G+ bakterií (YloH) i G- bakterií (RpoZ), Archeí (RpoK) a dokonce i eukaryot (Rbp6) (Minakhin et al., 2001). Přestože není esenciální a pro transkripci je postradatelná (Gentry and Burgess, 1989), pomáhá sestavit RNAP a sestavenou RNAP stabilizuje (Haugen et al., 2008; Mathew and Chatterji, 2006). Nedávno bylo prokázáno, že ovlivňuje navázání primárního σ faktoru (Gunnelius et al., 2014).

σ podjednotka (σ faktor) je nepostradatelná pro zahájení transkripce a je specifická pouze pro bakterie. σ je schopná rozpoznat promotorovou sekvenci a navázat se na ní, zároveň snižuje afinitu RNAP k nespecifické DNA. Hraje také důležitou úlohu při oddělování vláken dvoušroubovice DNA a tím vytvoření transkripční bubliny a při odstartování RNAP

z promotoru (Vassylyev et al., 2002). Pouze RNAP s navázaným σ faktorem (RNAP- σ ; holoenzym) dokáže rozpoznat promotor. Počet σ faktorů je specifický pro jednotlivé druhy bakterií. *B. subtilis* má 17 různých σ faktorů (např. *E. coli* má 7 σ faktorů, *Mycoplasma genitalium* 1, *Streptomyces coelicolor* 63) (Gruber and Gross, 2003). Alternativní σ faktory soupeří o katalytické jádro RNAP. Různé holoenzymy poté rozpoznávají různé promotorové sekvence v rámci genomu a aktivují rozdílné skupiny genů. To umožní buňce přizpůsobit expresi k momentálním potřebám. Transkripce základního setu genů nezbytných pro fungování buňky je zajištěna faktorem σ^{70} v *E. coli* a faktorem σ^A v *B. subtilis*. Další σ faktory jsou zodpovědné za odpověď genové exprese hlavně na různé druhy stresu.

Jak aminokyselinová sekvence, tak přítomnost dalších podjednotek RNAP se liší u různých bakteriálních druhů (Lane and Darst, 2010). Na rozdíl od G- bakterií, RNAP z *B. subtilis* a jiných G+ bakterií obsahuje dvě podjednotky navíc: δ a ω_1 .

ω_1 je kódována genem *yzkG* (8.1 kDa) a spekuluje se o její funkci chaperonu v průběhu formování RNAP komplexu, ale její funkce je dosud nejasná (Doherty et al., 2010). Doposud nebyla opublikována jediná studie zaměřená na tento protein. ω_2 podjednotka *B. subtilis* (7.6 kDa) je homologem k běžné ω G- bakterií (Mathew and Chatterji, 2006).

δ je kódována genem *rpoE* (20.5 kDa). Produktem tohoto genu je značně kyselý protein (pI, 3.6) (Lampe et al., 1988). Poprvé byla δ zmíněna jakožto protein potřebný pro správnou transkripci fágových proteinů v buňkách *B. subtilis* infikovaných fágem SP01 (Pero et al., 1975; Tjian et al., 1977). Skládá se ze dvou domén – strukturované N-terminální domény (NTD) a nestrukturované kyselé C-terminální domény (CTD). Aminokyselinová sekvence CTD (úseky obsahující převážně glutamovou a asparagovou kyselinu) z ní dělají prakticky polyaniont (López de Saro et al., 1999). Tím, že *in vitro* δ destabilizuje komplexy RNAP s DNA, zvyšuje specifitu RNAP pro konsenzuální promotor (Achberger and Whiteley, 1981; Dobinson and Spiegelman, 1987). Mimo inhibičního efektu δ na transkripci, byla prokázána stimulace na některých templátech, pravděpodobně zlepšením recyklace RNAP (Juang and Helmann, 1994). Přestože tento protein není esenciální, jeho fyziologická role nebyla dosud jasná. U mutantní bakterie postrádající δ podjednotku byl pozorován pouze slabý fenotyp prodloužené lag fáze růstu buněk naředěných ze stacionární fáze do čerstvého média (López de Saro et al., 1999).

1.3 Regulace transkripce

Regulace genové exprese je zásadní pro buněčnou adaptaci ke změnám prostředí. Může být regulována na všech úrovních – transkripce, translace nebo posttranslační modifikace. Regulace na úrovni iniciace transkripce je ale nejefektivnější a nejvíce používaná u bakterií a umožňuje buňkám přiměřeně reagovat na nedostatek živin (Paul et al., 2004). Tento typ regulace je zprostředkován transkripčními faktory (TF) stejně jako malými efektorovými molekulami [např. iNTP (Krásný et al., 2008; Rabatinová et al., 2013; Sojka et al., 2011) nebo (p)ppGpp (Grundy and Henkin, 2004; Srivatsan and Wang, 2008)], nekódujícími RNA (ncRNA), aminokyselinami, vitamíny, a dalšími molekulami (Borukhov et al., 2005).

1.3.1 Proteinové transkripční faktory

Vedle vlastních podjednotek RNAP existuje velké množství jiných proteinů, které se dočasně vážou na RNAP jen za určitých podmínek a určitým způsobem ovlivňují její funkce (Epshtein et al., 2010; Lewis et al., 2008; Toulmé et al., 2000; Yang et al., 2009). Kombinací několika přístupů bylo odhadnuto, že v *E. coli*, která obsahuje celkem asi 4400 genů, je 300-350 regulačních DNA-vazebných proteinů (Pérez-Rueda and Collado-Vides, 2000). Velké množství dalších proteinů ovlivňuje transkripci i bez vazby na DNA. Ze stovek transkripčních faktorů se v této práci budu zabývat dvěma důležitými proteiny, které jsou předmětem zkoumání v mých odborných publikacích: HelD a Spx.

HelD jako vazebný partner RNAP byl prvně publikován v roce 2011 (Delumeau et al., 2011). Na základě sekvenční homologie se předpokládá, že je to DNA helikáza z rodiny UvrD/Rep helikáz. Proteiny této rodiny jsou závislé na ATP a rozplétají dvouvláknovou DNA (dsDNA) ve směru 3'–5' (Yang and Lewis, 2010). HelD má 90 kDa a je kódována genem *helD* (*yvgS*), který je silně exprimován v průběhu exponenciální a stacionární fáze růstu. Další výrazný nárůst v expresi HelD můžeme pozorovat ve sporulaci (Nicolas et al., 2012). Dosud byla zjištěna role HelD v buňce při opravě DNA a homologní rekombinaci (Carrasco et al., 2001). Nicméně hlavní funkce zůstala nezjištěna a ani její biochemická charakterizace ani její role v transkripci nebyla zatím zkoumána.

Spx je globální transkripční regulátor vysoce konzervovaný v rámci G+ bakterií (Zuber, 2004). Pomáhá buňkám *B. subtilis* udržet redoxní homeostázi i v redukcujícím prostředí bakteriální cytoplasmy a bránit se proti oxidativnímu stresu vyvolávajícímu vznik disulfidických můstků a špatnému sbalení proteinů a jejich následné nefunkčnosti (Mostertz

et al., 2008; Scharf et al., 1998; Smits et al., 2005). Spx se přímo váže na CTD α podjednotky RNAP (α CTD) a tím pozitivně nebo negativně reguluje transkripci svých cílových genů (Reyes and Zuber, 2008).

1.3.2 Neproproteinové transkripční regulátory: 6S RNA a malé molekuly

6S RNA je nekódující RNA (ncRNA) kterou můžeme nalézt téměř u všech skupin bakterií. Má velmi konzervovanou sekundární strukturu skládající se z centrální bubliny a dvou bočních nepravidelných vláseček. Její sekundární struktura připomíná rozpletanou promotorovou DNA a tím umožňuje vazbu na RNAP (Trotochaud and Wassarman, 2005; Wassarman and Storz, 2000). Vazba 6S RNA na RNAP se základním σ faktorem znemožňuje transkripci z mnoha promotorů a umožňuje tak adaptaci na podmínky stacionární fáze, kdy je potřeba RNAP vázaná na σ faktory specifické pro tyto podmínky (Cavanagh et al., 2008; Neusser et al., 2010; Trotochaud and Wassarman, 2004). 6S RNA může sloužit jako templát pro syntézu transkripčních produktů nazývaných pRNA, což vede k ukončení represe vzniklé pomocí vazby 6S RNA na RNAP a k uvolnění RNAP z napodobeného otevřeného komplexu (Cavanagh et al., 2012; Gildehaus et al., 2007; Wassarman and Saecker, 2006; Wurm et al., 2010).

Iničiační nukleosid trifosfáty (iNTP) a (p)ppGpp jsou malé efektorové molekuly, jejichž koncentrace se v buňce mění v závislosti na fázi růstu (Rutherford et al., 2007). V průběhu exponenciální fáze potřebují bakterie velké množství ribozomů k produkci velkého množství nových proteinů potřebných k růstu (Condon et al., 1995). Aktivita ribozomálních RNA promotorů musí být zvýšena oproti stacionární fázi, kdy je hladina živin v prostředí nízká a bakterie musí šetřit energií. Tyto změny jsou regulovány (p)ppGpp a iNTP (Murray et al., 2003). *E. coli* a *B. subtilis* používají odlišné strategie regulace exprese ribosomální RNA (Krásný and Gourse, 2004; Krásný et al., 2008).

2. Cíle práce

Hlavním cílem této disertace bylo prohloubení znalostí o genové regulaci na úrovni transkripce. Zaměřila jsem se na vazebné partnery RNA polymerázy v modelové bakterii *Bacillus subtilis* a zkoumala jsem jejich strukturu a funkci v průběhu složitého procesu přepisu DNA do RNA.

Zkoumané proteiny interagující s RNAP byly:

1. δ podjednotka RNAP (publikace I, II, III)
2. HelD protein (publikace III)
3. Spx transkripční faktor (publikace IV)
4. 6S RNA (publikace V)

3. Metody

Práce s nukleosid trifosfáty a nukleovými kyselinami:

PCR	Extrakce RNA
Sekvenování	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)
Klonování	Northern blotování
Izolace plamidové a chromozomální DNA	Kvantitativní „primer extension“

Práce s bakteriemi:

Kultivace v různých mediích za různých podmínek	Měření optické hustoty Kompetiční esej
---	---

Práce s proteiny:

Čištění proteinů	Nedenaturovaná PAGE esej
Afinitní chromatografie	Měření ATPázové aktivity
Nukleární magnetická rezonance	„Pull down“ experiment
Western blotování	Imunoprecipitace
Western blotování přes proteinového prostředníka	Transkripce <i>in vitro</i>
Isoelektrická fokusace	MALDI hmotnostní spektrometrie a identifikace proteinů

Celogenomové přístupy:

Chromatinová imunoprecipitace (ChIP–chip)	Analýza transkriptomu
---	-----------------------

In silico analýzy:

Statistické analýzy promotorů	Výpočet minimální volné energie a <i>in silico</i>
Analýzy proteinové sekvence a domén	srovnání
srovnání sekvencí metodou BLAST	

4. Výsledky a diskuse

První dvě publikace této disertační práce se zabývají δ podjednotkou RNAP. V Publikaci I, která byla zpracována ve spolupráci s Masarykovou Universitou v Brně, jsme vyřešili strukturu N-terminální domény (NTD) δ podjednotky pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Pro toto měření byla použita zkrácená forma proteinu (NTD s histidinovou kotvou). NTD se skládá ze čtyř α -helixů a antiparalelního β -listu, dále složeného ze tří krátkých β -řetězců. Tyto řetězce tvoří vrch pomyslné trojnožky z α -helixů. Já jsem v tomto projektu přispěla při čištění proteinů pro NMR.

Publikace II řeší (Rabatinová et al., 2013) *in vitro* a *in vivo* vlastnosti δ proteinu. Dokázali jsme, že δ je jednou ze základních složek transkripčního aparátu, která pomáhá buňce přežít v přírodě. V sérii experimentů jsme ukázali, že δ umožňuje RNAP reagovat na koncentraci iNTP, což je zásadní pro rychlé změny v genové expresi v závislosti na dostupnosti živin. To také vysvětluje sníženou životaschopnost kmene s mutantní δ podjednotkou, který není schopen přežít pod tlakem kompetujícího kmene v měnících se podmínkách. Tato podjednotka je důležitá pro přežití buňky v reálném světě. V tomto projektu jsem přispěla optimalizací *in vitro* metod pro testování elongačních komplexů.

δ hraje jednu z hlavních rolí i v Publikaci III, jelikož jsme objevili vztahy mezi δ a HelD proteinem. Zjistila jsem, že HelD protein se vyskytuje při procesu purifikace v izolátu RNAP z *B. subtilis*. Přibližně ve stejnou dobu byl také publikován článek, ve kterém globálním přístupem identifikovali vazebné partnery RNAP. HelD protein byl jedním z nich (Delumeau et al., 2011). My jsme následně ověřili vazbu mezi HelD a RNAP dalšími metodami, určili jsme vazebné místo HelD na RNAP, a charakterizovali jsme funkci HelD *in vitro* a *in vivo*. Tím, že byla objevena funkční spojitost mezi HelD a δ podjednotkou, zapadl další dílek skládačky transkripční mašinerie na své místo.

HelD stimuluje transkripci *in vitro* v závislosti na ATP a váže se výhradně na jádro enzymu (bez σ faktoru). Už tento fakt naznačuje, že neovlivňuje kroky při iniciaci transkripce. Stimulace na nadšroubovicově sbalených DNA templátech je zvýšena spoluprací s δ podjednotkou RNAP. Naše práce ukázala, že tyto dva proteiny umožňují efektivnější cyklování RNAP. *In vivo* jsme ukázali, že absence HelD prodlužuje čas nutný pro opětovné zahájení růstu po lag fázi růstu, podobně jako absence δ . Tento fenotyp ovlivňuje schopnost buněk se přizpůsobit změnám v dostupnosti živin v prostředí. Publikace III představuje hlavní výsledky méj disertační práce a provedla jsem 90 % popsaných experimentů.

Hodně otázek o fungování HelD zůstalo nezodpovězených a další posun ve znalostech očekáváme po analyzování transkriptomických dat HelD-mutantního kmene, které jsme v nedávné době obdrželi (Wiedermannová J., Sudzinová P., Rabatinová A., Delumeau O., Krásný L., unpublished).

Vedle vlastních podjednotek RNAP a proteinů vytvářejících silné a stabilní interakce s enzymem je ještě velké množství proteinů a neproteinových vazebných partnerů, kteří se vážou na RNAP pouze za velmi specifických podmínek. Publikace IV je zaměřena na Spx transkripční regulátor, který hraje klíčovou roli v udržení redoxní homeostáze v buňkách *B. subtilis* vystavených disulfidickému stresu. Hlavním cílem této práce bylo identifikovat geny, které jsou přímo regulované faktorem Spx při disulfidickém stresu, pomocí celogenomového mapování Spx-RNAP vazebných míst.

Vazebná místa Spx-RNAP komplexu na chromozómu byla zmapována našimi spolupracovníky z Francie (laboratoř P. Noirota, Institut national de la recherche agronomique) pomocí chromatinové imunoprecipitace přes Spx s SPA kotvou nesledované hybridizací získané DNA na čip (ChIP-chip). To bylo provedeno před nebo po krátkém působení nižší než smrtelné dávky diamidu (způsobující disulfidický stres) na buňky *B. subtilis*. Takto získaná data byla zkombinována s výsledky transkriptomické analýzy divokého kmene a kmene mutantního v Spx, vystavených stejným stresovým podmínkám. Výsledkem byla identifikace 144 transkripčních jednotek (zahrnujících 275 genů) přímo regulovaných pomocí proteinu Spx.

Moje část projektu (společně s A. Rabatinovou) bylo ověření vybraných Spx-aktivovaných promotorů pomocí *in vitro* transkripce. Potvrdili jsme aktivaci sedmi nově objevených promotorů oxidovaným transkripčním faktorem Spx. Zajímavým výsledkem bylo objevení jednoho promotoru (*yvgN*), který pro svou aktivaci nevyžadoval oxidovanou formu Spx. Budou potřeba další experimenty, aby byl mechanismus této aktivace objasněn. Tato publikace globálně charakterizuje regulační síť transkripčního faktoru Spx v *B. subtilis*.

Poslední publikace této disertační práce (Publikace V) je zaměřena na neproteinovou součást transkripční sítě - 6S RNA. Byla vypracována ve spolupráci s J. Pánkem z Mikrobiologického ústavu AVČR, který provedl bioinformatickou část projektu. Publikace řeší problém bioinformatického určení a předpovězení homologů známých nekódujících RNA (ncRNA) v jiných taxonech, která často selhává kvůli slabé evoluční konzervovanosti sekvencí, struktury, kolokalizace genů na chromozómu a genomové lokace. Struktura se ukázala jako nejkonzervovanější vlastnost ncRNA.

Struktura 6S RNA byla použita pro vytvoření nového bioinformatického postupu pro identifikaci homologních ncRNA a bylo prokázáno, že na rozdíl od optimálních (s nejnižší volnou energií) a konsenzuálních struktur, suboptimální struktury mohou lépe zachytit homologii RNA dokonce i ve vzdáleně příbuzných druzích bakterií.

Vyvinutý algoritmus byl použit pro *in silico* identifikaci 6S RNA v nepříbuzných bakteriích (*Streptomyces*, *Mycobacterium*), kde nebyla 6S RNA dříve identifikována ani experimentálně prokázána. Expresí identifikovaných sekvencí ncRNA byly ověřeny experimentálně.

Prokázali jsme expresi a vazbu na RNAP s hlavním σ faktorem pro jednu z navržených sekvencí v bakteriích rodu *Streptomyces*, což je typickým znakem pro funkční 6S RNA. Pro *Mycobacterium* jsme předpověděli jednu ncRNAs (Ms1), jejíž exprese ve stacionární fázi byla v buňce následně experimentálně prokázána, ale nebyla zaznamenána žádná interakce této RNA s RNAP v komplexu s hlavním σ faktorem. To naznačuje, že Ms1 není pravou 6S RNA, ale jiným typem ncRNA. Ms1 je tématem dalšího výzkumu v naší laboratoři.

Tato publikace ukázala, že z biologického hlediska mohou být suboptimální sekundární struktury přirozenější než optimální a že tato vlastnost může být úspěšně využita k predikci nekódujících RNA u evolučně vzdálených taxonů nejen prokaryot. K této publikaci jsem přispěla experimentálním ověřením exprese bioinformaticky navrženého kandidáta ncRNA v *M. smegmatis* a ověřením její vazby na RNAP.

5. Závěry

Porozumění genové expresi je jednou ze základních otázek buněčné biologie. Tento proces je vysoce konzervovaný od bakterií až po lidi. Také základní nástroj genové exprese, DNA dependentní RNA polymeráza, je strukturně konzervovaná. Na rozdíl od Eukaryot, která používají 3 různé druhy RNAP k transkripci různých RNA, v bakteriích je jeden typ RNA polymerázy zodpovědný za transkripci jak stabilní ncRNA (tzn. tRNA, rRNA) tak protein-kódující RNA (mRNA). Zároveň hodně prokaryotních proteinů a procesů mají své protějšky v eukaryotních. Tato universálnost bakteriální RNAP společně s rychlou a snadnou kultivací předurčila bakterie, aby sloužily jako zjednodušený model pro objevování nových interakcí a vztahů velmi komplikované transkripční sítě.

Jelikož je transkripce životně důležitým procesem pro každou buňku, porozumění klíčovým součástí je zásadní pro vývoj nových antibakteriálních látek. Universálnost RNAP je výhodná pro výzkum základních principů transkripce, nicméně její specifita a

jedinečnost v různých organismech může pomoci rozšířit možnosti navrhování nových druhově specifických anti-RNAP látek.

Tato disertační práce strukturně a funkčně charakterizovala několik proteinů typických pro G⁺ bakterie (δ podjednotka RNAP, HelD protein, Spx transkripční regulátor), vylepšila metodu pro bioinformatické hledání malých nekódujících RNA a současně objevila nový typ vysoce exprimované ncRNA v *M. smegmatis*. Naše práce posunula porozumění RNA polymerázy jakožto centra, kde se sbíhají různé typy signálů a ovlivňují výslednou transkripci.

Budoucí výzkumné plány naší laboratoře zahrnují analýzu transkriptomických dat mutantů v δ a HelD a zaměříme se také na vyřešení 3D struktury HelD nebo jejích částí. Chceme charakterizovat proteiny potenciálně analogní k HelD (např. PcrA), které mohou nahrazovat funkci HelD v mutantním kmeni.

6. Introduction

Bacteria are the dominant life form on Earth. Due to their ability to adapt by changing gene expression in response to changing environmental conditions, we can find them even in volcanos, arctic areas or inside other cells. They are even able to survive in space.

Our laboratory focuses on gene expression regulation in the G⁺ model bacterium *Bacillus subtilis*. Its genome consists of more than 4100 coding sequences (Kunst et al., 1997) but the function of 1800 is still unknown (Ogasawara, 2000).

The basic regulatory step of bacterial gene expression is transcription. The process of transcription is performed by DNA dependent RNA polymerase (RNAP), which transcribes DNA into RNA. RNAP serves as a central point of a regulatory network - as a “meeting point” of direct or indirect signals produced by the cell to answer the outer stimuli. These signals can be transported to RNAP by many different ways: regulation of transcription can be mediated by small effector molecules [e.g. initiation nucleoside triphosphates (iNTP), guanosine tetra/pentaphosphate (ppGpp / pppGpp)], regulatory RNAs or protein transcription factors (TF). These mediators are the main topic of my work. The Thesis deals with G⁺ bacteria-specific subunit of the RNAP (δ), proteins interacting with RNAP (Spx, HelD), and also a small RNA (6S RNA) affecting properties of RNAP.

6.1 Bacterial RNA polymerase

RNAP is an essential protein required for gene expression. Unlike eukaryotes, Archea or bacteria have only one type of DNA dependent RNAP (transcribes mRNA as well as non-coding RNA). The catalytic core of RNAP consists of five subunits: $\alpha_2\beta\beta'\omega$ (Sweetser et al., 1987) and it is capable of transcription elongation but not initiation. This complex is sequentially, structurally and functionally conserved from bacteria to humans (Cramer, 2002; Ebright, 2000; Sweetser et al., 1987). Binding of an appropriate σ factor to RNAP core enables the holoenzyme to recognize specific promoter DNA and initiate transcription (Campbell et al., 2002; Mooney et al., 2005). Besides σ factors, RNAP binds many proteins or non-protein factors which affect various steps of the transcription process.

RNAP resembles a crab claw. The jaws of the claw are composed mostly of the β and β' subunit and form the DNA channel (~ 27 Å width) (Zhang et al., 1999) which is just wide enough to accommodate the double-stranded DNA (dsDNA) template. The catalytic site resides at the joint of the pincers of the claw and two Mg^{2+} ions are important for its appropriate function (Severinov, 2000). A narrow secondary channel runs through the polymerase molecule. This channel begins close to the catalytic Mg^{2+} ions, opens at the back of the enzyme and serves as a gate for NTPs to the active site. The RNA exit channel leads the nascent RNA from the enzyme. Binding of transcription factors inside or near these channels is a common way to regulate RNAP activity.

6.2 Subunits of bacterial RNAP

The β and β' subunit are the largest subunits of RNAP (*rpoB*, *rpoC* gene; 133 and 134 kDa respectively). Together they form the active center responsible for RNA synthesis. They are important for interaction with template and non-template strands of promoter DNA and they also participate in the process of transcription termination (Gentry and Burgess, 1993; Murakami et al., 2002). Some antibiotics interact with the β subunit: e.g. rifampicin, sorangicin and streptolydigin (Campbell et al., 2005; Gentry and Burgess, 1993; Yang and Price, 1995).

The α subunit is the third-largest subunit and it is present in two copies per molecule of RNAP. α is coded by the *rpoA* gene (35 kDa). One of the α molecules binds β and the other binds β' (Minakhin et al., 2001). The α subunit contains a larger N-terminal and a smaller C-terminal domain (α NTD, α CTD). α NTD contains determinants for assembly of

RNAP. α CTD interacts with promoter DNA by non-sequence-non-specific interactions with upstream elements of promoters (Gourse et al., 2000; Ross et al., 1993). α CTD also interacts with some transcription factors (e.g. Spx) (Nakano et al., 2003; Zuber, 2004).

The ω subunit is the smallest subunit of RNAP. It is encoded by the *yloH* gene in *B. subtilis* (67 aa, 7.6 kDa). The ω subunit is highly conserved in G⁺ (YloH) and G⁻ bacteria (RpoZ), Archea (RpoK), and even in eukaryotes (Rbp6) (Minakhin et al., 2001) and facilitates assembly of RNAP and stabilizes assembled RNAP (Haugen et al., 2008; Mathew and Chatterji, 2006). It is not essential and it is dispensable for transcription (Gentry and Burgess, 1989). Recently it was shown to also affect the binding of the primary σ factor (Gunnelius et al., 2014).

The σ subunit (σ factor) is indispensable for transcription initiation and it is strictly bacteria-specific. σ recognizes and binds promoter sequence and reduces the affinity of RNAP for nonspecific DNA, it plays an important role in separation of DNA strands to create the transcription bubble and it is also important in promoter escape and clearance (Vassylyev et al., 2002). Only RNAP bound to σ (RNAP- σ ; the holoenzyme) is capable to recognize promoter. The number of σ factors is specific for different bacterial species. *B. subtilis* contains 17 different σ factors (e.g. *E. coli* contains 7 σ factors, *Mycoplasma genitalium* 1, *Streptomyces coelicolor* 63) (Gruber and Gross, 2003). Alternative σ factors compete for the catalytic RNAP-core to form the holoenzyme. The different holoenzymes thus recognize the distinct promoter classes in the genome and activate discrete sets of genes to satisfy the needs of the cell for adaptation. Transcription of housekeeping genes is provided by σ^{70} in *E. coli* and by σ^A in *B. subtilis*. Other σ factors are responsible for the change of gene expression mainly during different stresses.

Both the amino acid sequence and the presence of additional subunits of RNAP vary among bacterial species (Lane and Darst, 2010). Unlike in G⁻ bacteria, RNAP from *B. subtilis* and other G⁺ bacteria contains two extra subunits: δ and ω_1 .

ω_1 is encoded by the *yzkG* gene (8.1 kDa) and may function as chaperon during RNAP folding but the function is still not clear (Doherty et al., 2010). So far not a single study has focused on this protein. ω_2 (7.6 kDa) is homologous to common ω in G⁻ bacteria (Mathew and Chatterji, 2006).

δ is encoded by the *rpoE* gene (20.5 kDa). The product of this gene is a highly acidic protein (pI, 3.6) (Lampe et al., 1988). It was firstly reported as a protein required for accurate middle gene transcription in phage SP01-infected *B. subtilis* cells (Pero et al., 1975; Tjian et

al., 1977). It consists of two domains – the structured N-terminal domain (NTD) and the unstructured acidic C-terminal domain (CTD). Amino acid composition of CTD (stretches of glutamic and aspartic acid residues) makes it virtually a polyanion (López de Saro et al., 1999). δ increases RNAP's specificity for consensus promoter by destabilizing complexes of RNAP with DNA *in vitro* (Achberger and Whiteley, 1981; Dobinson and Spiegelman, 1987). Besides the inhibitory effect of δ on transcription, δ was shown to stimulate transcription on some templates, possibly by enhancing RNAP recycling (Juang and Helmann, 1994). As the protein is not essential, physiological role of δ was not clear. Mutants without δ display only a mild phenotype consisting of a prolonged lag phase of cells diluted from stationary phase into fresh medium (López de Saro et al., 1999).

6.3 Regulation of transcription

Regulation of gene expression is crucial for cell adaptation to environmental changes. It can be regulated at all levels- transcription, translation or posttranslational modifications but the regulation at the level of transcription initiation is the most effective and the most used in bacteria. This kind of regulation enables the cells to properly answer the insufficiency of nutrients (Paul et al., 2004) and it is mediated by transcription factors (TFs) as well as small effector molecules like iNTP (Krásný et al., 2008; Rabatinová et al., 2013; Sojka et al., 2011) or (p)ppGpp (Grundy and Henkin, 2004; Srivatsan and Wang, 2008), non-coding RNAs (ncRNAs), amino acids, vitamins, and other molecules (Borukhov et al., 2005).

6.3.1 Protein transcription factors

In addition to *bona fide* subunits, a large number of other protein factors temporarily interact with RNAP and affect its properties under various conditions and in various ways (Epshtein et al., 2010; Lewis et al., 2008; Toulmé et al., 2000; Yang et al., 2009). Using a combination of several approaches it was estimated a total of 300-350 regulatory DNA-binding proteins out of ~4400 genes existing in *E. coli* (Pérez-Rueda and Collado-Vides, 2000). A number of other proteins affect transcription without binding DNA. From hundreds of TFs, I will further discuss two important proteins, which were topics of my research papers: HelD and Spx.

HelD as a binding partner of RNAP was first reported in 2011 (Delumeau et al., 2011). Based on sequence homology, it is a putative DNA helicase from the UvrD/Rep family. Proteins from this family unwind dsDNA in 3'–5' direction in an ATP dependent manner

(Yang and Lewis, 2010). HelD is a 90 kDa big protein coded by the *helD* (*yvgS*) gene which is strongly expressed during the exponential and stationary phase of growth and further increase of expression is observed during sporulation (Nicolas et al., 2012).

The cellular role of HelD was implicated in DNA repair and homologous recombination (Carrasco et al., 2001). However the main function in the cell remains unknown and its biochemical characterization and its role in transcription was not investigated before.

Spx is a global transcription regulator that is highly conserved in G⁺ bacteria (Zuber, 2004). It helps the *B. subtilis* cell to maintain redox homeostasis in highly reducing environment of bacterial cytoplasm and to defend against oxidative stress leading to disulfide bonds formation and misfolding and inactivation of proteins (Mostertz et al., 2008; Scharf et al., 1998; Smits et al., 2005). Spx directly binds to the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit (α CTD) to positively or negatively regulate transcription of its target genes (Reyes and Zuber, 2008).

6.3.2 Non-protein transcription regulators: 6S RNA and small molecules

6S RNA is a non-coding RNA that can be found in almost all groups of bacteria. It exhibits a highly conserved secondary structure consisting of a central bulge flanked by two irregular stem structures, which resembles open DNA promoters and allows its binding to RNA polymerase holoenzyme containing the primary σ factor (Trotochaud and Wassarman, 2005; Wassarman and Storz, 2000). Binding of 6S RNA to RNAP with the housekeeping σ factor interferes with transcription at many promoters and facilitates adaptation to stationary phase conditions, where RNAP is bound to stationary phase-specific σ (Cavanagh et al., 2008; Neusser et al., 2010; Trotochaud and Wassarman, 2004). To relieve the 6S RNA-dependent repression and to release RNAP from the mimicked open promoter complex, 6S RNA can serve as a template for synthesis of *de novo* transcription products termed pRNA (Cavanagh et al., 2012; Gildehaus et al., 2007; Wassarman and Saecker, 2006; Wurm et al., 2010).

iNTP and (p)ppGpp are small effector molecules whose concentration changes in dependence on the bacterial phase of growth (Rutherford et al., 2007). During exponential phase bacteria needs a high number of ribosomes to produce the huge amount of new proteins required for growth (Condon et al., 1995). The activities of ribosomal RNA (rRNA) promoters have to be high compared to stationary phase of growth, where the level of nutrients is low and bacteria have to save energy. These changes are regulated by (p)ppGpp

and iNTP (Murray et al., 2003). *E. coli* and *B. subtilis* use diverse strategies of rRNA gene expression regulation (Krásný and Gourse, 2004; Krásný et al., 2008).

7. Aims of the study

The main general aim of this thesis was to extend the knowledge about gene regulation on the level of transcription. I focused on interacting partners of RNAP in the model organism *Bacillus subtilis* and explored their structure and function during the complex process of transcription. The specific aims focused on four selected interacting partners of RNAP.

The selected RNAP-interacting partners were:

1. δ subunit of RNAP (publications I, II, III)
2. HelD protein (publication III)
3. Spx transcription factor (publication IV)
4. 6S RNA (publication V)

8. Methods

Work with NTPs and nucleic acids:

PCR	RNA extraction
Sequencing	Thin-layer chromatography (TLC)
Cloning	Northern blotting
Chromosomal and plasmid DNA extraction	Quantitative primer extension

Work with bacteria:

Cultivation in various media and conditions	Competition assay
Optical density measurement	

Work with proteins:

Protein purification	Measuring of ATPase activity
Affinity chromatography	Pull down experiment
Nuclear magnetic resonance	Immunoprecipitation
Western blotting	Transcription <i>in vitro</i>
Far western blotting	MALDI mass spectrometry and protein
Isoelectric focusing	identification
Native PAGE assays	

Genome-wide analyses:

Chromatin immunoprecipitation (ChIP–chip) Transcriptome analysis

***In silico* analyses:**

Statistical analysis of promoter sequences Minimum free energy calculation and *in silico*
Protein sequence and domain analysis comparisons
BLAST sequence comparisons

9. Results and discussion

The first two papers explore the characteristics of the δ subunit of RNAP.

In Publication I, in collaboration with the Masaryk University, Brno, we solved the structure of the ordered N-terminal domain of δ subunit by nuclear magnetic resonance (NMR). NMR measurements were based on a truncated construct consisting of the N-terminal domain containing a His tag. The NTD contains four α -helices and an antiparallel β -sheet composed of three short β -strands at the top of a “twisted tripod” formed by the α -helices. I contributed by preparing the purified protein.

Publication II deals with the *in vitro* and *in vivo* properties of the δ protein from *B. subtilis*. This work proved that δ is a crucial component of the transcription machinery that allows the cell to survive in nature. In a series of experiments we demonstrated that δ enables RNAP to be sensitive to the concentration of the iNTP that is crucial for rapid changes in gene expression reflecting the nutrient availability. This also explains the decrease in fitness of the δ -mutant strain that is unable to survive in a changing environment under the pressure of a competing strain. Clearly, this subunit of RNAP is important for the cell’s survival in the real world. I contributed by optimization of *in vitro* methods for testing elongation complexes.

δ also plays one of the main roles in Publication III as we found its close relationship with HelD, a protein that I discovered to interact with RNAP from *B. subtilis*. I found HelD as a copurifying protein in RNAP preparations. However, at about the same time, a paper was published where a global approach was taken to identify RNAP binding partners and HelD was one of them (Delumeau et al., 2011). Nevertheless, we subsequently confirmed the interaction of HelD with RNAP by other approaches, identified the binding site of HelD on RNAP, and characterized *in vitro* and *in vivo* its function. We added another piece of puzzle of the transcription machinery when a strong functional link between HelD and δ was revealed.

HelD stimulates transcription *in vitro* in an ATP dependent manner and binds exclusively to the core form of the enzyme (without σ factor). This fact indicates that it does not affect initial steps of transcription. The stimulation on supercoiled templates is synergistically enhanced by δ subunit. Our work revealed that the two proteins promote more efficient cycling of RNAP. *In vivo*, we showed that absence of HelD prolongs the lag phase of growth similarly to the absence of δ . This phenotype affects the cells ability to adequately adapt to nutritional changes in the environment. This study (Publication III) represents the main published result of my Thesis and I performed 90 % of the experiments.

Many questions about HelD functioning have remained unanswered and we expect a substantial progress after analyzing the recently obtained transcriptomic data of HelD-null strain (Wiedermannová J., Sudzinová P., Rabatinová A., Delumeau O., Krásný L., unpublished).

Besides the regular subunits of RNAP and RNAP-associated proteins making strong and stable interactions with the enzyme, there are a lot of proteins and non-protein interacting partners that binds to RNAP only under very specific conditions. The fourth paper (Publication IV) focuses on the Spx transcription regulator that plays a key role in maintaining the redox homeostasis of *B. subtilis* cells exposed to disulfide stress. The main aim of this work was to identify genes directly regulated by Spx under disulfide stress by a genome-wide mapping of Spx-bound RNAP-binding sites.

By chromatin immunoprecipitation of SPA-tagged Spx followed by hybridization of the obtained DNA to tiling microarrays (ChIP-chip) our French collaborators (lab of P. Noirot, The French National Institute for agricultural research) mapped chromosomal sites bound by Spx-RNAP complex. This was done before and after a short exposure of *B. subtilis* cells to sublethal diamide stress (inducing the disulfide stress). These data were combined with results from transcriptome analysis in Spx-proficient and -deficient strains exposed to the same stress conditions. As a result we identified 144 transcription units (comprising 275 genes) under direct Spx control.

My part of the work was validation of selected Spx-activated promoters by *in vitro* transcription assay. I (together with A. Rabatinova with whom I shared the project) confirmed activation of seven newly identified promoters by oxidized Spx transcription factor. Interestingly, activation on one of the promoters (*yvgN*) did not require the oxidized form of Spx, and future experiments will be required to decipher the mechanism. In summary, this paper globally characterizes the Spx regulatory network.

The last paper of this thesis (Publication V) deals with a non-protein component of the transcription regulatory machinery - 6S RNA. This work was done in collaboration with J. Pánek from the Institute of Microbiology in Prague who spearheaded the biocomputational part. The publication solves problems with biocomputational identification and prediction of homologs of known ncRNAs in other species which often fails due to weakly evolutionarily conserved sequences, structures, synteny and genome localization. RNA structure appears to be the most conserved ncRNA property. The structure of 6S RNA was used as a model for creating a new computational procedure for the identification of homologous ncRNAs and it proved that unlike optimal (with the lowest free energy) and consensus structures, suboptimal structures are capable of better capturing RNA homology even in divergent bacterial species.

The developed algorithm was used to *in silico* identify 6S RNA in divergent bacterial species (*Streptomyces*, *Mycobacterium*) and expression of the obtained sequences of ncRNAs was verified experimentally. The 6S RNA in these species were previously neither identified, nor experimentally proven. In *Streptomyces*, one of the candidate sequences was found to be expressed and to interact with RNAP in a complex with the housekeeping σ factor, which is the hallmark of functional 6S RNA. For *Mycobacterium*, one of the predicted ncRNAs (Ms1) was highly expressed during all stationary phase but the interaction with RNAP in complex with the housekeeping σ factor was not detected, suggesting that Ms1 is not a genuine 6S RNA, but a novel type of ncRNA and it is a subject of ongoing research in our lab.

This paper demonstrates that from a biological point of view, suboptimal structures can be more natural than optimal ones and that this property can be successfully used to predict ncRNAs in evolutionary distant species not only in prokaryotes. I contributed to this work by experimentally verifying the expression of bioinformatically identified candidate ncRNAs in *M. smegmatis*.

10. Conclusions

Understanding the gene expression is one of the fundamental questions of cell biology. This process is highly conserved from humans to bacteria. Also the basic tool of gene expression, the DNA-dependent RNA polymerase, is structurally conserved. In bacteria, a single species of RNAP transcribes both stable ncRNA (i.e. tRNA and rRNA) and protein coding RNA (mRNA), unlike eukaryotic cells, which use 3 distinct RNAP species to transcribe different RNAs. Many prokaryotic proteins and processes have their counterparts in eukaryote ones. The versatility of bacterial RNAP together with the fast and easy cultivation predestined

bacteria to serve as a simplified model for revealing new interactions and relationships of the complex transcriptional net.

Since transcription is an essential process for every cell, understanding the key players is crucial for the development of novel antibacterial compounds. RNAP versatility is beneficial for research of basic principles of transcription however specifics and uniqueness of RNAP from different organisms can substantially aid to extend the possibilities for the design of novel species-specific anti-RNAP structures.

This Thesis structurally and functionally characterized several proteins typical for G+ bacteria (δ subunit of RNAP, HelD protein, Spx transcription regulator), improved a method for biocomputational searches of small ncRNAs, and coincidentally discovered a new type of highly expressed ncRNA in *Mycobacterium*. This work has advanced our understanding of RNAP as a hub where various types of signals converge and affect the transcriptional output.

Future research directions of our laboratory include analysis of recently obtained transcriptomic data of δ -null and HelD-null strains and we will focus on solving the 3D structure of HelD or its parts. We intend to study whether proteins analogous to HelD (e.g. PcrA) may substitute its function in the mutant strain.

11. Použitá literatura / References

Achberger, E.C., and Whiteley, H.R. (1981). The role of the delta peptide of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase in promoter selection. *J. Biol. Chem.* 256, 7424–7432.

Borukhov, S., Lee, J., and Laptenko, O. (2005). Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol. Microbiol.* 55, 1315–1324.

Campbell, E.A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M.L., and Darst, S.A. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell* 9, 527–539.

Campbell, E.A., Pavlova, O., Zenkin, N., Leon, F., Irschik, H., Jansen, R., Severinov, K., and Darst, S.A. (2005). Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *EMBO J.* 24, 674–682.

Carrasco, B., Fernández, S., Petit, M.A., and Alonso, J.C. (2001). Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effect of DeltahelD on DNA repair and homologous recombination. *J. Bacteriol.* 183, 5772–5777.

Cavanagh, A.T., Klocko, A.D., Liu, X., and Wassarman, K.M. (2008). Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma70. *Mol. Microbiol.* 67, 1242–1256.

- Cavanagh, A.T., Sperger, J.M., and Wassarman, K.M. (2012). Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic Acids Res.* *40*, 2234–2246.
- Condon, C., Squires, C., and Squires, C.L. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* *59*, 623–645.
- Cramer, P. (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *12*, 89–97.
- Delumeau, O., Lecointe, F., Muntel, J., Guillot, A., Guédon, E., Monnet, V., Hecker, M., Becher, D., Polard, P., and Noirot, P. (2011). The dynamic protein partnership of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *Proteomics* *11*, 2992–3001.
- Dobinson, K.F., and Spiegelman, G.B. (1987). Effect of the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase on initiation of RNA synthesis at two bacteriophage phi 29 promoters. *Biochemistry* *26*, 8206–8213.
- Doherty, G.P., Fogg, M.J., Wilkinson, A.J., and Lewis, P.J. (2010). Small subunits of RNA polymerase: localization, levels and implications for core enzyme composition. *Microbiology* *156*, 3532–3543.
- Ebright, R.H. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* *304*, 687–698.
- Epshtein, V., Dutta, D., Wade, J., and Nudler, E. (2010). An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature* *463*, 245–249.
- Gentry, D.R., and Burgess, R.R. (1989). *rpoZ*, encoding the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, is in the same operon as *spoT*. *J. Bacteriol.* *171*, 1271–1277.
- Gentry, D.R., and Burgess, R.R. (1993). Cross-linking of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. *Biochemistry* *32*, 11224–11227.
- Gildehaus, N., Neusser, T., Wurm, R., and Wagner, R. (2007). Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed *de novo* transcripts. *Nucleic Acids Res.* *35*, 1885–1896.
- Gourse, R.L., Ross, W., and Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* *37*, 687–695.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* *57*, 441–466.
- Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2004). Regulation of gene expression by effectors that bind to RNA. *Curr. Opin. Microbiol.* *7*, 126–131.

- Gunnelius, L., Hakkila, K., Kurkela, J., Wada, H., Tyystjärvi, E., and Tyystjärvi, T. (2014). The omega subunit of the RNA polymerase core directs transcription efficiency in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* gku084–.
- Haugen, S.P., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 507–519.
- Juang, Y.L., and Helmann, J.D. (1994). The delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. An allosteric effector of the initiation and core-recycling phases of transcription. *J. Mol. Biol.* 239, 1–14.
- Krásný, L., and Gourse, R.L. (2004). An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J.* 23, 4473–4483.
- Krásný, L., Tiserová, H., Jonák, J., Rejman, D., and Sanderová, H. (2008). The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 69, 42–54.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249–256.
- Lampe, M., Binnie, C., Schmidt, R., and Losick, R. (1988). Cloned gene encoding the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Gene* 67, 13–19.
- Lane, W.J., and Darst, S.A. (2010). Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis. *J. Mol. Biol.* 395, 671–685.
- Lewis, P.J., Doherty, G.P., and Clarke, J. (2008). Transcription factor dynamics. *Microbiology* 154, 1837–1844.
- López de Saro, F.J., Yoshikawa, N., and Helmann, J.D. (1999). Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 274, 15953–15958.
- Mathew, R., and Chatterji, D. (2006). The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol.* 14, 450–455.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebright, R.H., and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 892–897.
- Mooney, R.A., Darst, S.A., and Landick, R. (2005). Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* 20, 335–345.
- Mostertz, J., Hochgräfe, F., Jürgen, B., Schweder, T., and Hecker, M. (2008). The role of thioredoxin TrxA in *Bacillus subtilis*: a proteomics and transcriptomics approach. *Proteomics* 8, 2676–2690.

- Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O., and Darst, S.A. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* 296, 1285–1290.
- Murray, H.D., Schneider, D.A., and Gourse, R.L. (2003). Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. *Mol. Cell* 12, 125–134.
- Nakano, S., Nakano, M.M., Zhang, Y., Leelakriangsak, M., and Zuber, P. (2003). A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4233–4238.
- Neusser, T., Polen, T., Geissen, R., and Wagner, R. (2010). Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery. *BMC Genomics* 11, 165.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., et al. (2012). Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335, 1103–1106.
- Ogasawara, N. (2000). Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res. Microbiol.* 151, 129–134.
- Paul, B.J., Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D.A., Webb, C., Foster, J.W., and Gourse, R.L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* 118, 311–322.
- Pérez-Rueda, E., and Collado-Vides, J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28, 1838–1847.
- Pero, J., Nelson, J., and Fox, T.D. (1975). Highly asymmetric transcription by RNA polymerase containing phage-SP01-induced polypeptides and a new host protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1589–1593.
- Rabatinová, A., Šanderová, H., Jiráť Matějčková, J., Korelusová, J., Sojka, L., Barvík, I., Papoušková, V., Sklenář, V., Židek, L., and Krásný, L. (2013). The δ subunit of RNA polymerase is required for rapid changes in gene expression and competitive fitness of the cell. *J. Bacteriol.* 195, 2603–2611.
- Reyes, D.Y., and Zuber, P. (2008). Activation of transcription initiation by Spx: formation of transcription complex and identification of a Cis-acting element required for transcriptional activation. *Mol. Microbiol.* 69, 765–779.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R.L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407–1413.
- Rutherford, S.T., Lemke, J.J., Vrentas, C.E., Gaal, T., Ross, W., and Gourse, R.L. (2007). Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 366, 1243–1257.

- Severinov, K. (2000). RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 118–125.
- Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Völker, U., and Hecker, M. (1998). Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *180*, 1869–1877.
- Smits, W.K., Dubois, J.-Y.F., Bron, S., van Dijl, J.M., and Kuipers, O.P. (2005). Tricky business: transcriptome analysis reveals the involvement of thioredoxin A in redox homeostasis, oxidative stress, sulfur metabolism, and cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *187*, 3921–3930.
- Sojka, L., Kouba, T., Barvík, I., Sanderová, H., Maderová, Z., Jonák, J., and Krásny, L. (2011). Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* *39*, 4598–4611.
- Srivatsan, A., and Wang, J.D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 100–105.
- Sweetser, D., Nonet, M., and Young, R.A. (1987). Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 1192–1196.
- Tjian, R., Losick, R., Pero, J., and Hinnebusch, A. (1977). Purification and comparative properties of the delta and sigma subunits of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* *74*, 149–154.
- Toulmé, F., Mosrin-Huaman, C., Sparkowski, J., Das, A., Leng, M., and Rahmouni, A.R. (2000). GreA and GreB proteins revive backtracked RNA polymerase in vivo by promoting transcript trimming. *EMBO J.* *19*, 6853–6859.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2004). 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J. Bacteriol.* *186*, 4978–4985.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2005). A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 313–319.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* *417*, 712–719.
- Wassarman, K.M., and Saecker, R.M. (2006). Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* *314*, 1601–1603.
- Wassarman, K.M., and Storz, G. (2000). 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* *101*, 613–623.
- Wurm, R., Neusser, T., and Wagner, R. (2010). 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products. *Biol. Chem.* *391*, 187–196.

Yang, X., and Lewis, P.J. (2010). The interaction between bacterial transcription factors and RNA polymerase during the transition from initiation to elongation. *Transcription* 1, 66–69.

Yang, X., and Price, C.W. (1995). Streptolydigin resistance can be conferred by alterations to either the beta or beta' subunits of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 270, 23930–23933.

Yang, X., Molimau, S., Doherty, G.P., Johnston, E.B., Marles-Wright, J., Rothnagel, R., Hankamer, B., Lewis, R.J., and Lewis, P.J. (2009). The structure of bacterial RNA polymerase in complex with the essential transcription elongation factor NusA. *EMBO Rep.* 10, 997–1002.

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

Zuber, P. (2004). Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *J. Bacteriol.* 186, 1911–1918.

12. Strukturovaný životopis

Osobní údaje:

Jméno:	Mgr. Jana Wiedermannová
Příjmení za svobodna:	Korelusová
Narozena:	25.12. 1982 v Kladně
Stav:	vdaná
Bydliště:	Na Růžovém poli 2564, Kladno
Email:	jana.wiedermannova@biomed.cas.cz

Vzdělání:

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Od 2009 doktorské studium

obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Školitel: Mgr. Libor Krásný, PhD

Laboratoř molekulární genetiky bakterií, MBÚ AVČR

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta

2005 – 2008 magisterské studium

Školitel: RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D

Magisterská práce: Phylogeny of heterocystous cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales)

2002 – 2005 bakalářské studium

Školitel: RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D.

Bakalářská práce: Polyfázický přístup k fylogenezi vybraných sinic.

Zaměstnavatelé:

od 2008: Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha

2008: Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha

2008: Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

2007: Hydrobiologický ústav AV ČR, České Budějovice

2005 – 2006: Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Granty:

2011-2013: Grantová agentura University Karlovy (GAUK 425311), hlavní řešitel

Téma: Torpédový model terminace transkripce u bakterií

13. Curriculum vitae

Personal data:

Name:	Mgr. Jana Wiedermannová
Maiden surname:	Korelusová
Date and place of birth:	25.12. 1982, Kladno
Marital status:	married
Address:	Na Růžovém poli 2564, Kladno
Email:	jana.wiedermannova@biomed.cas.cz

Education:**Faculty of Science, Charles University in Prague**

From 2009 Ph.D. study program: Molecular and cell biology, genetics and virology

Supervisor: Mgr. Libor Krásný, PhD

Laboratory of Molecular Genetics of Bacteria, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice

2005 – 2008 Master's study program

Supervisor: RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D

Master's thesis: Phylogeny of heterocystous cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales)

2002 – 2005 Bachelor's study program

Supervisor: RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D.

Bachelor's thesis: Polyphasic approach to phylogeny of cyanobacteria.

Employers:

From 2008: Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

2008: Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic

2008: Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice

2007: Institute of Hydrobiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

2005 – 2006: Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice

Grants:

2011-2013: Science Foundation of Charles University (GAUK 425311)

Title: Torpedo model of transcription termination in Bacteria.

14. Seznam publikací / Publications

- I. Motáčková, V., Šanderová, H., Židek, L., Nováček, J., Padrta, P., Švenková, A., Korelusová, J., Jonák, J., Krásný, L., Sklenář V. (2010). Solution structure of the N-terminal domain of *Bacillus subtilis* δ subunit of RNA polymerase and its classification based on structural homologs. *Proteins* 78(7), 1807–1810. **IF 3.392**
- II. Rabatinová, A., Šanderová, H., Jirátková, J., Korelusová, J., Sojka, L., Barvík, I., Papoušková, V., Sklenář, V., Židek, L., Krásný, L. (2013). The δ subunit of RNA polymerase is required for rapid changes in gene expression and competitive fitness of the cell. *J. Bacteriol.* 195(11), 2603–2611. **IF 3.194**
- III. Wiedermannová, J., Sudzinová, P., Koval', T., Rabatinová, A., Šanderová, H., Ramaniuk, O., Rittich, Š., Dohnálek, J., Fu, Z., Halada, P., Lewis, P., Krásný, L. (2014). Characterization of HelD, an interacting partner of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*, doi: 10.1093/nar/gku113, in press. **IF 8.278**
- IV. Rochat, T., Nicolas, P., Delumeau, O., Rabatinová, A., Korelusová, J., Leduc, A., Bessières, P., Dervyn, E., Krásný, L., Noirot, P. (2012). Genome-wide identification of genes directly regulated by the pleiotropic transcription factor Spx in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 40(19), 9571–9583. **IF 8.278**
- V. Pánek, J., Krásný, L., Bobek, J., Ježkov, E., Korelusová, J., Vohradský, J. (2011). The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures. *Nucleic Acids Res.* 39(8), 3418–3426. **IF 8.278**

Publikace nesouvisející s tématem disertace /Authors publications not related to the topic of the thesis:

- VI. Zapomělová E., Hisem D., Řeháková K., Hrouzek P., Jezberová J., Komárková J., Korelusová J., Znachor P. Experimental comparison of phenotypical plasticity and growth demands of two strains from the *Anabaena circinalis/A. crassa* complex (cyanobacteria). *Journal of Plankton Research.* 2008. 30(11): 1257-1269. **IF 2.44**
- VII. Korelusová J., Kaštovský J., Komárek J. Heterogeneity of the cyanobacterial genus *Synechocystis* and description of a new genus, *Geminocystis*. *Journal of Phycology.* 2009. 45(4): 928-937. **IF 2.24**