

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Debora Kálalová

Doména 1.1 primárního faktoru sigma a nový systém pro expresi RNA polymerázy z *Bacillus subtilis*
Domain 1.1 of the primary sigma factor and a new expression system for *Bacillus subtilis* RNA polymerase

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Liborovi Krásnému, Ph.D. a RNDr. Haně Šanderové, Ph.D. za jejich odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovali. Dále chci poděkovat ostatním členům Laboratoře mikrobiální genetiky a genové exprese a mé rodině za jejich vstřícnou pomoc a podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu. Tuto práci ani její část jsem nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Abstrakt

RNA polymeráza (RNAP) je klíčový vícepodjednotkový enzym genové exprese, který spolu s faktorem σ tvoří holoenzym a zajišťuje přepis genetické informace z DNA do RNA. V této práci byla studována RNAP z *Bacillus subtilis* a její primární faktor σ^A . Faktor σ^A určuje specifitu pro promotory, na které holoenzym nasedá. Součástí jeho struktury je doména 1.1, která pravděpodobně vazbou na domény 2 a 4 zabraňuje vazbě samotné σ^A na promotor, pokud není součástí holoenzymu.

První část práce ověřuje hypotézu, zda doména 1.1 váže domény 2 a 4 a brání tak vazbě samotné σ^A na promotor. Za tímto účelem byly vytvořeny různé doménové konstrukty, u kterých byly testovány vzájemné interakce. Interakce domén byla testována metodami Nitrocellulose filter binding assay, EMSA a transkripcí *in vitro*. Výsledky neprokázaly významnou interakci mezi doménami.

Druhá část práce se věnuje vytvoření nástroje pro studium enzymologie RNAP z *B. subtilis* – rekombinantní RNAP (rRNAP). Nejprve byl řadou klonovacích kroků vytvořen plazmidový konstrukt pro expresi rRNAP v *Escherichia coli*, následně byl protein izolován a charakterizován. Izolace se podařila bez kontaminace faktory σ (tato kontaminace je častá při izolaci RNAP z *B. subtilis*). Byla však zjištěna přítomnost ATP (nikoli GTP) a vazba této molekuly by mohla mít biologickou relevanci pro aktivitu enzymu. Po izolaci byla demonstrována enzymatická aktivita izolované rRNAP.

Shrnutí, hlavním výsledkem této diplomové práce je vytvoření nového, vysoce účinného nástroje pro studium RNAP z modelové půdní bakterie *B. subtilis*.

Klíčová slova: RNAP, sigma faktor, interakce, funkce, expresní systém

Abstract

RNA polymerase (RNAP) is a key multi-subunit enzyme of gene expression that, together with the σ factor, forms a holoenzyme and transcribes genetic information from DNA to RNA. RNAP from *Bacillus subtilis* and its primary factor σ^A were studied in this thesis. The σ^A factor determines the specificity for the promoters to which the holoenzyme binds. Part of its structure is domain 1.1, which is likely to prevent binding of σ^A to the promoter by itself (unless it is part of the holoenzyme) by binding to domains 2 and 4.

The first part of the thesis verifies the hypothesis that domain 1.1 binds domains 2 and 4 and thus prevents binding of σ^A to the promoter. To this end, various domain constructs have been created and their interactions have been tested. Domain interaction was tested by Nitrocellulose Filter Binding Assay, EMSA, and in vitro transcription. The results did not show significant interaction between domains.

The second part of the thesis deals with the creation of a tool for the study of the enzymatology of RNAP from *B. subtilis* - recombinant RNAP (rRNAP). First, a plasmid construct for expression of rRNAP in *Escherichia coli* was constructed by a series of cloning steps, followed by protein isolation and characterization. Isolation was achieved without contamination by σ factors (this contamination is common during isolation of RNAP from *B. subtilis*). However, the presence of ATP (not GTP) was detected and the binding of this molecule could have biological relevance to the enzyme activity. After isolation, the enzymatic activity of the isolated rRNAP was demonstrated.

In summary, the main outcome of this thesis is the creation of a new, highly effective tool for the study of RNAP from a model soil bacterium *B. subtilis*.

Keywords: RNAP, sigma factor, interaction, function, expression system

Obsah

Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract	5
Keywords	5
Seznam zkratk	7
1 Úvod	8
2 Literární přehled	9
2.1 Bakteriální transkripce	9
2.1.1 RNA polymeráza	9
2.1.2 Promotor.....	12
2.1.3 Faktor σ	15
2.1.3.1 Skupina σ^{70}	15
2.1.3.1.1 Třída 1.....	17
2.1.3.1.2 Třída 2.....	19
2.1.3.1.3 Třída 3.....	20
2.1.3.1.4 Třída 4.....	20
2.1.3.2 Skupina σ^{54}	21
2.1.4 Transkripce	23
2.1.4.1 Iniciační fáze transkripce.....	23
2.1.4.2 Elongační fáze transkripce.....	24
2.1.4.3 Terminační fáze transkripce.....	25
2.2 Systémy pro izolaci RNAP z bakterií.....	25
3 Cíle práce.....	27
3.1 Klonovat a purifikovat doménové konstrukty faktoru σ^A a ověřit funkci autoinhibiční domény 1.1.....	27
3.2 Klonovat a purifikovat rRNAP z <i>B. subtilis</i> a otestovat její funkci a vlastnosti.....	27
4 Materiály a metody.....	28
4.1 Enzymy, chemikálie, média	28
4.1.1 Použité chemikálie a enzymy	28
4.1.2 Kultivační média.....	29
4.2 Přístroje.....	30
4.2.1 Třepačky a termostaty	30
4.2.2 Elektroforézy	31
4.2.3 Zdroje napětí	32

4.2.4 Centrifugy.....	32
4.2.5 Další přístroje	33
4.3 Vektory.....	35
4.5 Práce s mikroorganismy	39
4.5.1 Kultivace bakterií	39
4.5.2 Tvorba glycerinové konzervy	40
4.6 Práce s DNA	40
4.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	40
4.6.2 Horizontální agarová elektroforéza	41
4.6.3 Izolace DNA z gelu	42
4.6.4 Štěpení	43
4.6.5 Defosforylace plazmidů.....	44
4.6.6 Ligace	45
4.6.7 Transformace <i>do E. coli</i>	45
4.6.8 Miniprep – izolace plazmidové DNA	46
4.6.9 Midiprep – Izolace plazmidové DNA	47
4.7 Práce s proteiny	49
4.7.1 Indukce exprese proteinů.....	49
4.7.2 Izolace proteinů metodou afinitní chromatografie.....	49
4.7.3 SDS polyakrylamidová elektroforéza.....	50
4.7.4 Barvení gelu za pomoci SimplyBlue™ SafeStain.....	51
4.7.5 Dialýza	51
4.7.6 Gelová chromatografie.....	52
4.7.7 Změření koncentrace proteinů	52
4.8 Transkripce <i>in vitro</i>	52
4.8.1 Transkripce	52
4.8.2 Vertikální PAA elektroforéza	54
4.8.3 EMSA (electrophoretic mobility shift assay).....	55
4.8.4 Nitrocellulose filter binding assay.....	56
4.8.4.1 Radioaktivní značení promotorů.....	56
4.8.4.2 Přečištění promotorů.....	56
4.8.4.3 Nitrocellulose filter binding assay.....	57
5 Výsledky.....	59

5.1 Příprava konstruktů faktoru σ^A a test jejich vzájemné vazby.....	59
5.1.1 Klonování a purifikace konstruktů faktoru σ^A z <i>B. subtilis</i>	59
5.1.2 Příprava promotorových sekvencí P_{veg} a <i>rrnBP1</i> z <i>B. subtilis</i> pro Nitrocellulose filter binding assay.....	63
5.1.3 Test vazby domény 1.1 na doménový konstrukt domén 2 a 4 metodou Nitrocellulose filter binding assay.....	64
5.1.5 Transkripce <i>in vitro</i> za použití konstruktů faktoru σ^A	66
5.2 Příprava rRNAP z <i>B. subtilis</i> v <i>E. coli</i>	66
6 Diskuze.....	75
6.1 Doménové konstrukty faktoru σ^A	75
6.1.1 Izolace doménových konstruktů faktoru σ^A	75
6.1.2 Testování funkce autoinhibiční domény 1.1 za použití metody Nitrocellulose filter binding assay a transkripce <i>in vitro</i>	75
6.2 Expresní systém pro izolaci rRNAP z <i>B. subtilis</i>	77
6.2.1 Izolace rRNAP z <i>B. subtilis</i> exprimované v <i>E. coli</i>	77
6.2.2 Test funkce a vlastností rRNAP pomocí transkripce <i>in vitro</i>	78
7 Souhrn.....	80
7 Použitá literatura.....	81

Seznam zkratek

- AK – aminokyseliny
- Asp – kyselina asparagová
- BSA – hovězí sérový albumin
- dH₂O – destilovaná voda
- ECF – faktory s extracytoplasmatickou funkcí
- Glu – kyselina glutamová
- His-tag – histidinová kotva
- iH₂O – injekční voda
- iNTP – iniciační nukleosidtrifosfát
- NTP – nukleosidtrifosfát
- OD – optická denzita
- PAA – polyakrylamid
- PAGE – polyakrylamidová elektroforéza
- pb – pár bází
- (p)ppGpp – guanosin tetrafosfát
- RE – restrikční enzym
- RNAP – RNA polymeráza
- RP_c – uzavřený komplex promotoru a RNAP
- RP_{init} – raný elongační komplex
- RP_o – otevřený komplex promotoru a RNAP
- rRNAP – rekombinantní RNAP z *B. subtilis* exprimovaná v *E. coli*
- SDS – dodecylsírán sodný
- Shine-Dalgarnova sekvence – SD sekvence
- UP element – *upstream* element
- Wt – divoký kmen

Úvod

Enzym RNAP a faktor σ zajišťují jak chod transkripce, tak její specifitu. Každý faktor σ rozpoznává svou specifickou sadu promotorů (Paget, 2015). Tento systém poskytuje bakterii účinnou a rychlou regulaci transkripce, která buňkám pomáhá efektivně reagovat na rozličné životní podmínky. Tato diplomová práce je zaměřena na *B. subtilis*, jeho RNAP a primární faktor σ^A .

Doména 1.1 faktoru σ^A má autoinhibiční funkci, kdy pravděpodobně vazbou na domény 2 a 4 zabraňuje vazbě na promotor, pokud faktor σ není navázán na RNAP (Schwartz et al. 2008). Prvním cílem bylo získat podrobnější vhled do interakce domény 1.1 s ostatními doménami. Byly nejprve studovány vlastnosti samostatných doménových konstruktů a jejich interakce s autoinhibiční doménou 1.1. Pomocí několika metod byla následně testována vazba těchto konstruktů na promotorovou sekvenci DNA. Nakonec byla studována interakce doménových konstruktů s RNAP pomocí transkripce *in vitro*.

Druhá část této diplomové práce byla zaměřena na tvorbu konstruktů pro následnou izolaci a purifikaci klonované rRNAP z *B. subtilis*. Takovéto konstrukty již byly v literatuře popsány, ale proteinové výtěžky z těchto systémů byly velmi nízké, takže nebyly vhodné pro biochemické experimenty (Yang & Lewis 2008). Byl třeba zcela nový, efektivní systém pro izolaci a purifikaci rRNAP z *B. subtilis* pro testování vlastností tohoto enzymu. Byl proto naklonován konstrukt podjednotek rRNAP, který byl exprimován v *E. coli* a rRNAP následně izolována pomocí histidinové kotvy. Metodou *multiple round* transkripce *in vitro* byla ověřena funkčnost a vlastnosti rRNAP. Bylo sledováno, jak rRNAP funguje v transkripci samostatně a jak funguje po rekonstiuaci s faktorem σ^A .

2 Literární přehled

2.1 Bakteriální transkripce

Transkripce je proces, při němž dochází v buňce k přepisu DNA do RNA, a to na základě komplementarity bazí. Jedná se o první fázi genové exprese, tedy cesty od informace zapsané v DNA k funkčnímu proteinu. Za transkripci je zodpovědný enzym RNAP. Tento proces přepisu genetické informace je dělen na tři fáze. Přepis začíná iniciační fází, následují elongační a terminační fáze.

V následujících kapitolách blíže popíši klíčový enzym RNAP, bakteriální promotor, faktory σ a samotný průběh transkripce.

2.1.1 RNA polymeráza

U bakterií se nachází pouze jeden druh RNAP, která byla popsána v 70. letech 20. století (Hurwitz, 2005). U eukaryotických buněk se nachází celkem tři typy RNAP. Všechny eukaryotické RNAP obsahují 12 a více podjednotek a dosahují hmotnosti přesahující 500 kDa (Severinov, 2000).

Bakteriální RNAP je enzym veliký přibližně 400 kDa a obsahuje čtyři základní podjednotky. Podjednotku α , která se nalézá v enzymu jako jediná ve formě dimeru, β , β' a ω (Borukhov & Nudler, 2008). Poprvé byla struktura bakteriální RNAP charakterizována u *Thermus aquaticus* (Zhang et al., 1999).

Složení jádra RNAP probíhá mechanismem samouspořádání. Nejprve se vytvoří dimer podjednotek α , které vytvoří lešení. Na toto lešení se poté můžou navázat podjednotky β a β' . Podjednotka ω napomáhá β' při navazování na $\alpha_2\beta$ (Haugen et al., 2008). Podjednotky RNAP postupně sestavují charakteristický tvar, který připomíná krabí klepeto. Tvar je ohraničen podjednotkami β a β' , které mezi sebou mají kanál široký 2,7 nm a uvnitř tohoto kanálu najdeme místo obsahující ionty Mg^{2+} (aktivní místo RNAP), kde dochází k syntéze nového vlákna RNA (Obrázek 1). Podjednotky dohromady tvoří takzvané jádro RNAP (Murakami & Darst, 2003, Zhang et al., 1999).

Dále budou popsány jednotlivé podjednotky RNAP. Vlastnosti podjednotek budou popsány u dobře prozkoumané *E. coli*.

Důležitou roli má podjednotka α , která je kódovaná genem *rpoA* (Burgess, 1969). Molekulová hmotnost podjednotky je přibližně 35 kDa. Obsahuje N–koncovou a C–koncovou doménu. Domény jsou mezi sebou propojeny pohyblivým linkerem. Větší N–koncová doména napomáhá dimerizaci podjednotek α a jejich kontaktu s podjednotkami β a β' , které tak drží pohromadě (Hayward et al., 1991). Naproti tomu o něco menší C–koncová doména zesiluje iniciaci transkripce kontaktem s tzv. *upstream* elementem (UP element) (Zhang et al., 1998, Wang, 1997).

Podjednotky β a β' jsou největšími podjednotkami enzymu. Tyto podjednotky jsou kódovány geny *rpoB* a *rpoC* a molekulovou hmotnost mají přibližně 134 kDa. Obě tyto podjednotky jsou sekvenčně vysoce konzervovány (Paget, 2015). Podjednotku β tvoří 9 konzervovaných částí (A až I) a podjednotku β' vytváří 8 konzervovaných částí (A až H). Mezi těmito specifickými částmi se nachází nekonzervované, velmi variabilní oblasti (Morse et al., 2002).

Na podjednotku β' se váže nejmenší podjednotka jádra RNAP, podjednotka ω (Murakami, 2015). Podjednotka ω dosahuje délky přibližně 90 AA a její molekulová hmotnost je přibližně 8 kDa. Je kódována genem *rpoZ*, leží ve stejném operonu jako gen pro *spoT*, což je enzym ovlivňující koncentraci alarmonu ppGpp (guanosin tetrafosfát) v buňce (Vrentas et al., 2008). Zatím se spekuluje o jejím vlivu na transkripci. Jako podjednotka není esenciální, ví se nicméně o několika funkcích, které napomáhají transkripci. Hraje roli v transkripční regulaci alarmonem (p)ppGpp při stringentní odpovědi. Role při regulaci transkripce byla zatím prozkoumána pouze v pokusech *in vitro* (Vrentas et al. 2008). Dále pak napomáhá při sbalování podjednotek RNAP a zvyšuje její stabilitu za zvýšených teplot (Ghosh et al., 2003).

Některé bakterie mají kromě těchto základních podjednotek podjednotky další. Bakterie *Bacillus subtilis*, která patří mezi grampozitivní bakterie skupiny *Firmicutes*, má navíc podjednotky δ a ϵ . Podjednotka δ , která má velikost kolem 20 kDa, je kódována genem *rpoE* a reguluje iniciaci transkripce. Právě tato podjednotka totiž ovlivňuje senzitivitu RNAP ke koncentračním změnám iniciačního nukleosidtrifosfátu (iNTP) snižováním stability otevřeného komplexu. Tím zvyšuje schopnost bakterií přizpůsobit se prostředí (Rabatinová et al., 2013). Mimo tuto funkci také

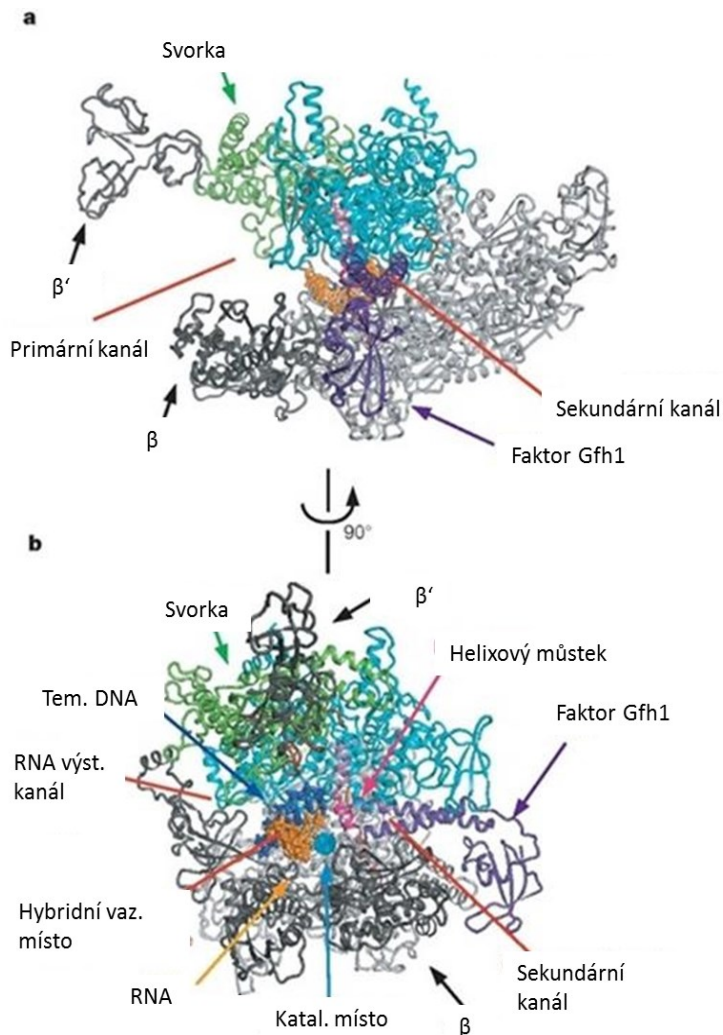
přispívá k prevenci vazby RNAP na nespecifickou DNA. Také se uplatňuje při uvolňování RNAP během terminační fáze transkripce (Weiss & Shaw, 2015, Juang & Helmann, 1994). Podjednotku ϵ , která má molekulovou hmotnost přibližně 8 kDa, kóduje gen *rpoY*. O funkci této podjednotky není mnoho známo. Jelikož se gen *rpoY* nachází ve stejném operonu jako RNÁza J1, existuje hypotéza, že by podjednotka mohla mít funkci, stejně jako RNÁza J1, v posttranskripční regulaci a úpravách RNA (Linder et al., 2014). Existuje hypotéza, že podjednotka ϵ může přispívat k vyšší odolnosti bakterie vůči bakteriofágům tím, že brání vazbě fágových proteinů na RNAP (Keller et al., 2014).

Jádro RNAP (α_2 , β , β' , ω) nedokáže samo rozpoznat specifickou sekvenci promotoru, na kterou se má navázat. V tom napomáhá nezávislý faktor σ , který se k RNAP připojí a vytvoří tak spolu holoenzym, který je schopný nasednout na specifickou promotorovou DNA. Faktory σ , které přepisují esenciální geny bakterie, se nazývají primární faktory, nebo také *housekeeping* faktory. *B. subtilis* má primární faktor σ^A , u *E. coli* se tento primární faktor nazývá σ^{70} (název vznikl na základě molekulové hmotnosti tohoto faktoru, která je 70 kDa). Kromě primárních faktorů nalezneme v buňce také alternativní faktory σ , které rozeznávají promotory pro geny se specifickými funkcemi vhodnými pro danou situaci. Fungují ve chvíli, kdy je bakterie ve stresu, či potřebuje reagovat na určitý signál z prostředí. Faktory σ nenajdeme u eukaryotických buněk, tam napomáhají specifikovat promotor pro danou RNAP transkripční faktory.

RNAP obsahuje tři kanály (Obrázek 1), které vedou mezi podjednotkami enzymu. Funkcí primárního kanálu je vázat hybrid DNA:RNA. Do sekundárního kanálu přichází substrát pro RNAP (NTP) a je tudíž směřován do aktivního místa enzymu s Mg^{2+} ionty. Jako třetí zde nalezneme RNA výstupní kanál, kterým vychází nově syntetizované vlákno RNA (Borukhov et al., 2005). Na obrázku je RNAP zobrazena s faktorem Gfh1, který svou vazbou inhibuje iniciaci transkripce (Tagami et al., 2010) a s helixovým můstkem, který prostorově blokuje aktivní místo RNAP při pozastavení transkripce (Weixlbaumer et al., 2013).

Strukturu 3D bakteriální RNAP se nejprve podařilo získat u *Thermus aquaticus* (Zhang et al., 1999) a *Thermus thermophilus* (Obrázek 1) (Tagami et al., 2010), poté u *E. coli* (Murakami 2013).

Modelový organismus, na který se zaměřuji, *Bacillus subtilis*, má zatím pouze navržený homologní model struktury RNAP, jelikož se zatím nepodařilo získat krystalovou strukturu tohoto enzymu. Funkce RNAP není řízena pouze popsány podjednotkami, ale ovlivňuje ji také spousta dalších faktorů. Může být ovlivněna např. nekódující RNA, transkripčními faktory, roli však mohou mít i malé molekuly jako (p)ppGpp (Srivatsan et al., 2008).



Obrázek 1: Struktura RNAP u *Thermus thermophilus* – elongační komplex

Struktura elongačního komplexu RNAP a navázaného faktoru Gfh1.

Barevné označení:

RNA – oranžová

DNA (templát) – modrá

Faktor Gfh1 – fialová

Svorka – zelená

Helixový můstek – růžová

Zbylé domény – šedivá

a) Zobrazení primárního a sekundárního kanálu.

b) Zobrazení sekundárního kanálu RNA výstupního kanálu. Obrázek upraven z (Tagami et al., 2010).

2.1.2 Promotor

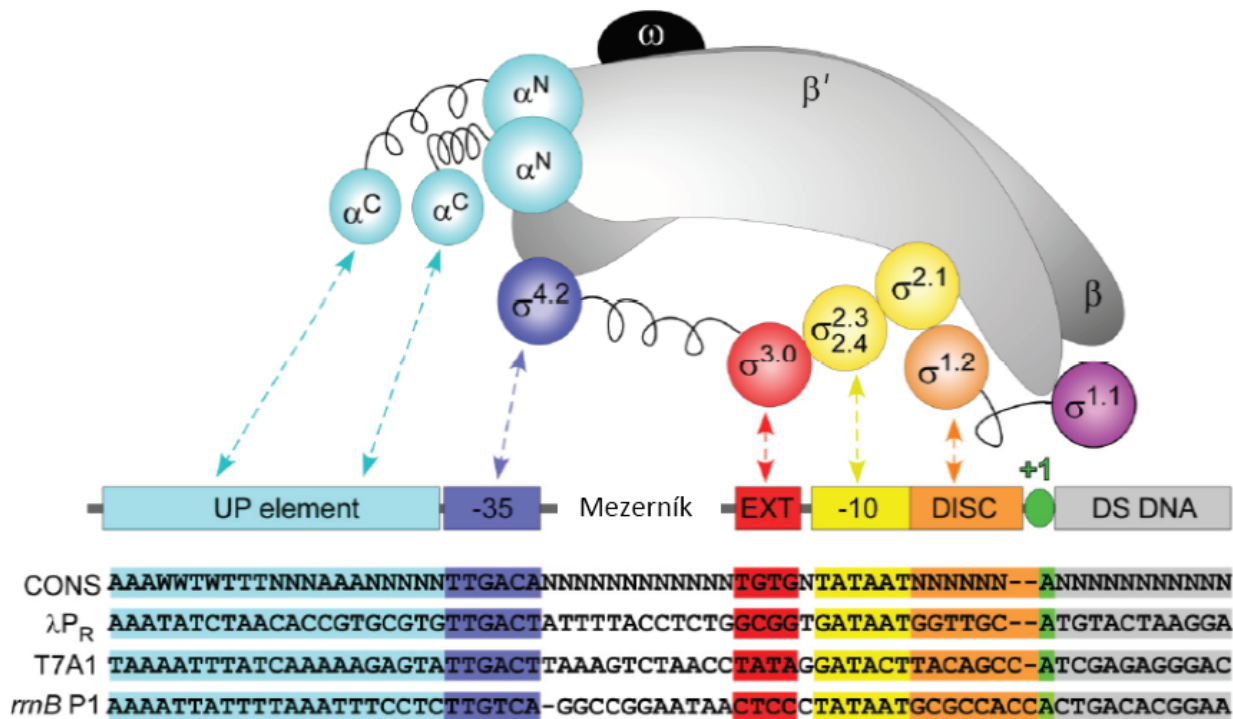
Bakteriální promotor je specifický úsek DNA, který se nachází před samotnou sekvencí genu, leží takzvaně *upstream*, neboli proti směru transkripce od daného genu. Promotor tvoří dvě hlavní oblasti rozeznávané faktory σ (tato stavba promotoru neplatí u faktorů rodiny σ^{54}), a to oblast -10

a -35 (Obrázek 2). Názvy oblastí vyplývají z jejich pozice vůči počátku transkripce v pozici +1. Často se na promotoru můžou vyskytovat také UP element, prodloužená oblast -10 a diskriminátor (Keiltys & Rosenberg, 1987).

Sekvence promotorových oblastí určuje sílu vazby holoenzymu. Každý faktor σ má určitou sekvenci DNA, takzvanou konsensus sekvenci, na kterou se nejsilněji váže (Chen & Helmann, 1995). Ne vždy však faktory σ vyžadují přesnou konsensus sekvenci pro silné navázání. U alternativních faktorů σ se zjistilo, že tolerují odchylky v sekvenci promotoru, aniž by byla ovlivněna jejich vazba na promotor (Österberg et al., 2011). U *E. coli* bylo objeveno, že před promotorovou sekvencí leží UP element, což je oblast bohatá na AT páry. Nachází se mezi pozicemi -60 a -40. Délka UP elementu je cca 20 pb. Tato oblast zajišťuje interakci s C-koncovými doménami (CTD) podjednotek α RNAP (Haugen et al., 2008). Svou vazbou podjednotka α zvyšuje sílu vazby mezi RNAP a promotorem a pomáhá při vazbě správného promotoru. Může také vázat některé transkripční faktory (Ishihama, 1992).

Sekvenci -35 tvoří hexamer s konzervovanou sekvencí DNA 5'-TTGACA-3' a leží v pozici mezi -35 a -30. Po směru transkripce poté následuje DNA oblast, která se nazývá mezerník (nebo také *spacer*). Sekvence mezerníku je dlouhá 17 – 19 pb a leží mezi oblastmi -35 a -10 (Ruff et al., 2015). Za spacerem po směru transkripce se může v některých případech nacházet prodloužená oblast -10 (neboli také *extended -10*). Jsou to pouze 4 bp před sekvencí -10, které mají uprostřed konzervovanou sekvenci dvou bází 5'-TG-3' (Barne et al., 1997). Oblast -10 je stejně jako oblast -35 hexamer a má sekvenci 5'-TATAAT-3', která se nachází v pozici -12 až -7 (Haugen et al., 2008).

Na oblast -10 navazuje sekvence 5–9 pb vedoucí k pozici +1. Pokud je tato oblast bohatá na GC páry, nazývá se diskriminátor. Diskriminátor má vliv na stabilitu vazby mezi RNAP a promotorovou DNA (díky regulaci stability otevřeného komplexu). Regulace je nejvíc znatelná u promotorů pro geny pro RNA, ty mají slabou vazbu s oblastí 1.2 faktoru σ , což způsobuje nestabilitu otevřeného komplexu (Haugen et al., 2006). Promotorová sekvence a vazebná místa pro faktor σ jsou znázorněny na obrázku 2.



Obrázek 2: Holoenzym RNAP a jeho vazba na promotor u *E. coli*

CONS – optimální konsensus sekvence. Níže jsou uvedeny sekvence tří dalších promotorů.

Barevné značení: UP element – modrá, sekvence -35 – fialová, prodloužená oblast -10 (označena EXT) – červená, oblast -10 – žlutá, diskriminátor – oranžová, transkripční počátek (pozice +1) – zelená, transkribovaná oblast – šedivá. Shodnými barvami jsou znázorněny domény faktoru σ^{70} , které s promotorovými oblastmi interagují. Obrázek upraven z (Ruff et al., 2015).

Na obrázku 2 jsou zobrazeny vazby holoenzymu RNAP a promotorem. Oblast 4.2 podjednotky σ se váže na promotorovou oblast -35, dále můžeme vidět, že sekvence -10 váže oblasti 2.3 a 2.4 podjednotky σ . Diskriminátor se váže na oblast 1.2. faktoru σ . Může také docházet k interakcím mezi UP elementem a C-koncovými doménami podjednotky α a k interakci mezi prodlouženou sekvencí -10 (pokud je přítomna) a oblastí 3 na faktoru σ (Ruff et al., 2015).

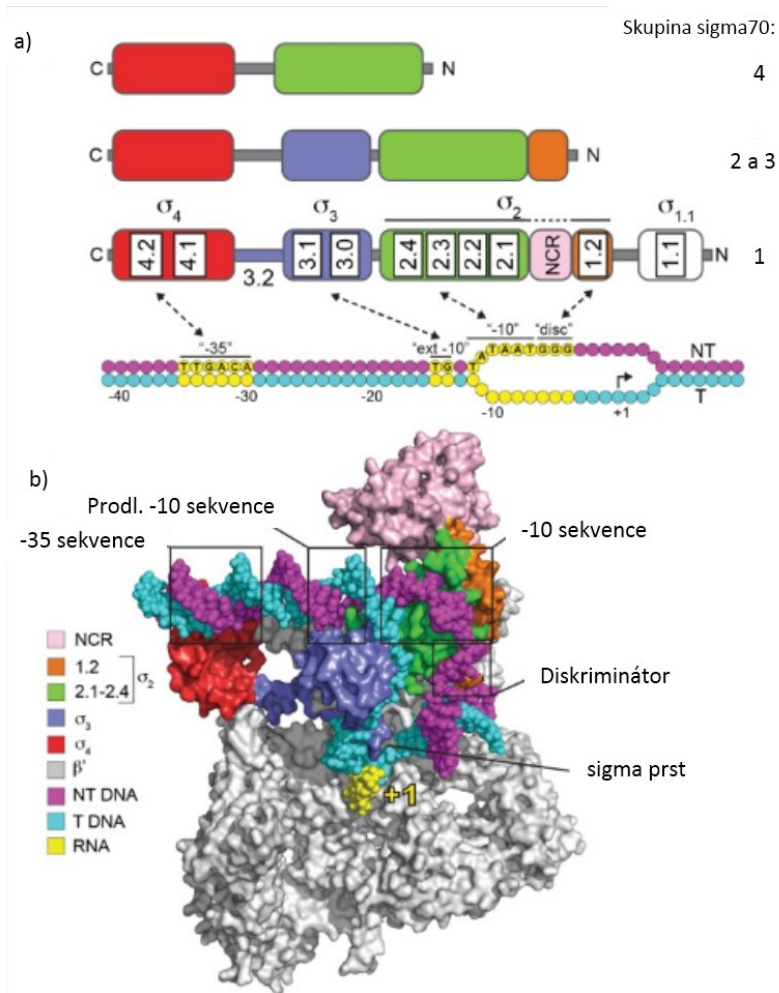
2.1.3 Faktor σ

Faktory σ se dělí do dvou velkých rodin σ^{70} a σ^{54} . Své pojmenování převzaly od dvou nejvíce známých faktorů σ u *E. coli* (pojmenováno podle molekulové hmotnosti těchto faktorů). Většinu faktorů σ řadíme do rodiny σ^{70} , v této skupině můžeme najít jak faktory primární, tak alternativní. Naproti tomu rodina faktorů σ^{54} obstarává reakci organismu pouze na specifické podmínky, nezajišťuje expresi esenciálních genů. Počet faktorů σ je rozdílný v závislosti na daném organismu. Tento počet závisí na prostředí organismu, na jeho metabolismu a dalších faktorech. Například *B. subtilis* má těchto faktorů dohromady 18, *E. coli* jich obsahuje 7, *Mycoplasma genitalium* 1 a *Streptomyces coelicolor* jich má velmi vysoký počet, celkem 63 (Bentley et al., 2002).

Faktor σ funguje jako podjednotka RNAP, díky které holoenzym váže specifickou sekvenci promotoru, ovlivňuje stabilitu otevřeného komplexu a začátek transkripce. Samotný faktor σ , stejně jako RNAP, nemůže specificky vázat promotor. Pokud není spolu s RNAP ve formě holoenzymu, je v neaktivní konformaci a neschopný vázat DNA. Avšak ukazuje se, že slabá vazba vznikat může (Yeh et al., 2011). Důkazem jsou některé alternativní faktory σ a jejich vazba na promotor bez RNAP. Faktor σ může také interagovat s transkripčními aktivátory (Severinov, 2000, Saecker et al., 2011).

2.1.3.1 Skupina σ^{70}

Faktory ve skupině σ^{70} se dělí celkem na čtyři třídy. Tyto třídy se mezi sebou liší počtem domén, které se liší sekvencí a funkcí (Obrázek 3). U faktorů σ nalezneme maximálně čtyři domény, a to doménu 1.1 (oblast 1.1), doménu 2 (oblast 1.2 – 2.4), doménu 3 (3.0 – 3.2.), a doménu 4 (oblast 4.1. – 4.2.) (Campbell et al., 2002).



Obrázek 3:

(a) Doménová struktura skupiny σ^{70} , rozdíly mezi jednotlivými třídami a znázornění vazby na promotor

Doménová struktura jednotlivých tříd σ^{70} , níže se nachází promotorová sekvence regulovaná faktorem σ^{70} u *E. coli*. Přerušované šipky znázorňují vazbu na promotor. Barevné označení: Doména 1.1 – bílá, doména 2 – zelená, oblast 1.2 – oranžová, doména 3 – modrá, doména 4 – červená, Nekonzervovaná sekvence (NCR) – růžová, Netemplátová DNA – fialová, templátová DNA – tyrkysová, diskriminátor, sekvence –10, prodloužená –10 a sekvence –35 – žlutá

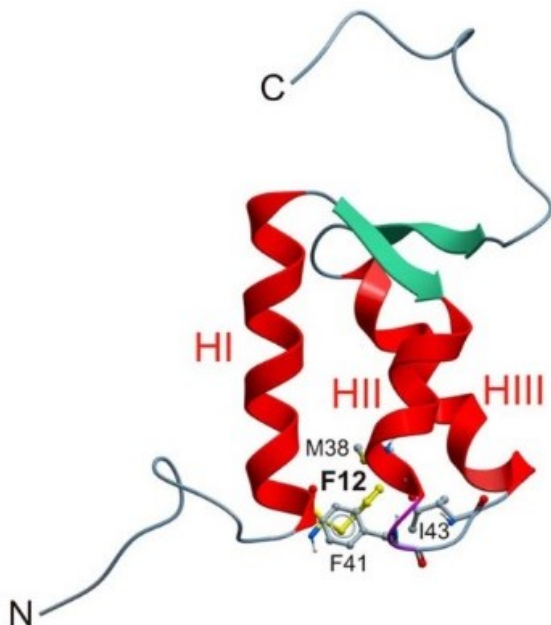
(b) RNAP s navázanou σ^{70} u *E. coli* – iniciační komplex

Domény σ^{70} a jsou značeny stejnými barvami jako část (a), ale promotorové sekvence nemají žlutou barvu. Tuto barvu má nově syntetizované vlákno RNA. Obrázek upraven z (Paget, 2015).

2.1.3.1.1 Třída 1

Pouze třída 1 (σ_1) zahrnuje faktory σ , které obsahují všechny čtyři domény, mezi kterými jsou variabilní spoje. Do této třídy patří primární faktory σ , konkrétně σ^{70} u *E. coli* a σ^A u *B. subtilis*. Spouští transkripci na většině promotorů u exponenciálního růstu, když nejsou přítomny žádné specifické podmínky či ohrožení.

Do dalších tříd (σ_2 , σ_3 a σ_4) jsou řazeny alternativní faktory σ , ty bakterie využívá pouze za určitých okolností, kdy je potřeba přizpůsobit se změně prostředí či životnímu stádiu, kompetici a dalším faktorům. Faktory těchto tříd neobsahují tzv. autoinhibiční oblast 1.1. Doména 1.1 funguje jako autoinhibiční doména a její struktura je složena z negativně nabitých α -helixů (Obrázek 4). Na rozdíl od dalších domén se jako jediná nachází pouze u faktorů σ třídy 1. Díky funkci této autoinhibiční oblasti se faktor σ neváže na DNA, pokud není současně vázán na RNAP, se kterou tvoří funkční holoenzym. Inhibice funguje takovým způsobem, že se doména 1.1 naváže na zbylé domény enzymu, pravděpodobně na domény 2 a 4, a vytvoří tak neaktivní konformaci (Schwartz et al., 2008)



Obrázek 4: Struktura domény 1.1 faktoru σ^A z *B. subtilis*

Na obrázku je znázorněna struktura domény 1.1 σ^A , HI – HIII označují tři α -helixy (Zachrdla et al., 2017).

Díky studii na bakterii *Thermotoga maritima* bylo objasněno, že jakmile faktor σ není vázán na RNAP, tvoří kompaktní konformaci, přičemž doména 1.1 se nachází v blízkosti domén 2 a 4. Předpokládá se, že se mezi doménami jedná o elektrostatické interakce, nicméně důkaz fyzické vazby domén stále chybí (Schwartz et al. 2008). Jakmile faktor σ naváže jádro RNAP a vytvoří tak holoenzym, odkryjí se vazebná místa pro promotor na doménách 2, 3 a 4. Poté dojde k nasednutí holoenzymu na specifický promotor (Murakami et al., 2002), (Vassilyev et al., 2002). Doména 1.1 má však kromě autoinhibiční funkce také velký vliv na vznik otevřeného komplexu (takzvané izomerizaci) a ovlivňuje také iniciační komplex při jeho tvorbě (Wilson & Dombroski, 1997). Dále má schopnost navázat se RNAP do jejího aktivního místa a bránit tak navázání templátové DNA (Bae et al., 2013). Tvorba otevřeného komplexu je tedy závislá na uvolnění domény 1.1 z aktivního místa. V případě, že by zůstala v aktivním místě navázána, transkripce se nerozeběhne. Jakmile se však vazba uvolní, může být vytvořen otevřený komplex a následně proběhne transkripce. (Saecker et al., 2011), (Hook–Barnard & Hinton, 2009), (Murakami, K. 2013).

Doménu 2 obsahují všechny čtyři třídy σ^{70} . Skládá se ze tří α -helixů a je známo, že druhý helix zajišťuje vazbu na podjednotku β' RNAP (Young et al., 2001). V rámci domény ovšem probíhá více interakcí. Nejen že doména 2 váže podjednotku β' RNAP, ale oblasti 2.3 a 2.4 podjednotky σ také interagují s oblastí -10 promotoru (Arthur & Burgess, 1998, Murakami et al., 2002). Uvnitř promotorové sekvence -10 byly objeveny dvě konzervované báze, které zprostředkovávají vazbu mezi DNA a oblastí 2 faktoru σ . Jedná se o adenin na pozici -11 a thymin na pozici -7 . Doména se těmito vazbami podílí na stabilizaci otevřeného komplexu (Zhang et al., 2012). Doména 2 může v případě některých primárních faktorů σ obsahovat nekonzervovanou oblast (mezi oblastmi 1.2 a 2.1). U primárního faktoru σ^{70} v *E. coli* bylo experimentálně zjištěno, že tato variabilní oblast může mít vliv na disociaci faktoru σ v brzkých fázích elongace. Tato oblast může být různě dlouhá (Leibman & Hochschild, 2007).

Doména 3 obsahuje, stejně jako doména 2, celkem tři α -helixy, z nichž první helix se váže na prodlouženou sekvenci -10 (Campbell et al., 2002). Má funkci stabilizovat iniciační komplex, protože se může na promotoru vázat na prodlouženou -10 sekvenci, pokud je přítomna (není přítomna u všech tříd σ^{70} , tudíž není pro funkci promotoru esenciální. V případě promotorů s prodlouženou -10 sekvencí, u kterých dojde k vazbě mezi touto sekvencí DNA doménou 3, již

nemusí být přítomna sekvence – 35, jelikož přítomnost sekvence –10 je dostačující k silné stabilizaci vazby holoenzymu na promotor (Mitchell et al., 2003).

Mezi doménami 3 a 4 leží konzervovaná sekvence (neboli *linker*). Určitá část linkeru sahá až do kanálu, kudy vychází nově syntetizované vlákno RNA a tvoří strukturu takzvaného “ σ prstu“, který je v kontaktu s templátovým vláknem DNA. Aby mohla fungovat transkripce a tvořila se nová RNA, je nutné, aby se “ σ prst“ vyvázal z výstupního kanálu pro vlákno RNA. Jakmile se uvolní výstupní kanál, může proběhnout elongační fáze transkripce (Zhang et al., 2012, Paget, 2015).

Doménu 4 můžeme najít ve všech třídách skupiny σ^{70} . Tato doména především váže podjednotku β RNAP a stabilizuje tak strukturu holoenzymu. Navíc interaguje s promotorovou sekvencí –35. Doména je složena ze dvou párů α -helixů. Kontakt s promotorovou sekvencí –35 zajišťuje pár α -helixů, který se nalézá na C- konci proteinu (Campbell et al., 2002).

2.1.3.1.2 Třída 2

Do této třídy patří alternativní faktory σ s doménami 2, 3 a 4, postrádají tedy autoinhibiční doménu 1.1. Na rozdíl od tříd 3 a 4 jsou strukturně velmi podobné skupině 1, (Paget, 2015). Z těchto poznatků vyplývá, že by se teoreticky mohly alternativní faktory σ , které neobsahují doménu 1.1, navázat na DNA bez přítomnosti jádra RNAP. Tato hypotéza byla potvrzena například u faktoru σ^B u *B. subtilis*, i když vazba v těchto případech nebyla zdaleka tak silná, jako u holoenzymu (Sevim et al., 2011, Kuo et al., 2015). Naopak u faktoru σ^I z *B. subtilis* se tato interakce nepotvrdila (Ramaniuk et al., 2018).

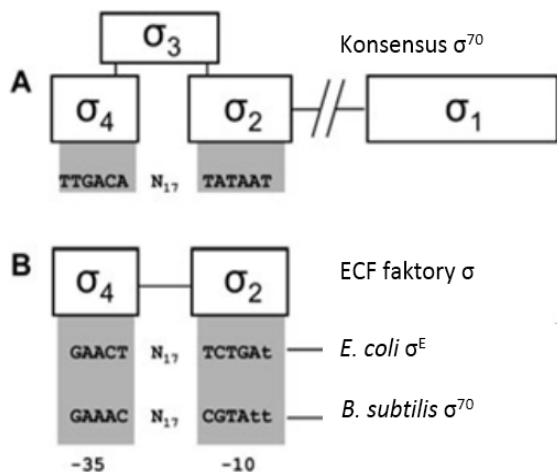
Alternativní faktory σ patřící do třídy 2 obecně aktivují geny důležité při hladovění buňky či při dalších stresech ve stacionární fázi. Faktor σ^B u *B. subtilis*, kterému se také obecně říká stresový faktor, zajišťuje transkripci genů pro reakci na různé stresové podmínky. Může se aktivovat například při reakci na osmotické a oxidativní strese, při kontaktu s antibiotikem, při nedostatku ATP nebo kyslíku, či za extrémních teplot (Nannapaneni et al., 2012, Nagler et al., 2016). Dále do této třídy patří také faktor σ^S (neboli σ^{38}) u *E. coli*, který je velmi dobře prostudovaný. Aktivuje geny pro reakci na širokou škálu různých druhů stresu. Například v situaci, kdy bakterii schází zdroj uhlíku, nebo se dostane do příliš vysoké teploty (Jishage et al. 1996, Battesti et al., 2011).

2.1.3.1.3 Třída 3

Skupina 3 zahrnuje alternativní faktory σ , které se svou sekvencí výrazně odlišují od skupiny 1. Ve většině případů jsou složeny ze tří domén, a to domén 2, 3 a 4. Tyto alternativní faktory regulují transkripci genů pro odpovědi na různorodé stresy či na změnu prostředí nebo vývoje bakterie. Mohou to být geny, které se exprimují při sporulaci, vysoké teplotě, nebo během syntézy bičíku (Paget & Helmann 2003). Do této třídy řadíme faktor σ^D z *B. subtilis*, ten reguluje expresi genů pro tvorbu bičíku nebo chemotaxi. Faktor σ^D je aktivní v pozdním exponenciálním růstu (Serizawa et al., 2004). Faktor s obdobnou funkcí můžeme najít také v *E. coli*, kde faktor σ^F (FliA) reguluje aktivitu genů, které kódují stavební kameny aparátu pro pohyb (Fitzgerald et al., 2014).

2.1.3.1.4 Třída 4

Ve třídě 4 jsou zařazeny faktory σ , které nazýváme faktory s extracytoplasmatickou funkcí (ECF), jelikož slouží jako receptory pro vnější signály přicházející do buňky a spouští patřičnou reakci v odpovědi na signál. Do třídy 4 spadá nejvíce faktorů σ a je ze všech tříd tou nejrůznorodější (Lonetto et al., 1994). Tyto alternativní faktory σ se skládají pouze z domén 2 a 4. Tyto dvě domény jsou dostačující k rozeznání sekvence promotoru a následné navázání. Navíc mají zkrácenou doménu 2 o první α -helix v rámci oblasti 1.2., proto zde neprobíhá vazba na diskriminátor (Staron et al., 2009). Faktory ECF rozeznávají a vážou promotory, které mají ve většině případů konzervovaný motiv “AAC” (alanin, alanin, cystein) nacházející se v promotorové oblasti –35 (Obrázek 5). V rámci promotorové oblasti –10 se zatím nenalezly konzervované, častěji se vyskytující sekvence (Staron et al., 2009).



Obrázek 5: Doménová struktura a porovnání vazebných promotorových sekvencí mezi primárními faktory σ a faktory ECF z *E. coli*

- A) Schéma primárního faktoru σ^{70} obsahující čtyři domény. U domén 2 a 4 jsou konsensus sekvence promotoru, na které se domény silně vážou.
- B) Schéma faktorů σ patřících do skupiny ECF (σ^E u *E. coli* a σ^W u *B. subtilis*). U domén 2 a 4 jsou konsensus sekvence promotoru, na které se domény silně vážou. Obrázek upraven z (Staron et al., 2009).

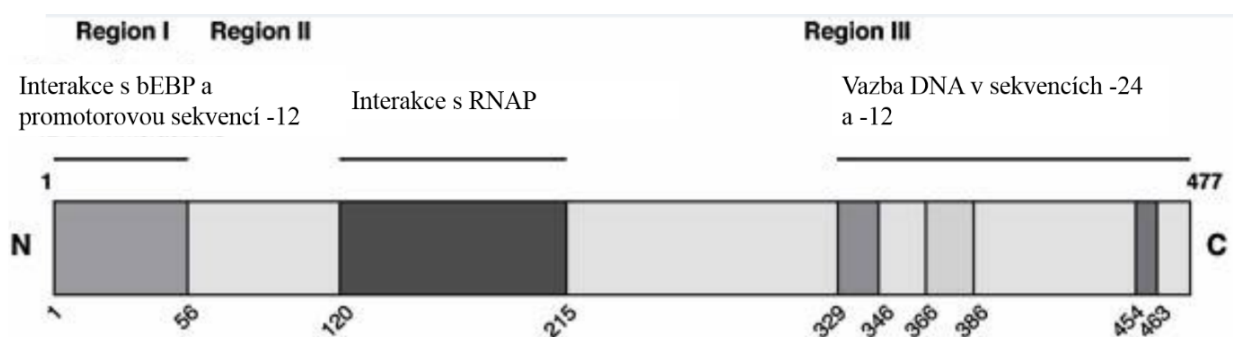
Do této třídy řadíme například jeden ze sedmi ECF faktorů *B. subtilis* σ^W , který zajišťuje reakci buňky na antimikrobiální peptidy vylučované sousedními bakteriemi (Helmann, 2006). U *E. coli* se nachází faktor σ^E , který zprostředkovává reakci na zvyšující se hladinu špatně sbalených proteinů ve vnější membráně a na další stresové faktory (Meccas et al., 1993). Faktor σ^E má své homology v jiných bakteriích, například v bakterii *Vibrio cholerae* (Mathur et al., 2007) nebo *Salmonella enterica*. Těmto bakteriím napomáhají při virulenci (Crouch et al., 2005, Testerman et al., 2002).

2.1.3.2 Skupina σ^{54}

Alternativní faktory ve skupině σ^{54} regulují transkripci genů zajišťujících zpracování alternativních zdrojů uhlíku, zpracování dusíku a také syntézu orgánů pro pohyb. Z promotorů, které jsou regulovány těmito faktory, není spuštěna transkripce během exponenciálního růstu, kdy je dostatek živin (Zhang & Buck, 2015). Rozeznávají na promotorové sekvenci motivy v pozici -24 a -12 (Barrios et al., 1999). Tyto faktory jsou tvořeny oblastmi 1, 2 a 3 (Obrázek 6) a nemají sekvenční podobnost se skupinou σ^{70} . Oblast 3 jako hlavní zajišťuje vazbu RNAP a zároveň se váže na sekvenční oblasti -24 a -12 na promotoru (Burrows et al., 2004). Vedle leží oblast 2, která funguje jako linker a pohyblivě propojuje oblasti 1 a 3. Oblasti 2 se mezi sebou liší sekvencí a délkou (Southern & Merrick, 2000).

Na konci leží oblast 1. Její funkce je podobná jako u oblasti 3, také dokáže vázat RNAP a současně i promotorovou sekvenci v oblasti -12. Ovšem síla jejího navázání je mnohonásobně slabší než u oblasti 3. Kromě těchto funkcí má oblast 1 také schopnost vázat aktivátory transkripce bEBPs (Obrázek 6) (Wigneshweraraj et al., 2001, Cannon et al., 1999). Aktivátory transkripce bEBPs jsou důležité pro izomerizaci a tvorbu otevřeného komplexu, jelikož faktory σ^{54} se dokážou navázat na RNAP a promotor, nicméně nedokážou aktivovat izomeraci DNA, tudíž se nevytvoří otevřený komplex. Aktivátory bEBPs hydrolyzují ATP a energii získanou z této reakce převedou na konformační změny DNA, dochází tedy k tvorbě otevřenému komplexu a může začít transkripce (Österberg et al., 2011, Cannon et al., 2001).

Skupina σ^{54} zahrnuje například faktor σ^L u *B. subtilis* (Débarbouillé et al., 1991) či faktor σ^N u *E. coli* (Wigneshweraraj et al., 2002).



Obrázek 6: Schéma faktoru σ^{54}

Schéma částí faktoru σ^{54} (byly popsány výše). Obrázek upraven z (Bose et al. 2008).

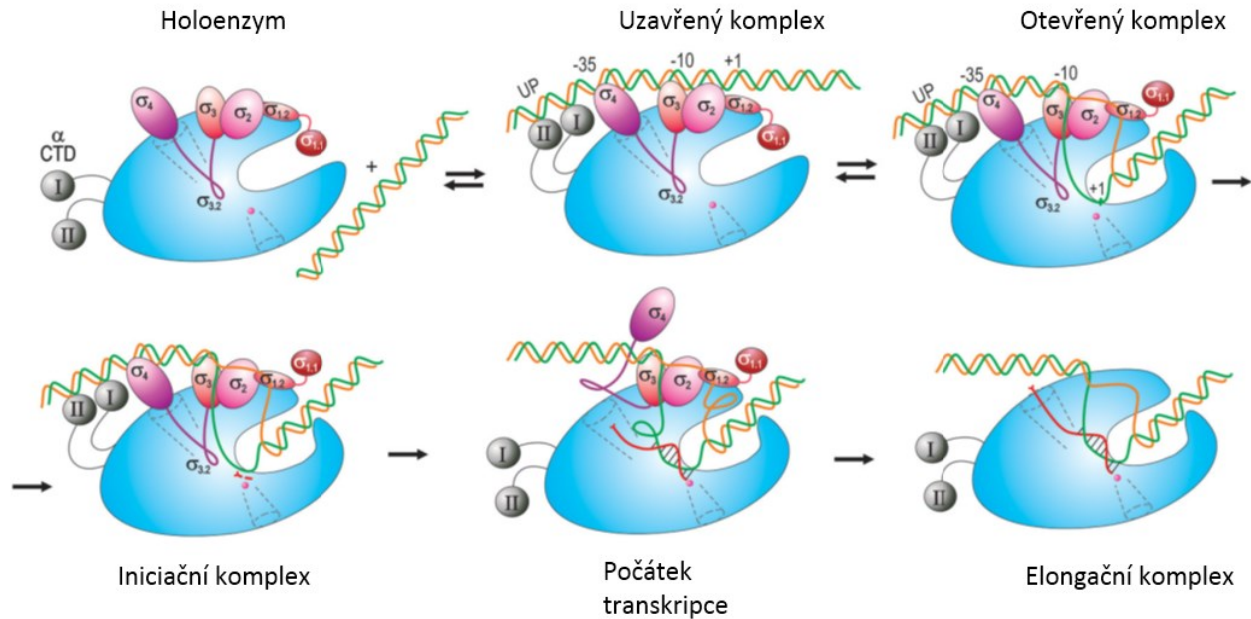
Alternativní faktory σ jsou regulovány za pomoci tzv. faktorů anti- σ . Faktory anti- σ se navážou na faktory σ a takto inhibují jejich navázání na jádro RNAP. Vazba faktoru σ na RNAP je umožněna pouze pokud se daný faktor vyváže ze spojení s faktorem anti- σ . Toto vyvázání může proběhnout pomocí vazby faktoru anti-anti- σ na komplex proteinů σ a anti- σ (Staroň & Mascher, 2010).

2.1.4 Transkripce

2.1.4.1 Iniciační fáze transkripce

Během iniciační fáze transkripce se holoenzym RNAP váže na sekvenci promotoru a vzniká tak uzavřený komplex (RP_c) (Obrázek 7). Následně postupně vznikají intermediáty (tzv. přechodné stavy), a to díky konformačním změnám. Takto se krok po kroku vytváří otevřený komplex (RP_o), jehož součástí je transkripční bublina, která se tvoří mezi promotorovými sekvencemi -11 a $+2$. Proces tvorby otevřeného komplexu se nazývá izomerizace (Tsujikawa et al., 2002). Během izomerizace se báze $+1$ na templátovém vlákně posune do katalytického místa RNAP, které leží mezi podjednotkami β a β' . Jakmile se báze $+1$ přesune do katalytického místa, může se na ní navázat iniciační nukleosidtrifosfát (iNTP) a rozběhne se transkripce (Haugen et al., 2008). V některých případech může po zahájení transkripce dojít k takzvané abortivní iniciaci, při které jsou několikrát syntetizovány krátké oligonukleotidy o délce přibližně 2–12 nukleotidů. V tomto případě mluvíme o raném elongačním komplexu (RP_{init}) (Lee & Borukhov, 2016). Teprve po uplynutí této fáze může RNAP syntetizovat delší transkript.

Elongační fáze nastává tehdy, pokud se DNA, která tvoří transkripční bublinu po směru transkripce (tzv. *Downstream* DNA), začne posouvat do RNAP. Daný pohyb nazýváme *scrunching*. Tato část DNA fyzicky vytlačí faktor σ , který se vyváže z RNAP a může tak začít elongační fáze (EC) (Winkelman et al., 2015).



Obrázek 7: Iniclace transkripce – jednotlivé fáze

RNAP je ve formě modrého oválu, který má uprostřed štěrbinu (aktivní místo).

Barevné označení: (α CTD) C–terminální domény podjednotky α – šedivá, domény σ – červená a fialová, templátová DNA – zelená, netemplátová DNA –oranžová, nově syntetizovaná RNA –červené vlákno. Kanály RNAP jsou vyznačeny jako přerušovaná čára, aktivní místo s ionty Mg^{2+} je znázorněno pomocí malé tečky ve štěrbině. Obrázek upraven z (Lee & Borukhov, 2016).

2.1.4.2 Elongační fáze transkripce

Při elongaci transkripce se RNAP posouvá po vlákně DNA, které používá jako templát a z jejího výstupního kanálu postupně vychází syntetizované vlákno komplementární RNA. Polymerace nového vlákna RNA probíhá v aktivním místě RNAP, kde je navázán ion Mg^{2+} a také dva aspartátové zbytky AK, které jsou záporně nabitě. K syntetizované RNA se postupně připojují NTP a za přítomnosti Mg^{2+} se svým α -fosfátem navazují na 3'OH skupinu posledního nukleotidu nově vznikajícího RNA vlákna. Touto reakcí dojde k odštěpení pyrofosfátu (Steitz et al., 1994).

Reakce je ovlivněna přítomností iontů Mg^{2+} . Ion v aktivním místě interaguje s 3'OH koncem nové RNA. Takto snižuje pKa OH skupiny a usnadní disociaci protonu. Na místě zůstane kyslík se záporným nábojem. Mechanismem nukleofilní substituce elektron takto nabitého kyslíku napadne α -fosfát nově přistupujícího NTP a tím dochází k vytvoření kovalentní vazby. Ion Mg^{2+} na

přístupujícím NTP umožňuje lepší odštěpení pyrofosfátu (Piccirilli & Koldobskaya, 2011, Shechner et al., 2009).

2.1.4.3 Terminační fáze transkripce

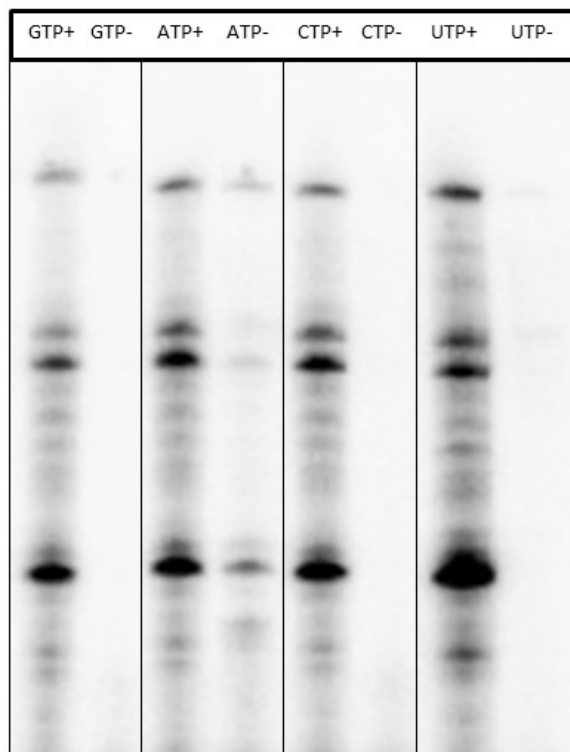
Terminační fáze nastává tehdy, pokud RNAP na vlákně DNA narazí na konzervovanou sekvenci terminátoru. Tato sekvence dává RNAP signál pro zastavení. Terminace může proběhnout dvěma způsoby. Může dojít k terminaci bez použití faktoru Rho, kdy se vytvoří invertované vlásenky bohaté na GC páry. Vznikem vlásenky se rozpadne elongační komplex a díky tomu, že za GC páry leží až 8 thyminů, dojde kvůli slabé vazbě vzniklých AU párů k disociaci RNAP (Roberts, 2019). Další možností terminace transkripce je transkripce závislá na faktoru Rho. Tento protein se skládá z šesti podjednotek uspořádaných do kruhu. Terminaci dokáže vyvolat svou ATPázovou a helikázovou aktivitou (Kriner & Groisman, 2017).

Každá podjednotka faktoru Rho obsahuje N–koncovou doménu. Tato doména má schopnost vázat RNA. Naproti tomu N–doména má schopnost vázat sekvence na RNA (*Rho utilisation sites*), které jsou cca 40 nt dlouhé a obsahují hodně cytosinu (Bogden et al., 1999). C–koncová doména váže ATP a díky jeho hydrolýze faktor Rho putuje po vlákně RNA až k RNAP a rozruší elongační komplex (Park & Roberts 2006). V některých případech bylo zjištěno, že se faktor Rho může vázat přímo na RNAP, nicméně s menší účinností terminace transkripce (Epshtein et al., 2010).

2.2 Systémy pro izolaci RNAP z bakterií

RNAP je ústřední enzym bakteriální transkripce a proto je velmi důležité mít k dispozici efektivní způsoby jeho izolace a purifikace. Základní metodou je izolace RNAP z *B. subtilis* za použití histidinové kotvy přímo z buněk (Qi & Hulett, 1998). Nicméně tento způsob neumožňuje mutaci klíčových aminokyselin a při izolaci hrozí kontaminace faktory σ . Později byl vytvořen pro RNAP z *B. subtilis* heterologní expresní systém, kde byl konstrukt RNAP vnesen na dvou vektorech do buněk *E. coli* a tam byl exprimován (Yang & Lewis, 2008). S tímto systémem jsou však proteinové výtěžky velmi nízké, takže nejsou vhodné pro biochemické experimenty nebo strukturní studie.

V naší laboratoři byla při transkripci s izolovanou RNAP v minulosti pozorována kontaminace molekulou ATP (Obrázek 8), přičemž u jiných NTP tento trend nebyl pozorován (Janoušková, Krásný, nepublikováno). Tento výsledek byl pozorován s RNAP z *B. subtilis* i *E. coli*.



Obrázek 8: Kontaminace RNAP z *E. coli* molekulami ATP - transkripční gel

Na transkripčním gelu je zřetelná aktivní či neaktivní transkripce v přítomnosti či nepřítomnosti daného NTP. K transkripci byla použita komerční RNAP z *E. coli*, která byla exprimována v kmeni DE3 (*E. coli*). Jako templát pro transkripci byl použit PCR produkt – byla amplifikována sekvence promotoru P_{veg} z templátu 1177 (Tabulka 1) (Janoušková, Krásný, nepublikováno).

3 Cíle práce

3.1 Klonovat a purifikovat doménové konstrukty faktoru σ^A a ověřit funkci autoinhibiční domény 1.1

Cílem bylo vytvořit účinný systém pro analýzu vazby domény 1.1 na ostatní domény σ^A .

- Klonovat a purifikovat rekombinantní doménové konstrukty faktoru σ^A
- Otestovat vazbu a autoinhibiční funkci konstruktů domény 1.1 na domény 2 a 4
 - Otestovat autoinhibiční funkci domény 1.1 metodou Nitrocellulose filter binding assay
 - Ověření výsledků Nitrocellulose filter binding assay metodou EMSA
 - Otestovat interakci doménových konstruktů s RNAP v transkripci *in vitro*

3.2 Klonovat a purifikovat rRNAP z *B. subtilis* a otestovat její funkci a vlastnosti

Cílem bylo vytvořit nástroj pro studium enzymologie RNAP z *B. subtilis* – rRNAP. K tomu byl zapotřebí účinný systém pro izolaci funkční RNAP v dostatečné koncentraci. Za tímto účelem byl vytvořen konstrukt rRNAP na jednom vektoru, který byl exprimován v *E. coli*.

- Klonovat a purifikovat rRNAP z *B. subtilis* expresí v *E. coli*
- Ověřit funkčnost a vlastnosti rRNAP
 - Otestovat rRNAP v transkripci *in vitro*
 - Ověřit, zda je rRNAP kontaminována ATP
 - Ověřit, zda je rRNAP kontaminována faktorem σ

4 Materiály a metody

4.1 Enzymy, chemikálie, média

4.1.1 Použité chemikálie a enzymy

- [α - ^{32}P] UTP – M. G. P.
- [γ - ^{32}P] ATP – M. G. P.
- Agaróza pro molekulární biologii – Amresco
- APS (Peroxodisíran amonný) – Sigma
- Bromfenolová modř – Dr. G. Gruber & Co.
- BSA (Hovězí serum albumin) – Sigma
- CH_3COONa (Octan sodný) – Lachema
- Coomassie Brilliant blue G-250 – Serva
- DTT (Dithiotreitol) – Serva
- dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP) – Roche
- EDTA (Ethylendiamintetraoctová kyselina) – Lachema
- Ethanol 96% – Penta
- Ethanol 70% – Penta
- Expand High Fidelity PCR System – Roche
- Fenol – AppliChem
- Formamid – Penta
- Gel Red – Biotium
- Glycerol – Sigma
- H_3BO_3 (Kyselina boritá) – Penta
- H_3PO_4 (Kyselina fosforečná) – Lach-Ner
- iH_2O (Aqua pro injection) – Braun
- Izopropanol – Lach-Ner
- Chloroform – Penta
- Imidazol – Sigma
- IPTG (Izopropyl- β -D-thiogalaktosid) – Sigma

- Kanamycin – Serva
- KCL (Chlorid draselný) – Lachema
- Loading buffer – Takara
- ME (β -merkaptoetanol) – Serva
- $MgCl_2$ (Chlorid hořečnatý) – Penta
- Na_2HPO_4 (Fosforečnan disodný) – Lach-Ner
- NaCl (Chlorid sodný) – Lach-Ner
- NTP (ATP, UTP, CTP, GTP) – Roche
- PAA (Polyakrylamid) – Serva
- Restrikční endonukleázy (*NcoI*, *XhoI*, *XbaI*, *SbfI*, *SacI*, *AscI*, *NotI*, *NcoI*, *KpnI*) – Takara
- rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) – New England Biolabs
- SAP pufr – NEB
- T4 DNA Ligáza – Takara
- T4 DNA Ligační pufr – Takara
- T4 kináza – Takara
- T4 kinázový pufr – Takara
- TEMED (Tetrametyletylendiamin) – Serva
- Tris-acetát – Serva
- Tris-HCl – Serva
- Xylene cyanol – Serva

4.1.2 Kultivační média

- **Luria-Bertoni médium (LB) – pH 7, 1l**
 - Kvasinkový extrakt 5 g
 - Trypton 10 g
 - NaCl 10 g
 - dH₂O doplněna do 1 litru

4.2 Přístroje

4.2.1 Třepačky a termostaty

BLOCK HEATER SBH 130D

Termostat určený k inkubování mikrozkušavek

- Maximální kapacita je 36 x 1,5ml mikrozkušavky
- Maximální rozmezí teplot je 24–130 °C
- Firma STUART

BIOLOGICAL THERMOSTAT BT 120

Termostat určený k inkubování Petriho misek

- Maximální rozmezí teplot 5–75 °C
- Firma LAB SYSTEM

HORIZONTAL SHAKER HS250 BS1

Třepačka (horizontální) s možností nastavení času inkubace buněk

- Inkubace v Erlenmayerových baňkách
- Maximální otáčky jsou 500 rpm
- Firma IKA LABORORTECHNIK

MULTI FUNCTIONAL SHAKER PSU 20

Třepačka s možností nastavení třepání (reciproké, orbitální a vibrační)

- Otáčky 20–250 rpm
- Firma BIOSAN

MINI ROCKER MR 1

Třepačka s možností překlápění umožňuje nabarvení gelů SDS–PAGE

- Intenzita překlápění je 5–30 kmit/min
- Firma BIOSAN

THERMOSTAT

Termostat umožňující kultivovat bakterie v Erlenmayerových baňkách

- Firma BROUWER

THERMOSTAT 5320

- Maximální kapacita je 24 x 1,5ml mikrozkušavky
- Je možné nastavit pět teplot (95 °C, 56 °C, 37 °C, 30 °C a 25 °C)
- Firma EPPENDORF

THERMO SHAKER TS – 100 C

Termostat umožňující třepat vzorky

- Maximální kapacita je 24 x 1,5ml mikrozkušavky
- Maximální rozptyl teplot je 24–100 °C
- Otáčky v rozmezí 250–1400 rpm
- Firma BIOSAN

THERMO 120

- Maximální kapacita je 24 x 1,5ml mikrozkušavky
- Maximální rozptyl teplot je 24–100 °C
- Pořízeno z VÝVOJOVÝCH DÍLEN UOCHB

VORTEX GENIE 2

- Maximální rozptyl otáček 600 – 3200 rpm
- K dispozici dva režimy: kontinuální dotykový
- Firma SCIENTIFIC INDUSTRIES

4.2.2 Elektroforézy

OWL™ P10DS DUAL GEL SYSTEM

Vertikální elektroforéza, umožňuje analyzovat vzorky značené izotopem

- THERMO SCIENTIFIC

OWL™ EASYCAST B1A MINI GEL ELFO SYSTEM

Horizontální elektroforéza, umožňuje analyzovat fragmenty DNA

- Firma THERMO SCIENTIFIC

XCELL SURELOCK™ MINI CELL ELFO SYSTEM

Vertikální elektroforéza

- Použity předpřipravené gely SDS–PAGE firmy Novex
- Firma NOVEX, USA

4.2.3 Zdroje napětí

POWER PAC 3000

- Určen pro elektroforézy
- Maximální napětí je 300 V
- Firma BIO RAD, USA

ENDURO 300V POWER SUPPLIES

- Určen pro elektroforézy
- Maximální napětí je 300 V
- Firma LABNET INC., USA

4.2.4 Centrifugy

AVANTI J–26XPI

Centrifuga s chlazením, vyměnitelné rotory

- Maximální zrychlení u rotoru JA–10 je $17\,700 \times g$ (kyvety 0,5 l)
- Maximální zrychlení u rotoru JA–25.50 je $25\,000 \times g$ (kyvety 50 ml)
- Firma BECKMAN

ALLEGRA X–15R CENTRIFUGE

Centrifuga s chlazením, výkyvný rotor SX4750A

- Maximální zrychlení je $5\,250 \times g$
- Maximální kapacita je 24 x 15ml kyvety/12 x 50ml kyvety

- firma BECKMAN

MINI – CENTRIFUGE

- Maximální zrychlení je $2000 \times g$
- Maximální kapacita je 6 x 1,5ml mikrozkušavky
- Firma ROTILABO

MICROFUGE 20R

Centrifuga s chlazením, vyměnitelné rotory

- Maximální kapacita je 24 x 1,5ml mikrozkušavky
- Maximální zrychlení u rotoru FA241.5 je $20\,627 \times g$
- Firma BECKMAN

UNIVERSAL 320 R

Centrifuga s chlazením, vyměnitelné rotory

- Maximální zrychlení u rotoru 1420–B je $21\,382 \times g$, maximální kapacita je 24 x 1,5 ml mikrozkušavky
- Maximální zrychlení u rotoru 1620–A je $9\,509 \times g$, maximální kapacita je 6 x 50ml kyvety
- Firma HETTICH

4.2.5 Další přístroje

EG 2200

Analytická váha

- Maximálně 2200g
- Firma KERN

BAS–MS2040

Kazeta obsahující citlivou desku určená k vyhodnocení transkripce *in vitro*

- Firma FUJI

KNFLAB

Vakuová pumpa (firma LABPORT)

MIDIDRY D62 (BIOMETRA)

Sušička gelů

- Sušicí plocha má rozměry 30 x 40 cm
- Rozmezí teplot je 5 – 90 °C

MINI 900EP15 CONTAMINATION AND RADIATION MONITOR

- Geigerův – Müllerův počítač (příruční)
- Citlivost 0,5 – 2000 cps
- Firma THERMO SCIENTIFIC

MOLECULAR IMAGER FX

Phosphoimager od firmy BIO–RAD

NANODROP™ LITE

Spektrofotometr, umožňuje měřit koncentraci DNA

- Firma THERMO SCIENTIFIC

pH/ION 510

pH metr od firmy OAKTON INSTRUMENTS

PTC 200

Cycler od firmy MJ RESEARCH

- Dva termobloky (dva typy mikrozkušavek dle velikosti)

UP 200S

Sonikátor od firmy HIELSCHER (vyměnitelné sondy)

UV – 1601PC UV VISIBLE

Spektrofotometr od firmy SHIMADZU

UVT-20M

Transiluminátor od firmy HEROLAB

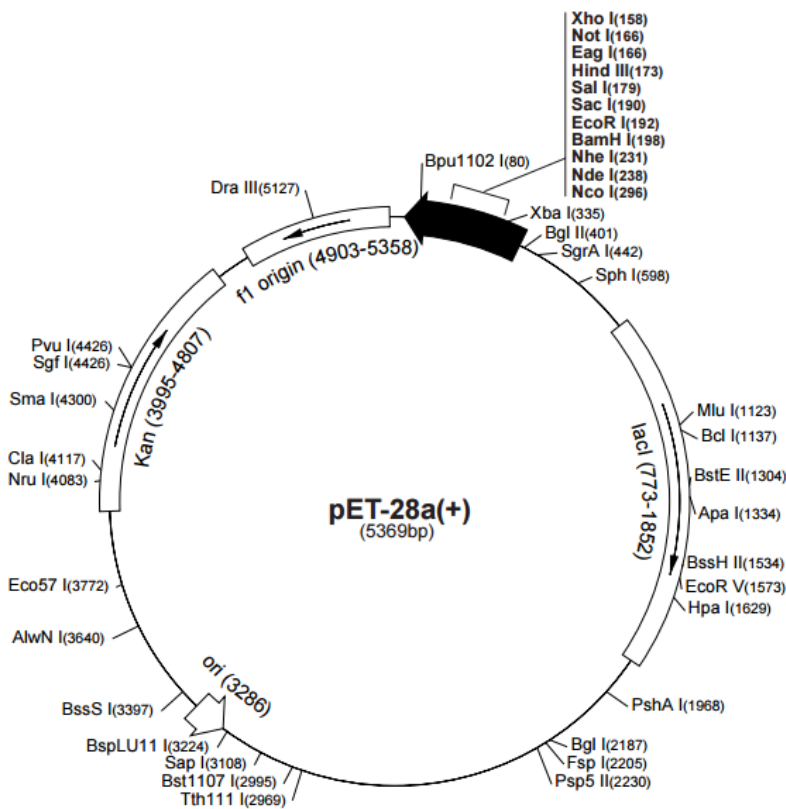
4.3 Vektory

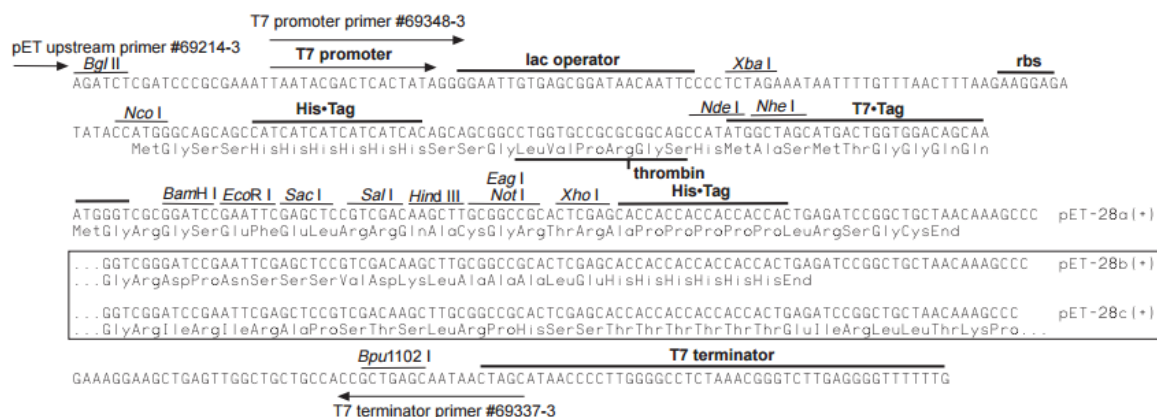
Plazmid pET-28b(+)

Plazmid pET-28b(+), zakoupený od firmy Novagen se používá především pro klonování genů a expresi jimi kódovaných proteinů, v mé diplomové práci byl použit k produkci rekombinantních konstruktů σ . Schéma plazmidu viz Obrázek 9.

Obsah plazmidu:

- sekvence His-tag (6 histidinů připojených na C-konci proteinu)
- T7 promotor (inducibilní)
- gen zajišťující rezistenci na kanamycin





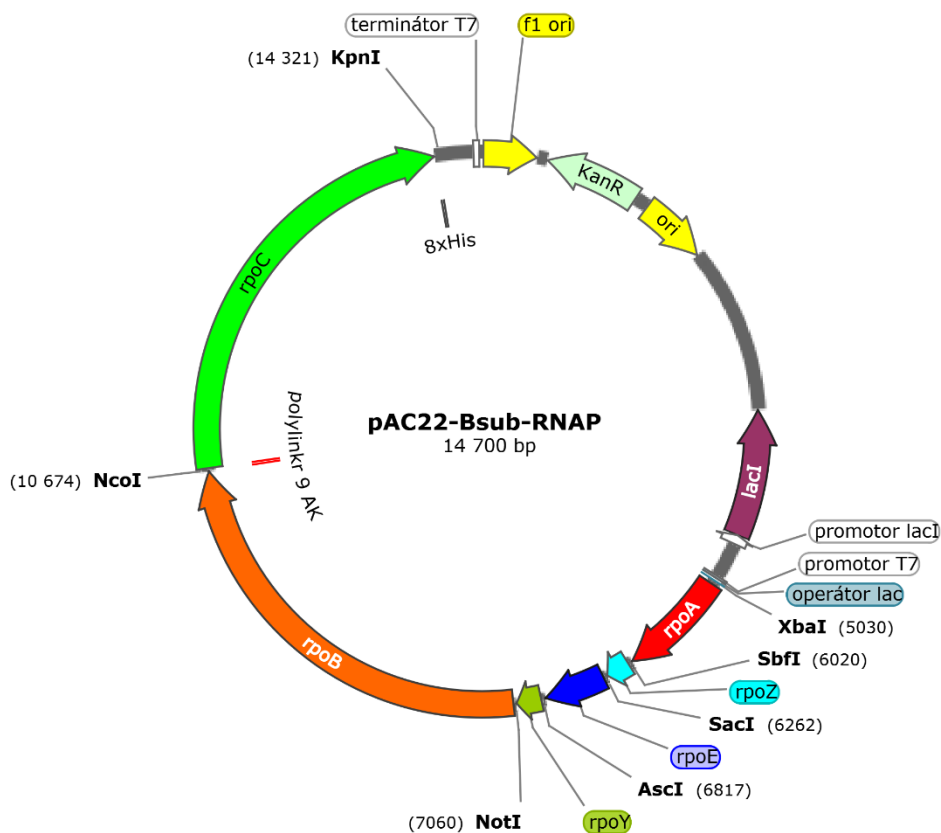
Obrázek 9: Mapa plazmidu pET–28b(+). Zdroj: manuál firmy Novagen

Plazmid pAC22

Plazmid pAC22 (odvozen z plazmidu pET28a, získaný z laboratoře Roberta Landicka) (Kouba et al., 2019) se používá především pro klonování genů a expresi jimi kódovaných proteinů. V této diplomové práci byl použit k produkci rRNAP z *B. subtilis*. Schéma plazmidu s vloženými podjednotkami RNAP z *B. subtilis* (rRNAP) je znázorněno na Obrázku 10.

Plazmid obsahuje:

- sekvence His–tag (6 histidinů připojených na C–konci proteinu)
- T7 promotor (inducibilní)
- gen zajišťující rezistenci na kanamycin



Obrázek 10: Mapa plazmidu pAC22

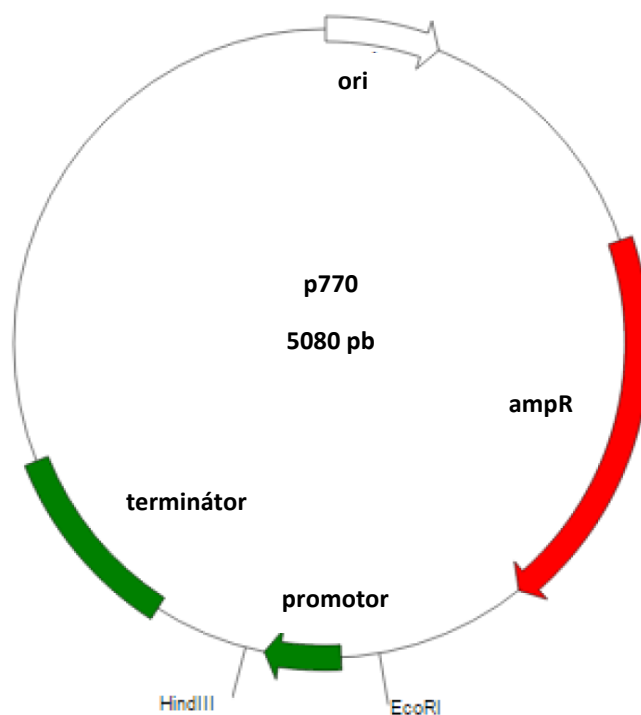
Mapa plazmidu pAC22, použitého na klonování RNAP z *B. subtilis*. Jednotlivé podjednotky byly vkládány do plazmidu pomocí restričních enzymů *XbaI*, *SbfI*, *SacI*, *AscI*, *NotI*, *NcoI* a *KpnI*. Mapa byla vytvořena v programu SnapGene Viewer dostupném na adrese <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>.

Plazmid p770

V naší laboratoři byl Plazmid p770 získán z laboratoře paní Rossové (Ross *et al.*, 1990). Promotory určené k transkripčním experimentům do něj byly vloženy za pomoci restričních endonukleáz mezi restriční místa *EcoRI* a *HindIII*. Níže je znázorněna mapa plazmidu (Obrázek 11).

Plazmid obsahuje:

- β -laktamázový gen, který poskytuje rezistenci k ampicilinu
- Terminátor (ρ nezávislý)



Obrázek 11: Mapa plazmidu p770

Mapa plazmidu p770 použitého jako templát v transkripci *in vitro*. Mapa byla vytvořena v programu SnapGene Viewer dostupném na adrese <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>.

4.4 Použité bakteriální kmeny

Tabulka 1: Seznam bakteriálních kmenů použitých v této práci

Název kmene	Genotyp	Původ
DH5α (<i>E. coli</i>)	supE44; ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15); hsdR17; recA1; endA1; gyrA96; thi-1; rel-A1	Invitrogen
BL21(DE3)	F- ompT hsdS(rB- mB-) gal dcm λ(DE3)	
LK 1828	DH5α pET28b(+)/sigA (D1_2)-6His	Tato práce
LK 1829	DH5α pET28b(+)/sigA (D2)-6His	Tato práce
LK 1830	DH5α pET28b(+)/sigA (D3_4)-6His	Tato práce
LK 1834	DH5α pET28b(+)/sigA (D4)-6His	Tato práce
LK 1831	DH5α pET28b(+)/sigA (D1_4)-6His	Tato práce

LK 1832	DH5α pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D2_4)-6His	Tato práce
LK 1835	BL21(DE3) pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D1_2)-6His	Tato práce
LK 1836	BL21(DE3) pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D2)-6His	Tato práce
LK 1837	BL21(DE3) pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D3_4)-6His	Tato práce
LK 1855	BL21(DE3) pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D4)-6His	Tato práce
LK 1838	BL21(DE3) pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D1_4)-6His	Tato práce
LK 1839	BL21(DE3) pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D2_4)-6His	Tato práce
LK 1345	BL21(DE3) pET28b(+)/ <i>sigA</i> (D1.1)-6His	Tato práce
LK 2289	DH5α pAC22/ <i>rpoA_rpoZ_rpoE_rpoY</i>	Tato práce
LK 2331	DH5α pAC22/ <i>rpoB</i>	Tato práce
LK 2345	DH5α pAC22/ <i>rpoB_rpoC</i>	Tato práce
LK 2376	BL21(DE3) pAC22/ <i>rpoA_rpoZ_rpoE_rpoY_rpoB_rpoC</i> -8His	Tato práce
LK 1177	DH5α p770/P _{veg}	

4.5 Práce s mikroorganismy

4.5.1 Kultivace bakterií

Bakterie (bakteriální druhy *E. coli* a *B. subtilis*) byly kultivovány především na agarózových miskách (37 °C), nebo také v Erlenmayerových baňkách v tekutém médiu. Bakterie v tekutém médiu byly kultivovány v 37 °C za neustálého třepání. Objem tekuté kultury nepřesáhl 1/3 objemu baňky.

Postup:

- Kultura byla zaočkována z glycerinové konzervy sterilní kličkou do 10 ml přehřátého LB s příslušným antibiotikem a následně byla třepána 12–14 hodin v 37 °C.
- Následně se změřila optická denzita kultury (OD) a kultura byla přeočkována do specifického objemu přehřátého média s příslušným antibiotikem na počáteční OD 0,03.
- Nakonec byla kultura inkubována v 37 °C při stálém třepání. V jednotlivých časových intervalech byla zaznamenávána OD a vynášena do grafu růstové křivky.

- Při kultivaci wt RNAP z buněk *B. subtilis* probíhalo přeočkování kultury do předeřátého média bez antibiotika.

Postup měření optické denzity

Byl odebrán vzorek kultury, který byl poté zředěn v poměru 1:9 s dH₂O. Následně byla naměřena hodnota OD. K tomu byl použit spektrofotometr UV – 1601PC, na kterém byla zvolena vlnová délka paprsku, tedy vlnová délka 600 nm, která se používá k měření koncentrace bakteriální kultury. Nakonec byla vypočítána OD původního nezředěného vzorku prostým násobením naměřené hodnoty.

4.5.2 Tvorba glycerinové konzervy

Tento způsob uchování vzorků umožňuje skladovat bakteriální kmen v teplotě –80 °C až několik let. Z tekuté kultury bakterií v LB médiu s transformovaným vektorem se odebralo 850 µl kultury a toto množství bylo smícháno s 150 µl sterilního glycerolu. Tato směs byla po promíchání uložena do teploty – 80 °C.

4.6 Práce s DNA

4.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR byla v této práci použita k amplifikaci genů pro jednotlivé doménové konstrukty faktoru σ^A , pro amplifikaci podjednotek RNAP z *B. subtilis* a pro amplifikaci promotorových oblastí. Jako templátová DNA byla použita chromozomální DNA z *B. subtilis*. V reakcích byly použity primery, které jsou uvedeny v kapitole Výsledky. Níže je rozepsána reakční směs PCR pro jednu reakci (Tabulka 2).

Tabulka 2: Reakční směs pro PCR (50 µl)

Látka	Objem (µl)
iH ₂ O (injekční voda)	40,25
templátová DNA (1 µg)	1
primer forward (100 pmol/µl)	1
primer reverse (100 pmol/µl)	1
10mM dNTP	1
10x pufr (MgCl ₂)	5
DNAP Expand High Fidelity PCR system	0,75

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (s)
1	95	120
1	95	15
	56	30
	72	60
5	95	15
	52	30
	72	60
24	95	15
	48	30
	72	60

Namíchaná směs byla vložena do cycleru PTC 200 a DNA byla amplifikována dle programu v tabulce 3.

Tabulka 3: program amplifikační reakce

Po amplifikování DNA za pomoci PCR byly vzorky vždy analyzovány pomocí agarové horizontální elektroforézy.

4.6.2 Horizontální agarová elektroforéza

Složení pufru 50x TAE: 2M Tris–acetát, 50mM EDTA (pH 8,0)

Postup:

- Byla sestavena aparatura OWL™ EASYCAST B1A.

- Poté bylo rozpuštěno 0,5 g agarózy v 50 ml pufru 1×TAE v Erlenmayerově baňce. Tím byla namíchána 1% agaróza. Vzniklý roztok byl následně chlazen a poté k němu bylo připipetováno fluorescenční barvivo Gel Red, které barví nukleové kyseliny, a to v množství 5 μ l – ředění 1:10 000.
- Vzniklá směs byla promíchána a nalita do elektroforetické aparatury. Do aparatury byl vsazen hřeben, který při tuhnutí gelu vytváří komůrky k nanesení vzorků.
- Během 30 minut směs ztuhla, poté byla aparatury zalita pufrům 1× TAE. Celý gel i elektrody byly zakryty pod hladinou pufru.
- Nakonec byl vyndán hřeben z aparatury.
- Do jedné jamky v gelu byl vždy nanesen velikostní marker.
(Použité typy markerů od firmy Thermo Scientific: GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, GeneRuler™ DNA ladder MIX)
- Do dalších jamek byly nanесeny vzorky smíchané s 10× Loading buffer v poměru 1:10. Použitý loading buffer byl zakoupen od firmy Takara.
- Sestavená aparatura byla připojena ke zdroji napětí POWER PAC 3000. Zdroj byl puštěn na napětí 5V/cm po dobu přibližně 60 minut.
- Proběhla analýza gelu na transiluminátoru (UVT–20M) – vlnová délka 320 nm, výsledek byl zdokumentován.

4.6.3 Izolace DNA z gelu

V případě izolace DNA z gelu byl použit protokol a chemikálie z komerční soupravy QIAquick Gel Extraction (firma QIAGEN). Centrifugace vzorků byly prováděny za pokojové teploty 24 °C při zrychlení 17900 \times g.

Postup:

- Sterilním skalpelem byl na UV lampě vyříznut pruh gelu s danou DNA, kterou chceme izolovat. Poté byl vložen do mikrozkušavky.
- Vyříznutý pruh byl zvážen a bylo k němu přidáno trojnásobné množství pufru QG. Tedy pokud je hmotnost pruhu například 200 mg, bylo přidáno 600 μ l pufru QG.
- Po přidání pufru QG byl vzorek inkubován v 50 °C až do momentu úplného rozpuštění gelu (většinou rozpuštění trvá 10 minut). Mezitím byl vzorek každé 2 minuty promíchán na vortexu.

- Následně byl ke vzorku připipetován izopropanol, poměr 1:1 s původní hmotností gelového pruhu a tato směs byla promíchána pipetou.
- Tato směs byla přepipetována do kolonky QIAprep, která má silikagelovou membránu. V této kolonce byla směs centrifugována 1 minutu.
- Tekutina proteklá membránou (zbytek agarózy) byla odlita a na kolonku byl napipetován pufru QG (500 μ l), následně byla kolonka centrifugována 1 minutu.
- Tekutina proteklá membránou byla odlita a následně bylo připipetováno 750 μ l pufru PE, kolonka s pufrům stála v pokojové teplotě po dobu 5 minut a následně byla opět centrifugována 1 minutu.
- Tekutina proteklá membránou byla odlita, následně byla kolonka centrifugována 1 minutu kvůli odstranění veškerých zbytků promývacího pufru.
- Jako poslední krok byla eluována DNA. Kolonka byla přendána do nové mikrozkušavky, na střed membrány bylo napipetováno 30 μ l pufru EB a poté byla mikrozkušavka 1 minutu centrifugována.

4.6.4 Štěpení

Metoda štěpení restrikčními endonukleázami byla použita při přípravě konců plazmidů pET–28b(+) pro integraci doménových konstruktů faktoru σ^A a pro integraci podjednotek RNAP z *B. subtilis*. Metoda byla také použita pro štěpení konců produktů PCR určených k integraci do plazmidu pET–28b(+). Složení reakčních směsí pro štěpení jednotlivých PCR produktů jsou rozepsány níže, v Tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro štěpení plazmidu pET–28b(+)

Látka	Množství
10×K pufr (Takara)	3 μ l
BSA	3 μ l
NcoI (10 U/ μ l – Takara)	1 μ l
XhoI (10 U/ μ l – Takara)	1 μ l
Plazmid pET–28b(+)	1 μ g
Doplněno dH ₂ O do 30 μ l	

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro štěpení PCR produktů

Látka	Množství
10×K pufr (Takara)	3 µl
BSA	3 µl
NcoI (10 U/µl, Takara)	1 µl
XhoI (10 U/µl, Takara)	1 µl
Inzert	180 ng
Doplněno dH ₂ O do 30 µl	

- Veškerá prováděná štěpení probíhala 1 hodinu při teplotě 37 °C. Následně bylo štěpení inaktivováno inkubací v 65 °C po dobu 15 minut.

4.6.5 Defosforylace plazmidů

Po štěpení plazmidů a inzertů byla provedena defosforylace plazmidů. Daný plazmid se smíchá s rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), která zajistí defosforilaci 5' konců DNA. Složení reakční směsi je rozepsáno níže v Tabulce 6.

Tabulka 6: : Složení reakční směsi pro defosforilaci naštěpených plazmidů

Látka	Objem (µl)
Plazmid	27 µl
10xSAP pufr (NEB)	3 µl
rSAP (NEB)	4 µl
iH ₂ O	14 µl

Postup:

- Nejprve byla napipetována směs (Tabulka 6).
- Po promíchání byla ponechána při teplotě 37 °C na 30 minut.
- Následně byla defosforylace inaktivována inkubací v 65 °C na 15 minut.

4.6.6 Ligace

Ligaci naštěpených PCR produktů a defosforylovaných plazmidů byla provedena za použití enzymu T4 DNA Ligázy a T4 DNA Ligačního pufru (firma Takara). Složení ligační směsi je rozepsáno v Tabulce 7.

Tabulka 7: Složení ligační směsi

Látka	Množství
Plazmid	100 ng
T4 DNA Ligáza (25 U/μl)	1 μl
T4 DNA Ligační pufir	2 μl
Inzert	množstevní poměr 5:1 vůči plazmidu
Doplněno dH ₂ O do 20 μl	

Postup:

- Byla napipetována ligační směs (Tabulka 7), která byla po smíchání byla inkubována přes noc (12–14 h) v 16 °C.
- Následně byla inaktivována inkubací v 65 °C na 15 minut.

4.6.7 Transformace do *E. coli*

Pro transformaci buněk *E. coli* byla použita metoda teplotního šoku (Hanahan, 1983).

Postup:

- Kompetentní buňky *E. coli*, které byly připraveny v naší laboratoři, byly vyjmuty z –80 °C a poté byly ponechány na ledu do rozmrznutí.
- Ligační směs (či plazmid) byla rozpipetována do mikrozkušavek.
- Do jedné z mikrozkušavek byla napipetována pouze iH₂O, která slouží jako negativní kontrola.
- Po promíchání byly kompetentní buňky rozpipetovány po 100 μl do mikrozkušavek s ligační směsí, ty byly následně protřepány a inkubovány na ledu po dobu 30 minut
- Mikrozkušavky byly inkubovány (90 s, 42 °C) a poté uloženy na 5 minut na led.
- Poté byl do všech mikrozkušavek připipetován 1 ml LB média. Po promíchání byly mikrozkušavky zakryty parafilmem, vloženy do stojánku a zajištěny proti vypadnutí.

- Následně proběhla inkubace mikrozkušavek ve vodorovné poloze po dobu 60 minut v 37 °C, a to za stálého třepání.
- Mikrozkušavky byly centrifugovány (6000 × g, 1 min, 24 °C).
- Supernatant byl z větší části odlit, pelet byl resuspendován ve zbylém médiu.
- Buňky ve zbylém médiu byly natřeny pomocí skleněné hokejky na agarové misky (agar LB a odpovídající antibiotikum).
- Nakonec byly buňky přes noc inkubovány při 37 °C v poloze dnem vzhůru.
- Následující den byly kvantifikovány kolonie na miskách. Pokud se žádaný inzert vložil do plazmidu, dané buňky na LB agaru narostly. Počet plazmidů, které se zpětně uzavřely i bez vloženého inzertu jsme redukovali díky defosforilaci 5' konců.

4.6.8 Miniprep – izolace plazmidové DNA

K izolaci plazmidové DNA z buněk byla použita komerční souprava QIAprep Spin Miniprep Kit, zakoupená od firmy QIAGEN.

Postup:

- Požadovaný plazmid byl získáván z buněk *E. coli*, které byly kultivovány přes noc v 10 ml LB média (kapitola 4.5.1 Kultivace bakterií).
- Následující den byla buněčná kultura chlazena (15 minut) a poté centrifugována na 3000 × g, po dobu 10 min při 4 °C.
- Vzniklý supernatant byl vylit, pelet byl resuspendován v pufru P1 (250 μl) a poté přepipetován do mikrozkušavky.
- Poté byl přidán pufr P2 v množství 250 μl, mikrozkušavky byly poté opakovaným obrácením promíchány.
- Následně byl připipetováno 350 μl pufru N3, ihned potom byly mikrozkušavky promíchány a centrifugovány (17 900 × g, 10 min, 24 °C).
- Pouze supernatant byl přepipetován na kolonku. Ta byla centrifugována (17 900 × g, 1 min, 24 °C).
- Tekutina, která protekla, byla odlita a byl připipetován pufr PE (750 μl).
- Poté byla kolonka centrifugována na 17 900 × g, po dobu 1 min při 24 °C.
- Tekutina, která protekla, byla vylita a kolonka znovu centrifugována (17 900 × g, 1 min, 24 °C). Tím byl odstraněny zbytky pufru PE.

- Poté byla kolonka přendána do nové 1,5ml mikrozkušavky a bylo připipetováno 50 μ l pufru EB
- Po uběhnutí 1 minuty v pokojové teplotě proběhlo eluování DNA do mikrozkušavky prostřednictvím centrifugace ($17\,900 \times g$, 1 min, 24 °C).

4.6.9 Midiprep – Izolace plazmidové DNA

K izolaci plazmidové DNA z většího objemu buněk byla použita komerční souprava Wizard plus MidiPrep DNA purification systém (firma Promega). Tato metoda je určena pro izolaci plazmidů z většího objemu buněk (porovnáno s metodou Miniprep).

Postup:

- Přes noc byly pěstovány buňky (objem 100 ml média, postup dle kapitoly 4.5.1 Kultivace bakterií).
- Poté byly buňky 15 minut uloženy na ledu a následně centrifugovány v 50 ml falkonkách na $5\,250 \times g$, po dobu 10 min při 4 °C.
- Vzniklý supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v Cell Resuspension Solution (3 ml - 1,5 ml na každou falkonku) za pomoci vortexu. Vzniklé roztoky byly slity do společné falkonky.
- K roztoku byly připipetovány 3ml Cell Lysis Solution a byl promíchán jemným převrácením.
- Byl přidán Cell Neutralization Solution (3 ml) a roztok byl promíchán převrácením.
- Roztok byl centrifugován při zrychlení $10\,000 \times g$ na 10 min při 4 °C.
- Vzniklý supernatant s požadovanou DNA byl přepipetován do nové falkonky (50ml).
- Byl přidán resin (10 ml) a roztok byl promíchán.
- Byla sestavena kolonka a připojena k vývěvě. Na kolonku byl nalit resin s DNA a tato směs postupně pod tlakem protekla.
- Jakmile směs protekla kolonkou, byl přilít Column Wash Solution (10 ml) s přidáním EtOH. Přidání Column Wash Solution proběhlo 2x.
- Jakmile směs protekla kolonkou, byla kolonka připojena dalších 30 s k vývěvě kvůli vyschnutí a poté byla teprve odpojena.

- Byla odříznuta část kolonky, která obsahuje DNA a tato část byla vložena do 1,5ml mikrozkušavky. V mikrozkušavce byla centrifugována na $10\,000 \times g$ po dobu 2 min při $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po centrifugaci byla kolonka předána do nové 1,5ml mikrozkušavky a byla na ní nanášena injekční voda (300 μl , předehřátá na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po 1 minutě v pokojové teplotě byla centrifugována na $10\,000 \times g$ po dobu 20 s při $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Roztok, který protekl kolonkou byl opět centrifugován na $12\,000 \times g$ po dobu 5 min při $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Vzniklý supernatant byl přenesen do nové 1,5ml mikrozkušavky. Pipetováním byl změřen objem supernatantu.

Pro následné použití v transkripčních reakcích byla navíc použita fenol–chloroformová extrakce (umožňuje odstranit RNázy v izolované DNA):

- K izolované DNA byl připipetován fenol (poměr objemů 1:1), vše bylo promícháno otáčením a vloženo na otočnou třepáčku (5 minut).
- Následně byl roztok centrifugován na $13\,200 \times g$ po dobu 5 min při $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Byla odpipetována vodná fáze a byla přidána směs fenolu a chloroformu (poměr 1:1).
- Poté byl vzorek třepán a centrifugován (stejně jako v minulém případě).
- Z mikrozkušavek byla odpipetována vodná fáze a byl přidán chloroform (poměr 1:1).
- Poté byl vzorek třepán a centrifugován (stejně jako v minulém případě).
- Do nové mikrozkušavky byla odpipetována vodná fáze a následoval postup srážení DNA.
- K izolované DNA byl pipetován octan sodný (CH_3COONa , 3M), který tvořil 1/10 objemu roztoku DNA
- Byl připipetován také 96% EtOH, který tvořil $2,2 \times$ objem roztoku DNA.
- Roztok byl řádně promíchán a inkubován po dobu 10 minut ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Roztok byl centrifugován na $12\,000 \times g$ po dobu 15 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Vzniklý supernatant byl odstraněn a bylo připipetováno 50 μl chlazeného 70% EtOH na pelet.
- Směs byla znovu centrifugována, stejně jako v minulém případě, avšak pouze 1 minutu.
- Vzniklý pelet byl sušen pomocí exsikátoru napojeného na vakuovou pumpu.

- Na závěr byla na pelet napipetována iH₂O (50 µl) a byla změřena koncentrace izolované DNA na přístroji NANODROP™ LITE.

4.7 Práce s proteiny

K izolaci proteinů byla použita metoda afinitní chromatografie. Byly izolovány uměle vytvořené konstrukty domén faktoru σ^A a jádro RNAP z *B. subtilis*. Tyto proteiny obsahovaly v sekvenci AK histidinové kotvy, ta slouží k i izolaci proteinů díky své afinitě k iontům kovů.

4.7.1 Indukce exprese proteinů

Pro metodu indukce exprese byly použity následující pufry:

Pufř P (50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 5% glycerol, 3mM β -mercaptoetanol)

Postup:

- Byly očkované a následně kultivovány buňky *E. coli* (kmen BL21 z glycerinové konzervy), které obsahovaly plazmid s vloženým genem námi požadovaného proteinu pro izolaci. Kultivace buněk je popsána v kapitole 4.5.1 Kultivace bakterií.
- Jakmile bakterie dosáhly OD 0,6–0,8 (v případě kultivace wt RNAP OD 1), kultura byla přendána do pokojové teploty a byla indukována exprese proteinu přidáním IPTG (u kultivace domén σ 0,8mM, u kultivace RNAP 0,3Mm).
- Kultura se třepala v pokojové teplotě 3 hodiny, poté byla chlazena 20 minut na ledu a nakonec centrifugována na 8000 × g po dobu 15 min při 4 °C.
- Vzniklý pelet byl vortexem resuspendován v P pufřu (40 ml) a směs byla centrifugována v 0,5l falkonkách na 3500 × g po dobu 15 min při 4 °C).
- Byl odlit supernatant a pelety byly zamrazeny ve falkonkách v –20 °C.

4.7.2 Izolace proteinů metodou afinitní chromatografie

Postup:

- Zmražené pelety byly ponechány v ledové lázni do rozmrznutí a poté resuspendovány vortexem v pufřu P (15 ml).
- Vzorky byly na ledu sonikovány 12 × 10 sekund s minutovými pauzami.
- Následně směs byla centrifugována na 19000 × g po dobu 15 min při 4 °C
- Supernatant byl přenesen do nepoužité falkonky.

- Byla připravena agaróza Ni–NTA (firma QIAGEN, 1,5 ml), 2x promyta pufrem P (10 ml) centrifugací na $2000 \times g$ po dobu 2 min při 24 °C.
- Promytá agaróza byla slita se supernatantem a směs byla ponechána v ledové lázni 1 hodinu (za neustálého třepání ve vodorovné poloze).
- Byla připravena kolonka a dána do 4 °C (chladová místnost), na kolonku byla připojena silikonová hadička (5cm), díky které se zvýšil průtok. Nakonec byla kolonka dána nad Erlenmayerovu baňku do stojanu.
- Pomocí pufru P (10 ml) byla kolonka preekvilibrována
- Na kolonku byla nalita směs supernatantu s agarózou Ni–NTA.
- Kolonka byla následně promyta pufrem P (30 ml).
- Poté byla promyta pufrem P (30 ml), ke kterému byl přidán imidazol (30mM).
- Silikonová hadička byla sundána a byl eluován izolovaný protein pufrem P (400mM imidazol). Jednotlivé frakce s proteinem byly jímány do 10 mikrozkmavek.
- Byly eluovány vždy 0,5ml frakce, které byly nakonec analyzovány na gelu SDS–PAGE.

4.7.3 SDS polyakrylamidová elektroforéza

Metoda se používá pro analýzu denaturovaných proteinů, které jsou na gelu rozděleny dle molekulové hmotnosti. V této metodě se používaly již připravené gradientové gely NuPAGE® Novex 4–12% Bis–Tris gel.

Postup:

- Byla sestavena aparatura (XCELL SURELOCK™ MINI CELL)
- Do aparatury byl zasunut předpřipravený gel – NuPAGE® Novex 4–12% Bis–Tris gel.
- Do aparatury byl nalit pufr (1× NuPAGE® MES SDS Running buffer).
- Byly připraveny vzorky s pufrem NuPAGE® LDS Sample Buffer (zásobní roztok 4x) a následně dány do termostatu THERMOSTAT 5320 na 5 minut při 95 °C.
- Vzorky byly naneseny do jamek gelu, spolu s markerem Novex Prestained Protein Marker v jedné z jamek.
- Nakonec byla elektroforéza připojena na zdroj napětí (POWER PAC 3000) – napětí 200 V, čas 35 minut.
- Z aparatury byl vyndán gel a byl barven aplikací SimplyBlue™ SafeStain.

4.7.4 Barvení gelu za pomoci SimplyBlue™ SafeStain

Postup:

- Byla připravena kádinka s dH₂O (100 ml), do níž byl ponořen gel a 1 minutu byl zahříván pomocí mikrovlnné trouby.
- Poté byla kádinka třepána na překlopné třepačce 1 minutu (mírné otáčky).
- Voda byla odlita a byly 2x opakovány předchozí kroky.
- Do kádinky bylo přilito barvivo SimplyBlue™ SafeStain (20 ml) a opět byl gel zahříván pomocí mikrovlnné trouby (1 minuta).
- Kádinka byla třepána na překlopné třepačce dalších 10 minut.
- Nakonec byla ke gelu přidána dH₂O (100 ml) a kádinka byla dána na překlopnou třepačku, kde byla třepána 10 minut. Tento postup byl opakován do odbarvení gelu.

4.7.5 Dialýza

Tato metoda se používá pro výměnu pufrů. K výměně se používá dialyzační kazeta (Slide A Lyzer Dialysis Cassette, firma Thermo Scientific) s dvěma celulosovými membránami, které obsahují póry a jsou uzavřeny v plastovém rámu.

Dialyzační pufr (uchovávací pufr) v případě následného uchování proteinu v -20 °C:

50mM Tris-HCl (pH 8,0); 100mM NaCl; 3mM β-merkaptóetanol, 50% glycerol.

Dialyzační pufr v případě následného použití gelové permeační chromatografie:

50mM Tris-HCl (pH 8,0); 150mM NaCl; 3mM β-merkaptóetanol, 5% glycerol (u některých proteinů byl použit jako pufr pro gelové permeační chromatografie 1xP z důvodu srážlivosti proteinu).

Postup:

- Kazeta s vhodným objemem a velikostí pórů byla vložena do plastového plováku a hydratována 5 minut v dialyzačním pufru (500 ml).
- Do dialyzační kazety byl injekční stříkačkou přenesen roztok s izolovaným proteinem a byl z kazety vysát všechen vzduch.
- Poté byla kazeta ponořena do dialyzačního pufru a začala dialýza proteinu stálým mícháním (4 °C, 12 hodin), po 12 hodinách byl dialyzační pufr vyměněn a následně probíhala dialýza ještě 4 hodiny.

- Za pomoci injekční stříkačky byl protein vysán z kazety a přečištěn pomocí gelové chromatografie. Po dialýze do uchovávacího pufru byl protein uložen do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a byl připraven k použití. Čistota a koncentrace proteinu byla analyzována na gelu SDS–PAGE.

4.7.6 Gelová chromatografie

K přečištění proteinových konstruktů a rRNAP byla použita gelová chromatografie. Proteiny byly touto metodou rozděleny podle velikosti. Byla vybrána koncentrovaná frakce proteinu, u které nedocházelo ke srážení. Tato frakce (0,5 ml) byla přečištěna přístrojem ÄKTA pure 25 L na koloně superdex 200 increase 10/300 gl (0,5ml/min). Byly jímány 0,5ml frakce proteinu a následně byly analyzovány na SDS–PAGE.

4.7.7 Změření koncentrace proteinů

V této práci byla koncentrace proteinů měřena metodou podle paní Bradfordové (Bradford, 1976). Použité činidlo: Coomassie Brilliant blue G–250 (100 mg) s etanolem (50 ml), 85% H_3PO_4 (100 ml) a s dH_2O (doplněna do celkového objemu 1l).

Postup:

- K Bradfordovu činidlu (950 μl) byl přidán analyzovaný roztok a proteinem (10 μl) a H_2O (40 μl). Poté byla změřena OD.
- Hovězí sérový albumin (BSA) byl použit jako standard k vytvoření kalibrační přímky. Byly použity koncentrace ($\mu\text{g/ml}$): 0, 1, 3, 5, 10, a 20. Podle rovnice vzniklé přímky a porovnání s naměřenými hodnotami OD byla vypočítána koncentrace izolovaných proteinů u každého vzorku.

4.8 Transkripce *in vitro*

4.8.1 Transkripce

Byly prováděna takzvaná transkripce *in vitro*, a to za použití jádra RNAP (*B. subtilis*) izolovaného v této práci afinitní chromatografií. V každé reakci byl k jádru přidán jeden z konstruktů domén faktoru σ^A . Promotorová oblast P_{veg} byla vložena na plazmidu 1177 (P770), který byl v naší laboratoři již k dispozici (Tabulka 1). Reakce probíhala s radioaktivním zářičem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$. Zářič ^{32}P je v kategorii β a má poločas rozpadu 14,3 dne. Radioaktivní UTP, které bylo

zabudováno do řetězce syntetizované RNA, produkovalo záření, které absorbovala citlivá deska (BAS–MS2040). Bylo tak možné analyzovat množství produktu, a to denzitometricky pomocí skenování na přístroji MOLECULAR IMAGER FX.

Složení roztoků:

- Transkripční pufr (20x koncentrovaný): 20mM DTT, 800mM Tris–HCl s pH 7,9 a 200mM MgCl₂
- Diluční pufr: 100mM NaCl, 50mM Tris–HCl s pH 8,0 a 50% glycerol
- STOP pufr: 0,05% bromfenolová modř, 95% formamid, 20mM EDTA s pH 8,0 a 0,05% xylene cyanol

Postup:

- RNAP (300nM) byla rekonstituována s příslušným konstruktem faktoru σ v množstevním poměru 1:5 po dobu 30 minut (30 °C).
- Mezitím byl namíchán master mix společný pro všechny reakce (tabulka 8) (v experimentech zkoumajících vliv přítomnosti ATP či GTP, nebyl tento NTP přidán do mixu).
- Vzorky, které obsahovali vše až na RNAP, byly inkubovány 5 minut v 37 °C.
- Transkripce byla iniciována přidáním RNAP (samotné či rekonstituované se σ^A konstruktem) na finální koncentraci 30nM (byl přidán 1 μ l).
- Transkripce byla zastavena STOP pufrům přesně po 15 minutách (vzorek byl se STOP pufrům promíchán na vortexu).
- Nakonec byly vzorky analyzovány pomocí vertikálního polyakrylamidového gelu (PAA) (popsáno v následující kapitole).

Tabulka 8: Master mix pro jednu reakci – složení

Látka	Objem (μl)
20x transkripční pufr	0,5
20 mM ATP (200 μM)	0,1
20 mM CTP (200 μM)	0,1
20 mM GTP (200 μM)	0,1
1 mM UTP (10 μM)	0,1
α ³² P UTP	0,1
plasmid 100 ng/μl (s promotorem P _{veg})	1
100xBSA	0,1
KCl (150 mM)	1,5
iH ₂ O	Doplněno do objemu 9 μl

4.8.2 Vertikální PAA elektroforéza

Použité roztoky:

Pufr 10 × TBE: 0,9M Tris–HCl (pH 8,0); 0,02M EDTA; 0,9M H₃BO₃

Postup:

- Nejprve byla složena elektroforetická aparatura (OWL™ P10DS DUAL).
- Následně byly do aparatury vloženy 2 skla, mezi kterými byly na krajích 1mm tlusté „spacery“. Pod ně byla nalita agaróza (2%,).
- Jakmile agaróza zatuhla, mezi skla byl nalit gel PAA (10% APS 300 μl, 7% PAA 30 ml a TEMED 30 μl). Do gelu byl poté vložen hřeben, pomocí kterého jsou vytvarovány jamky.
- Když zatuhl gel (po cca1 hodině), do aparatury byl nalit pufr 1× TBE, byl vyndán hřeben a byly propláchnuty vytvarované komůrky opatrným pipetováním.
- Do jamek byly nanešeny vzorky, které byly získány metodou transkripce *in vitro* (vždy 10 μl).
- Připravená elektroforéza byla puštěna na 200 V na 2 hodiny.
- Po 2 hodinách byl vyjmut gel z aparatury, dán na filtrační papír, poté byl zakryt fólií a sušen v sušičce MIDIDRY D62.

- Sušení gelu probíhalo ve vakuu při 90 °C přibližně 1 hodinu. Gel byl ponechán ještě další hodinu na sušičce, aby gel dostatečně vychladl.
- Gel byl vložen do kazety (BAS-MS2040) a v této kazetě byl v kontaktu s citlivou deskou. Následně byla deska snímána skenerem MOLECULAR IMAGER FX a v programu Bio-Rad Quantity One byly analyzovány výsledky.

4.8.3 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Metoda EMSA se používá pro analýzu nativních proteinů, jejich interakcí a interakcí s DNA. Byl používán komerční gel zakoupený od firmy Invitrogen (NativePAGE™ 4–16% Bis-Tris Protein Gel) a také komerční pufry.

- Byla sestavena aparatura XCELL SURELOCK™ MINI CELL, do té byl vsunut předpřipravený gel NativePAGE™ 4–16% Bis-Tris Protein Gel.
- Připravená aparatura byla z vnějších stran komory naplněna pufrem 1× NativePAGE™ Running Buffer (ze zásobního roztoku 20×).
- Dovnitř komory ke gelu byl nalit modrý NativePAGE™ Cathode Buffer.
- Z gelu byl vyndán hřeben a jamky důkladně propláchnuty pipetou.
- U vzorků byla provedena rekonstituce (viz sekce 4.8.1).
- Ke vzorkům bylo připipetováno potřebné množství pufru NativePAGE™ Sample Buffer (4×).
- Vzorky byly naneseny na gel. Množství nanesených proteinů bylo vždy 300 nM.
- Nakonec byla elektroforéza připojena na zdroj napětí a puštěna na 150 V po dobu 130 minut. Po celou dobu byla aparatura chlazená ledem.
- Gel byl následně vyjmut z aparatury, přendán do kádinky, třikrát zahřát v mikrovlnné troubě (1 minutu) a třikrát vypláchnut destilovanou vodou.
- Poté byl gel barven pomocí barviva Gel Red (Gel RED byl naředěn v pufru 1x TBE 1:10 000) po dobu 20 minut za mírného třepání.
- Gel byl vypláchnut destilovanou vodou a analyzován na UV lampě (název stroje??), kde byla analyzována poloha DNA.
- Nakonec byl gel obarven barvivem SimplyBlue™ SafeStain (viz sekce 4.7.5) a byla analyzována poloha proteinů.

4.8.4 Nitrocellulose filter binding assay

Metoda se používá pro analýzu interakcí nativních proteinů a jejich interakcí s DNA.

Použité roztoky:

- Transkripční pufr: 150mM KCl, 800mM Tris-HCl s pH 8 a 200mM MgCl₂
- Diluční pufr: 2M NaCl, 2M Tris-HCl s pH 8,0 a 50% glycerol

4.8.4.1 Radioaktivní značení promotorů

- Metodou PCR byly vytvořeny promotorové sekvence *rrnBPI* a P_{veg} .
- Byla namíchána směs (viz tabulka 9), ve které bylo použito radioaktivní [γ -32P]-ATP pro první sadu vzorků a neradioaktivní ATP pro druhou sadu. Touto metodou bylo zaměněno γ -ATP na 5' konci promotorové sekvence za radioaktivní [γ -32P]-ATP.

Tabulka 9: Složení směsi pro radioaktivní značení promotorů

Látka	Množství (μ l)
T4 DNA kináza	1,5
T4 DNA kinázový <i>exchange</i> pufr	3
Promotor	15
[γ -32P]-ATP/ neznačené ATP	4,5
H ₂ O	6

- Následně byla směs dána na 60 minut do 37 °C (v termobloku THERMO 120).
- Promotory byly přečištěny (zbaveny primerů) komerčním kitem (viz následující sekce).

4.8.4.2 Přečištění promotorů

K přečištění naznačených promotorů byl použit QIAquick Nucleotide Removal Kit od firmy QIAGEN.

- Nejprve byl ke vzorkům přidán PNI pufr (10x objem vzorku).
- Tato směs byla napipetována na kolonku.
- Poté byla směs centrifugována po dobu 1 minuty a proteklá směs byla odlita.
- Na kolonku byl následně napipetován PE pufr (500 μ l) a takto byla znovu centrifugována 1 minutu. Tento krok byl opakován dvakrát. Nakonec byl proteklý pufr odlit.

- Kolonka byla centrifugována 1 minutu naprázdno.
- Na kolonku byl napipetován pufr EB (30 μ l) a byl eluován do nové mikrozkuhavky.
- Neradioaktivní část přečištěných promotorů byla puštěna na horizontální agarovou elektroforézu pro odhadnutí koncentrace (viz sekce 4.6.2).
- Radioaktivní část promotorů byla použita v metodě Nitrocellulose filter binding assay.

4.8.4.3 Nitrocellulose filter binding assay

- Nejprve byl namíchán master mix (80 μ l pro každou reakci), viz Tabulka 10.

Tabulka 10: Složení master mixu

Látka	Množství
1x transkripční pufr	8 μ l
promotorová DNA (značená)	100 pM
BSA (100 μ g/ml)	10 μ l
ME	10 mM
H ₂ O	doplněno do 80 μ l

- Byly připraveny jednotlivé proteinové konstrukty. U vzorků, kde to bylo požadováno, byla provedena rekonstituce (viz sekce 4.8.1).
- Tyto konstrukty byly rozděleny do jednotlivých reakcí, a to na konečnou koncentraci 100 nM (byly naředěny dilučním pufrem) – konečný objem reakce byl 20 μ l.
- K jednotlivým reakcím byl přimíchán master mix (80 μ l) a následně byly tyto reakce inkubovány 20 minut v 37 °C. Od chvíle připipetování master mixu bylo k práci se vzorky využíváno ochranné plexisklo a ochranné brýle.
- Transkripční pufr byl 10x naředěn vodou, rozlit do 10ml falkonek po 3 ml na každou reakci.
- Do misky s naředěným transkripčním pufrem byly ponořeny filtry (MF–Millipore™ Membrane Filters od firmy Millipore – 0,45 μ m HA), jeden pro každou reakci.
- Byla připravena filtrační baňka, na kterou bylo napojeno odsávání. Navrch bylo dáno kruhové těsnění a válec s plochou pro filtr. Celá aparatura byla na nepropustném tácu a byla obklopena plexisklem.

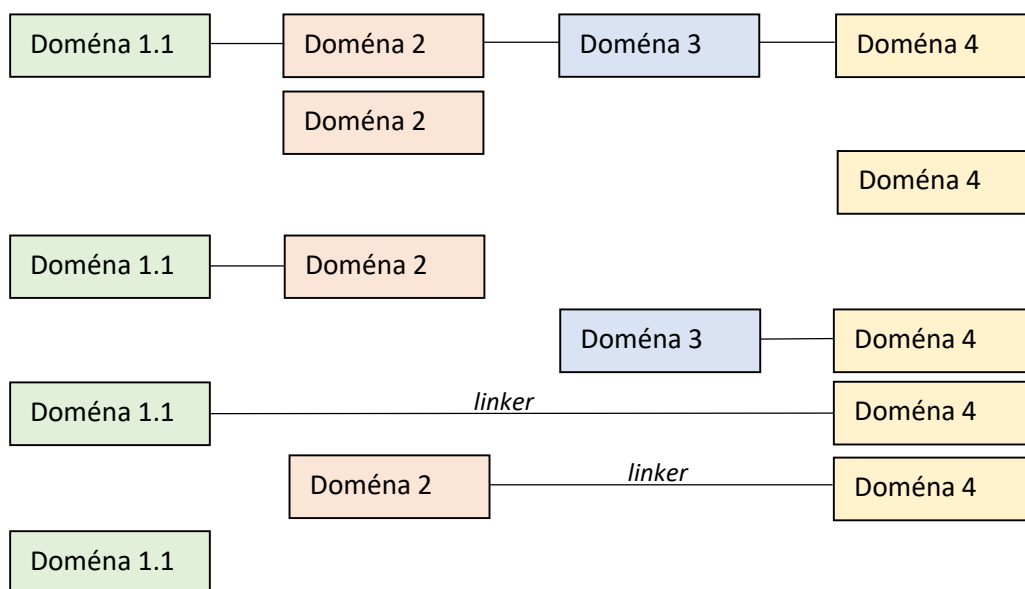
- Bylo zapnuto odsávání, poté byl filtr vložen pinzetou na horní plochu válce, kde se přisál. Následně byly kraje filtru řádně utěsněny šroubovacím válcem s dírou uprostřed.
- Na střed filtru byl napipetován vzorek v několika kapkách. Poté byl filtr promyt 3 ml naředěného transkripčního pufru.
- Těsnicí válec byl odšroubován a filtr dán na alobal. Takto se postupovalo u všech vzorků.
- Filtry byly vysušeny pod lampou a překryty fólií.
- Filtry byly takto uloženy do kazety, kde byly exponovány citlivé desce, ta byla poté snímána skenerem MOLECULAR IMAGER FX. V programu Bio–Rad Quantity One byly analyzovány výsledky.

5 Výsledky

5.1 Příprava konstruktů faktoru σ^A a test jejich vzájemné vazby

5.1.1 Klonování a purifikace konstruktů faktoru σ^A z *B. subtilis*

Byly navrženy a samostatně naklonovány doménové konstrukty faktoru σ^A (viz Obrázek 12). Jednotlivě byly naklonovány doména 2 a 4. Dále byly společně klonovány doména 1.1 s doménou 2 a domény 3 a 4. Byly navrženy také chiméry spojené *linkerem* (flexibilní spojka – byla použita část domény 3), a to domény 1.1 a 4 a domény 2 a 4. Doména 1.1 byla v naší laboratoři již k dispozici.



Obrázek 12: Znázornění doménových konstruktů faktoru σ^A .

Jako první je znázorněn celý faktor σ^A , pod ním je následně zobrazena doménová skladba jednotlivých klonovaných konstruktů.

Byly navrženy a objednány primery na PCR amplifikaci úseků genů kódujících domény faktoru σ^A (*sigA*) viz Tabulka 11. Kromě úseků přirozeně sousedících domén byly amplifikovány společně také domény 1.1 a 4 a domény 2 a 4. Nejprve byly amplifikovány jednotlivé domény s tím, že navržené primery obsahovaly navíc přesahující sekvenci. Tyto sekvence byly vždy komplementární u dvojic domén, které spolu měly tvořit konstrukt. Po první amplifikaci byly

jednotlivé dvojice domén amplifikovány spolu, koncové komplementární sekvence se spárovaly a bylo dosyntetizováno dvojlákno DNA. Takto byl vytvořen konstrukt domén 1.1 a 4 a konstrukt domén 2 a 4. Mezi doménami vždy leží sekvence vytvořená přesahy. Jedná se o sekvenci části domény 3 (Glu na 57. pozici – Asp na 75. pozici), která funguje jako flexibilní spoj mezi doménami.

Reverzní primery v sobě neměly vložen stop kodon, jelikož byla zvolena izolace histidinovou kotvou (His–tag). Kotva se exprimuje na konci proteinu, který je vložen do plazmidu pET–28b(+).

Tabulka 11: Použité primery a restriční endonukleázy – amplifikace konstruktů genu *sigA*

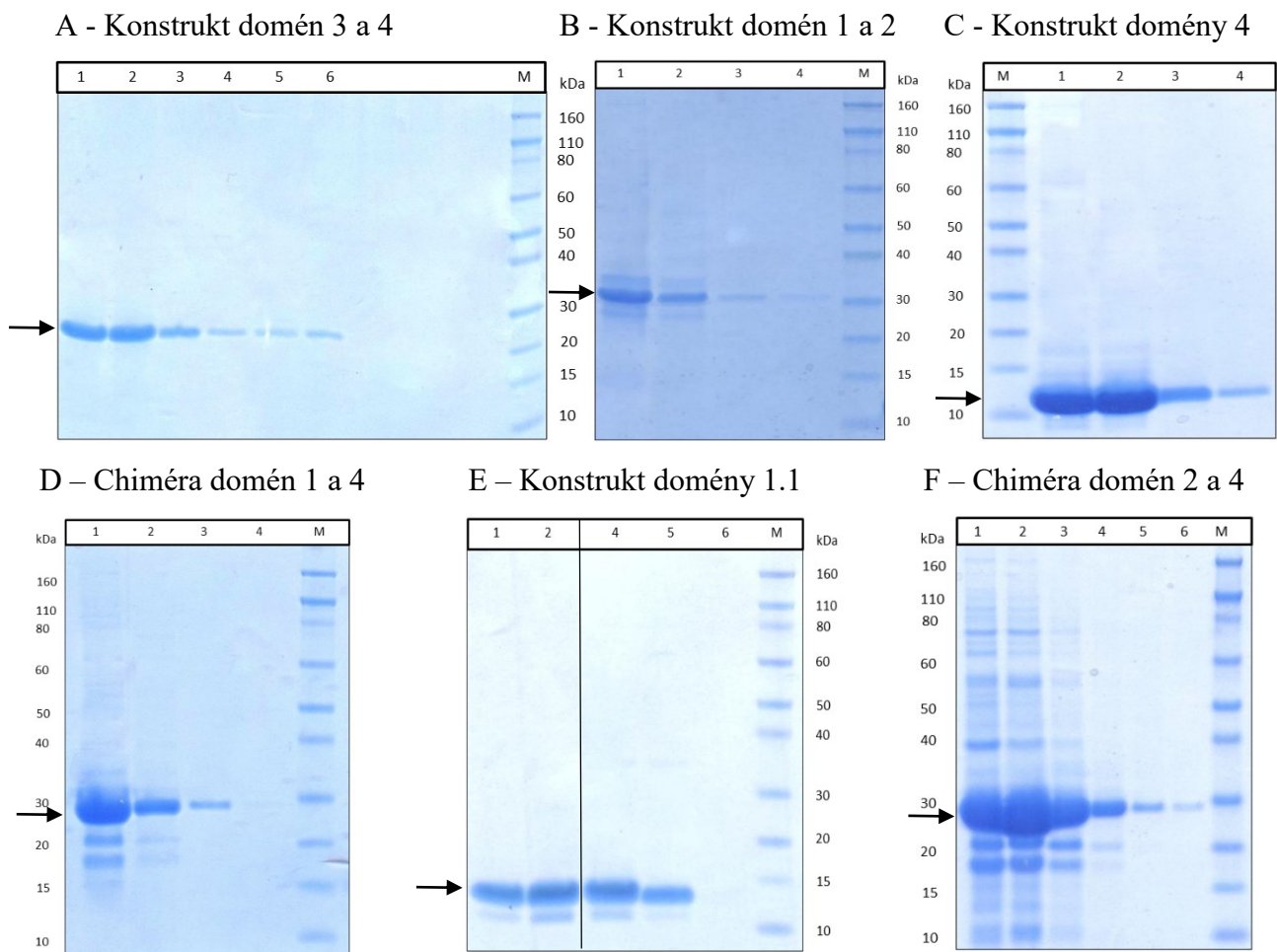
Číslo	Název	Sekvence primeru	RE
1262	Domény 1 a 2 F	cgccatggctgataaacaacccacgagaca	NcoI
1987	Domény 1 a 2 R	ccggctcgagctgatcggcaatggcgcg	XhoI
1986	Doména 2 F	cgccgcatggttaacctctttctgcaaaag	NcoI
1987	Doména 2 R	ccggctcgagctgatcggcaatggcgcg	XhoI
1988	Doména 3 a 4 F	cgccgcatgggcgagaacgatccggattc	NcoI
1990	Doména 3 a 4 R	ccggctcgagtcaaggaaatcttcaaacg	XhoI
1989	Doména 4 F	ggcgcgcatatgacttcacctctgaccacgc	NcoI
1990	Doména 4 R	ccggctcgagtcaaggaaatcttcaaacg	XhoI
1993	Domény 1 a 4 F	gtatgtatttaaaggaaatcggctggacttcacctctgaccacgc	NcoI
1994	Domény 1 a 4 R	gcgtggtcagaaggtgaagtccgaccgatttctttaaatacatc	XhoI
1991	Domény 2 a 4 F	gccgatcaggcgagaacggagccggtatctctggaaac	NcoI
1992	Domény 2 a 4 F	gtttccagagataccggctccgttctgcctgatcggcaatg	XhoI

Amplifikované geny byly analyzovány na horizontální agarové elektroforéze a následně izolovány z gelu. Poté byly štěpeny restričními endonukleázami *NcoI* a *XhoI* a následně byly jednotlivé konstrukty vkládány do plazmidu pET–28b(+). Takto upravené plazmidy byly transformovány do buněk *E. coli* (kmen DH5 α). Zda byly konstrukty vloženy správně a mají správnou sekvenci bylo zkontrolováno sekvenací. Byly udělány glycerinové konzervy s transformovanými buňkami a byly zapsány do laboratorního seznamu.

Poté byl k transformaci ověřeným plazmidem použit expresní kmen *E. coli* (DE3). Buňky s vneseným konstruktem byly uchovány pomocí glycerinové konzervy (viz kapitola 4.4 Bakteriální kmeny). Kmen byl kultivován v 1l média LB s kanamycinem (50 μ g/ml) do OD 0,6. Poté byla

indukována exprese proteinových konstruktů pomocí 0,8 mM IPTG. Kultura byla třepána další 3 h, poté byla lyzována sonikací a tento sonikát byl podroben centrifugaci. Všechny konstrukty σ byly izolovány přes histidinovou kotvu, za použití afinitní chromatografie. Byla použita agaróza Ni-NTA, jelikož se k ní histidinová kotva svým C-koncem váže.

Postupně byly jímány frakce (0,5 ml) z chromatografické kolonky, u kterých byla přítomnost proteinu ověřena měřením dle Bradfordové. Koncentrované frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 13). Izolace samotné domény 2 byla neúspěšná.

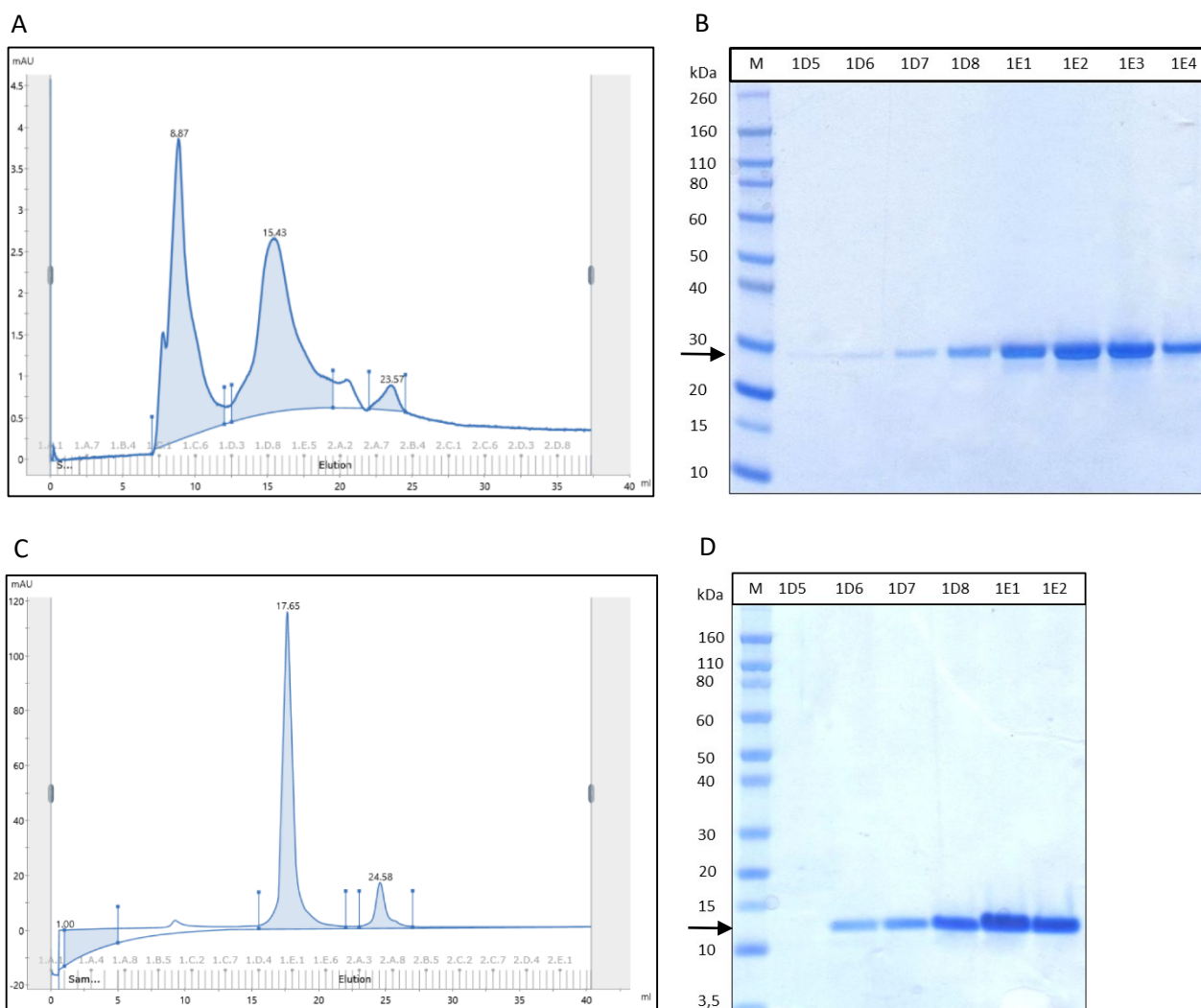


Obrázek 13: Analýza elučních frakcí po izolaci proteinových konstruktů afinitní chromatografií pomocí SDS-PAGE

Jímané proteinové frakce z chromatografické kolony na proteinovém gelu SDS-PAGE, písmenem M je značen marker. Písmena A – F označují jednotlivé proteinové konstrukty.

Na základě analýzy na SDS–PAGE byly koncentrované frakce vybraných konstruktů (domény 1.1 a chiméry 2 a 4) pomocí dialýzy přeneseny do pufru pro následné přečištění gelovou permeační chromatografií (Obrázek 14). U některých konstruktů přečištění nebylo možné z důvodu vysoké srážlivosti proteinu, a to buď ve fázi eluce, nebo později při dialýze.

Po přečištění gelovou chromatografií byly proteinové konstrukty (jímané frakce) opět analyzovány pomocí SDS–PAGE (Obrázek 14) a dialýzou přeneseny do uchovávacího pufru pro delší skladování v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 14: Gelová chromatografie konstruktů chiméry 2 a 4 (A a B) a domény 1.1 (C a D)

(A) a (C) Chromatogram z gelové chromatografie. Na ose x je vyznačen počet jímaných ml do jednotlivých frakcí. Na ose y jsou jednotky mAU (absorpční jednotky UV λ 280nm)

(B) a (D) Analýza frakcí pomocí SDS–PAGE

Tabulka 12 shrnuje, které proteinové konstrukty byly izolovány a které z nich byly purifikovány gelovou chromatografií a použity k experimentům.

Tabulka 12: Výsledky izolace doménových konstruktů

Doménový konstrukt	Izolace	Přečištění	Použito při experimentech
Domény 2 a 4	+	+	+
Doména 1.1	+	+	+
Domény 1 a 2	+	- (srážlivost)	-
Domény 3 a 4	+	- (srážlivost)	-
Domény 1 a 4	+	- (srážlivost)	-
Doména 4	+	- (srážlivost)	-
Doména 2	-	-	-

5.1.2 Příprava promotorových sekvencí P_{veg} a *rrnBP1* z *B. subtilis* pro Nitrocellulose filter binding assay

Byly navrženy primery na PCR amplifikaci promotorových sekvencí *B. subtilis*, P_{veg} a *rrnBP1* (viz tabulka 13).

Tabulka 13: Seznam použitých primerů pro amplifikaci konstruktů promotorových sekvencí P_{veg} a *rrnBP1*

Číslo	Název	Sekvence primeru
2297	<i>rrnBP1</i> F	
2298	<i>rrnBP1</i> R	
2299	P_{veg}	
2300	P_{veg}	

Proběhla PCR amplifikace promotorů, které byly následně izolovány z gelu.

K vytvoření radioaktivně značených promotorů byla použita metoda přímého radioaktivního značení (sekce 4.8.4.3), následně byly promotorové sekvence použity v metodě Nitrocellulose filter binding assay.

5.1.3 Test vazby domény 1.1 na doménový konstrukt domén 2 a 4 metodou Nitrocellulose filter binding assay

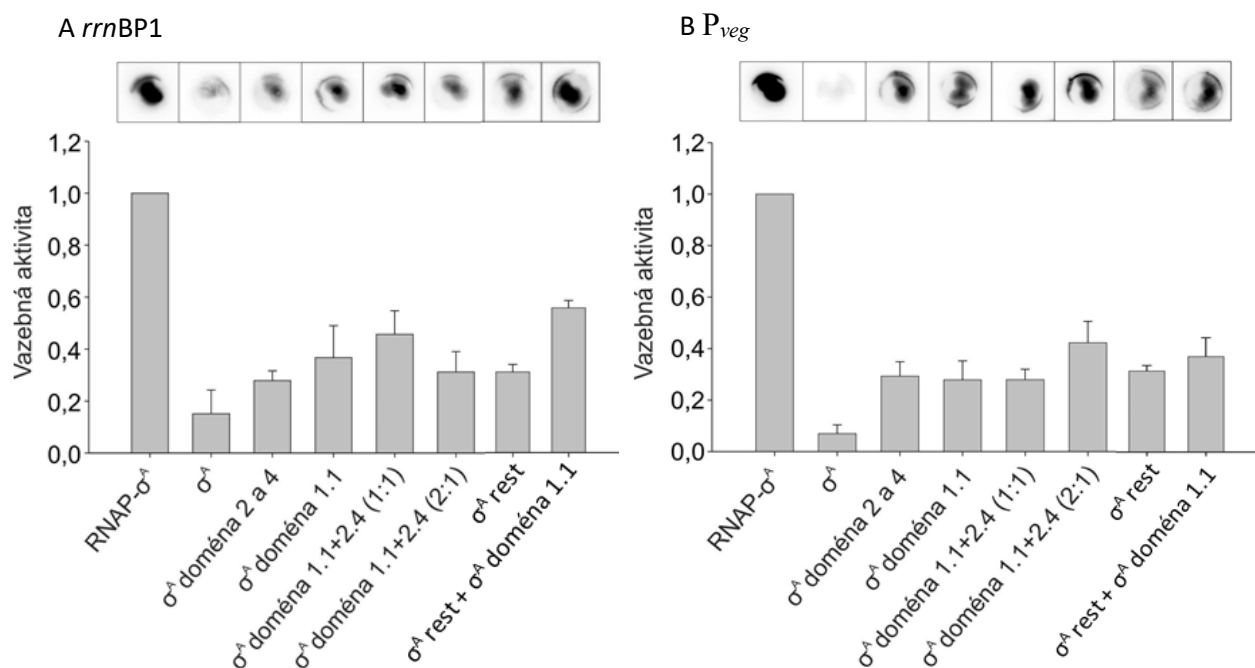
V tomto experimentu byly sledovány interakce RNAP a konstruktů faktoru σ^A s DNA. Pokud daný proteinový konstrukt vázal promotorovou DNA, neprotekla filtrem, a tudíž mohla být na filtru detekována její radioaktivita. Pokud k interakci nedošlo, nenavázaná DNA filtrem protekla.

Byla analyzována vazba autoinhibiční domény 1.1 na domény 2 a 4, kde se nachází sekvence zajišťující vazbu na promotor (obrázek 15).

Proběhly dvě sady pokusů, v prvním pokusu byla porovnána intenzita vazby domén 2 a 4 bez autoinhibiční domény 1.1 a posléze s dvěma různými koncentracemi domény 1.1. Ve druhém pokusu byla analyzována vazba domény 1.1 na σ^A rest (σ^A bez domény 1.1) v poměru 1:5. V každém z pokusů byla použita pozitivní i negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byl použit RNAP holoenzym a jako negativní kontrola byl použit faktor σ^A . K pozitivní kontrole byla intenzita vazby vzorků vztažena. Při každém experimentu byl použit takzvaný *blank* (čistý pufr bez vzorku). Radioaktivita *blanku* byla odečtena jako pozadí od všech vzorků.

V reakcích byly použity radioaktivně značené $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ promotory *rrnBP1* a P_{veg} . Programem Bio–Rad Molecular Imager FX byla snímána primární data a poté byla v programu Bio–Rad Quantity One kvantifikována.

Tyto experimenty měly ukázat, zda doména 1.1 plní svou inhibiční funkci a zabraňuje zbylým doménám ve vazbě na promotor.



Obrázek 15: Vazba domén 2 a 4 na promotor *rrnBP1* (A) a P_{veg} (B) v závislosti na koncentraci domény 1.1

Metoda Nitrocellulose filter binding assay. V řádku nahoře jsou primární data. Pod nimi je graf jejich kvantifikace, která vychází ze čtyř opakování.

Pozitivní kontrola: RNAP – σ^A (holoenzym)

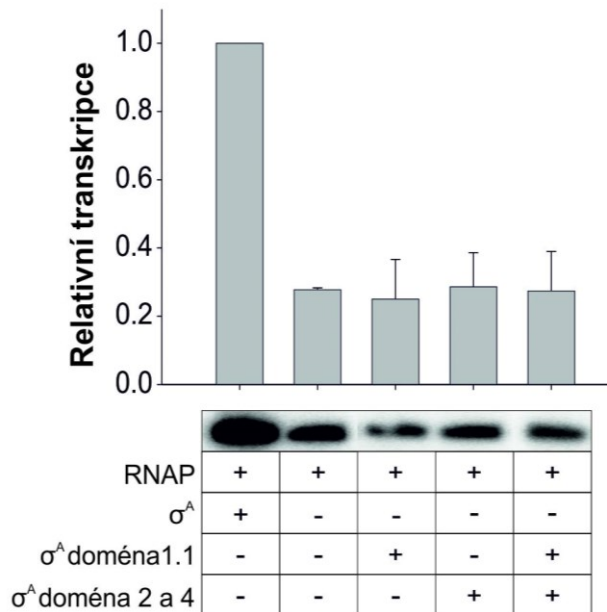
Negativní kontrola: σ^A (celý protein)

Z analýzy výsledků Nitrocellulose filter binding assay vyplynulo, že samostatná autoinhibiční doména 1.1 neváže konstrukt domén 2 a 4 a nezabraňuje jeho vazbě na promotor. Výsledky naopak ukázaly, že se sama doména 1.1 váže na promotorovou sekvenci. Pro potvrzení vazby domény 1.1 na promotorovou DNA byla s vybranými konstrukty σ provedena EMSA. Tato metoda potvrdila předchozí výsledek, nicméně vazba domén na DNA byla ve všech případech velmi slabá, blízko detekční úrovně.

Konstrukty byly následně otestovány v transkripci *in vitro*, aby mohla být potvrzena či vyvrácena interakce mezi doménami 2 a 4 a doménou 1.1 a současně aby mohla být analyzována jejich interakce s RNAP. K tomuto účelu byla použita wt RNAP z *B. subtilis* a později také rRNAP vytvořená v této práci.

5.1.5 Transkripce *in vitro* za použití konstruktů faktoru σ^A

Tento experiment měl za cíl analyzovat vazbu domény 1.1 na konstrukt domény 2 a 4 při transkripci *in vitro* v přítomnosti RNAP z *B. subtilis*. Byla provedena rekonstituce proteinových konstruktů a transkripce *in vitro* (Obrázek 16).



Obrázek 16: Test vazby domény 1.1 na konstrukt domén 2 a 4 za pomoci transkripce

Na obrázku je na ose y znázorněna intenzita transkripce a na ose x jsou rozepsané jednotlivé vzorky. Pod osou x jsou ukázána primární data z transkripčního gelu. Jedná se o vzorky s wt RNAP. Jako templát byl použit promotor P_{veg} , který byl přidán na plazmidu 1177 (p770) (Tabulka 1).

Transkripce fungovala správně, jelikož vzorek s rekonstituovanou RNAP– σ^A vykazoval vysokou transkripci a vzorek se samotnou RNAP vykazoval transkripci o poznání nižší. Jelikož byla použita wt RNAP, držela se stálá hladina transkripce i bez přítomnosti σ^A , což byl následek kontaminace izolované RNAP přirozeně se vyskytující σ^A v buňce.

Analýza dat dále ukázala, že přidání domény 1.1, konstruktů domén 2 a 4 či jejich kombinace, výrazně neovlivní intenzitu transkripce.

5.2 Příprava rRNAP z *B. subtilis* v *E. coli*

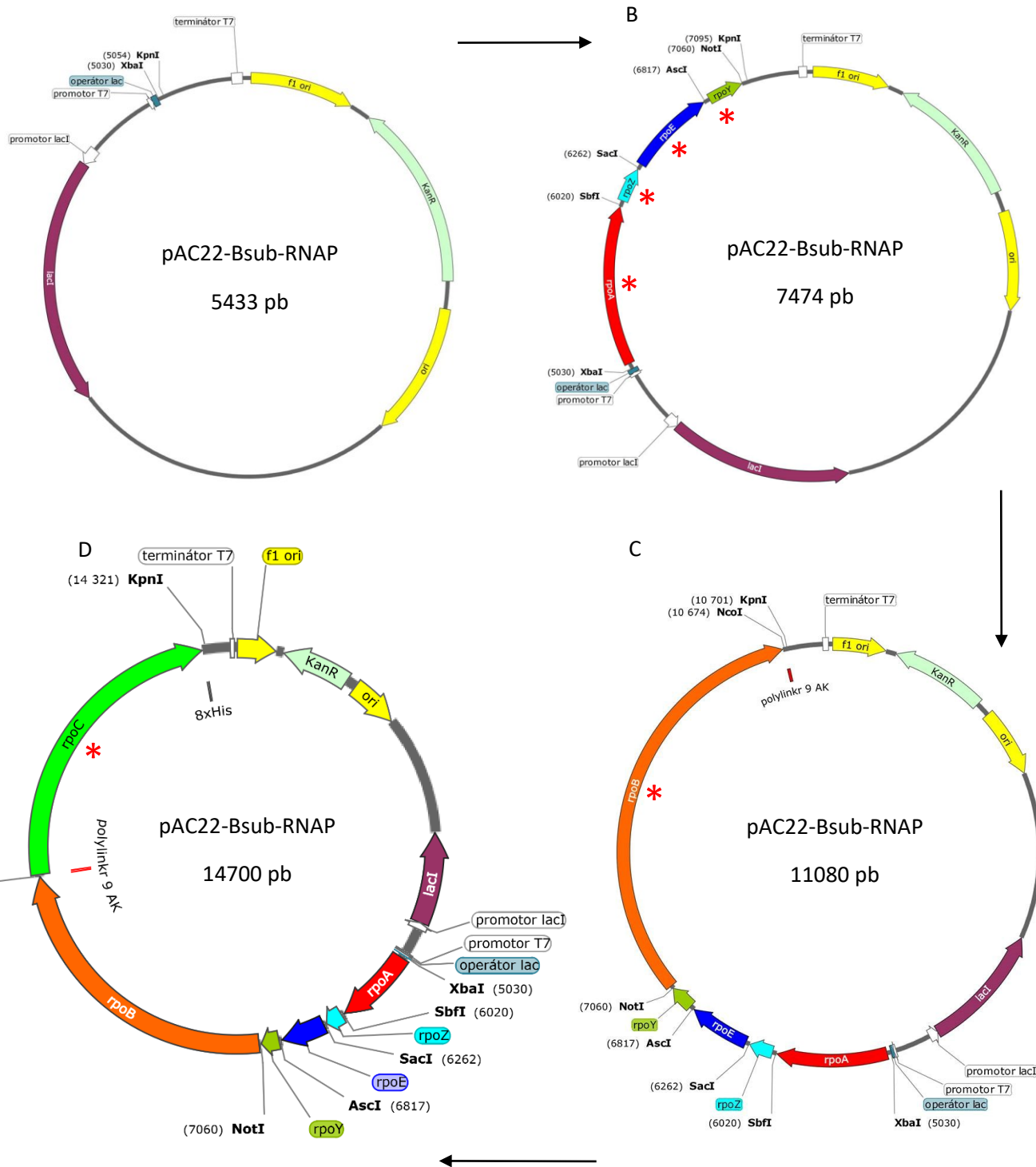
Byl vytvořen plazmidový konstrukt obsahující všechny podjednotky RNAP z *B. subtilis* pro expresi rRNAP v *E. coli*. Postupně byly vloženy jednotlivé geny pro podjednotky RNAP do vektoru pAC22 (viz Obrázek 17). Všechny vložené geny pro podjednotky byly přepisovány do jednoho dlouhého transkriptu. Jednotlivé geny pro podjednotky obsahovali svou Shine-Dalgarnovu sekvenci (SD sekvenci) a stop kodon. Pouze podjednotky β a β' byly exprimovány do proteinu společně, jelikož sdíleli jednu SD sekvenci a stop kodon. Mezi nimi byl vložen linkr dlouhý 9 AK.

Byly navrhnuty primery na PCR amplifikaci genů kódujících podjednotky RNAP. Reverzní primer podjednotky β' byl navržen s přidáním sekvence histidinové kotvy (His-tag) pro pozdější izolaci. Geny kódující domény α , ω , δ a ε byly nasyntetizovány firmou Invitrogen jako jeden konstrukt (úsek DNA). Konstrukt byl štěpen RE *XbaI* a *NotI* a vložen do plazmidu pAC22. Správnost sekvence byla ověřena sekvenací.

Geny pro podjednotky β a β' byly jednotlivě amplifikovány metodou PCR s mírně odlišným programem od klasické PCR (tabulka 14). Použité primery a RE viz Tabulka 15.

Tabulka 14: Program PCR použitý u podjednotek β a β'

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (s)
1	95	120
1	95	15
	56	30
	72	60
5	94	15
	50	30
	68	135
24	94	15
	48	30
	68	135



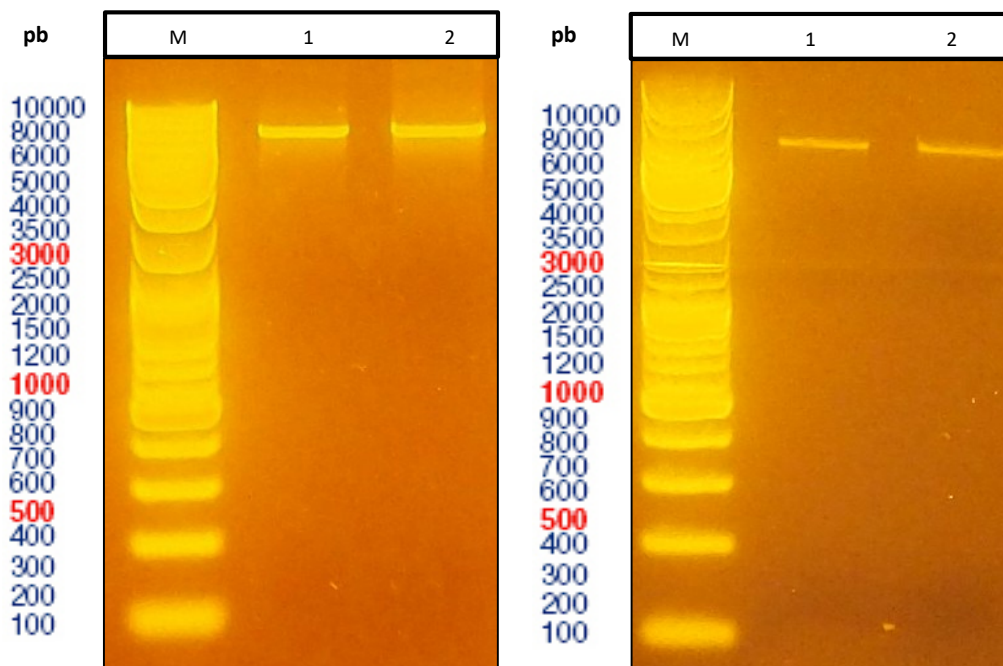
Obrázek 17: Schéma postupu vkládání podjednotek RNAP do vektoru pAC 22

- A) Plazmid pAC 22 (nově vložené konstrukty jsou označeny *)
- B) Byl vložen konstrukt genů pro podjednotky α , ω , δ a ϵ (geny *rpoA*, *rpoZ*, *rpoE*, *rpoY*)
- C) Byl vložen amplifikovaný úsek genu pro podjednotku β (gen *rpoB*) a polylinkr (9AK)
- D) Byl vložen amplifikovaný úsek genu pro podjednotku β' (gen *rpoC*)

Tabulka 15: Použité primery a restriční endonukleázy – amplifikace podjednotek RNAP β a β'

Číslo	Název	Sekvence primeru	RE
2684	β F	ggtctagagcggccgcttaagaaggagatatctatgacaggcaactagtc	NotI
2685	β R	cgcggatccggtaccccatggcgcgcaagtctttgttactacatcg	NcoI
2686	β' F	gcgccatggtggctcgggtgcaatgctagatgtgaacaattttgag	NcoI
2687	β' R	gcggtaccttagtgatggtgatggtgatggtgatgttcaaccgggacatcatcg	KpnI

Amplifikované geny pro podjednotky β a β' byly puštěny na horizontální agarovou elektroforézu (obrázek 18) a následně izolovány z gelu. Poté byly štěpeny restričními endonukleázami *NotI* a *NcoI*, *NcoI* a *KpnI* a následně ligací vloženy do plazmidu pAC22, kde již byl vložen konstrukt α , ω , δ a ϵ . Plazmidy byly následně vneseny do buněk *E. coli* (kmen DH5 α) a z buněk byly vytvořeny glycerinové konzervy. Vložení bylo pokaždé zkontrolováno pomocí sekvenace.



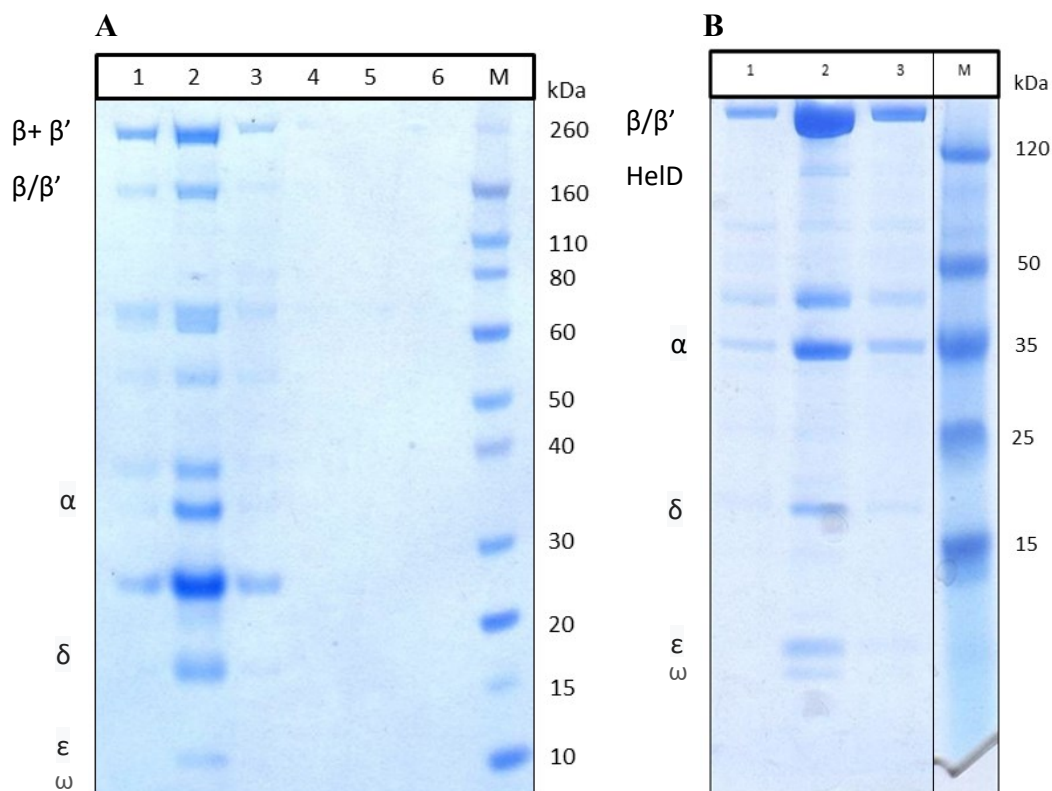
Obrázek 18: Agarózový gel s podjednotkami β (vlevo) a β' (vpravo) po PCR

Na gel byly puštěny 2 μ l podjednotek β (vlevo) a β' po PCR. Jako marker (M) byl použit GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Plazmid byl poté transformován do expresního kmene *E. coli* DE3 (BL21). Buňky s vneseným konstruktem byly uchovány pomocí glycerinové konzervy (viz kapitola 4.4 Bakteriální kmeny). Výsledný kmen byl kultivován v 1 l LB média s kanamycinem (50 μ g/ml) do OD 0,6. Poté byla

pomocí IPTG indukována exprese podjednotek RNAP. Kultura byla třepána další 3 h, poté byla lyzována sonikací a tento sonikát byl podroben centrifugaci. Všechny podjednotky byly izolovány přes histidinovou kotvu, za použití afinitní chromatografie. Byla použita agaróza Ni–NTA, jelikož se k ní histidinová kotva svým C–koncem váže.

Byly jímány frakce (0,5 ml) z chromatografické kolonky, u kterých byla přítomnost proteinu ověřena měřením dle Bradfordové. Poté byly koncentrované frakce analyzovány na SDS–PAGE (Obrázek 19). Pro porovnání byla zároveň izolována wt RNAP z *B. subtilis*.

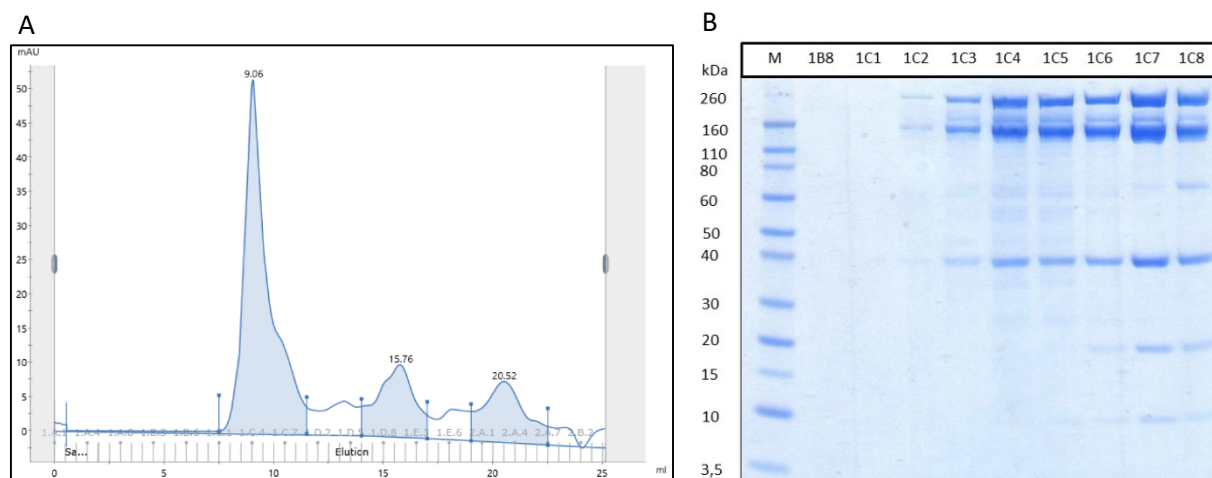


Obrázek 19: Jímané frakce RNAP – izolace afinitní chromatografií

Jímané proteinové frakce z chromatografické kolony na proteinovém gelu SDS–PAGE. Písmenem M je označen marker. Obrázek A) frakce rRNAP, B) frakce wt RNAP (zde byl použit Pierce™ Prestained Protein MW Marker firmy Thermo Scientific).

Na základě této analýzy byly koncentrované frakce rRNAP pomocí dialýzy přeneseny do pufru pro následné použití gelové permeační chromatografie a proteiny dále uchovávány ve 4 °C. Pro přečištění proteinů byla poté provedena gelová chromatografie (Obrázek 20).

Po přečištění gelovou chromatografií byly proteiny (jímané frakce) opět analyzovány pomocí SDS–PAGE (viz Obrázek 20) a dialýzou přeneseny do uchovávacího pufru pro delší skladování v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Wt RNAP byla dialýzou přenesena ihned po izolaci afinitní chromatografií do uchovávacího pufru a analyzována pomocí SDS–PAGE.



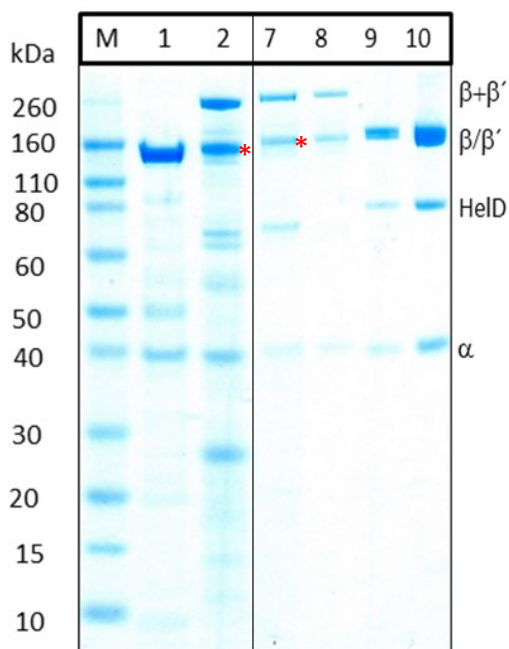
Obrázek 20: Gelová chromatografie RNAP

(A) Chromatogram z gelové chromatografie

Na ose x je vyznačen počet jímaných ml do jednotlivých frakcí. Na ose y jsou jednotky mAU (absorpční jednotky UV λ 280nm)

(B) Analýza frakcí pomocí SDS–PAGE

Jelikož analýzou na SDS–PAGE bylo zjištěno, že kromě komplexu $\beta + \beta'$ se na gelu objevuje také o něco menší proužek, byl tento komplex podroben analýze MS na servisním pracovišti MBÚ (obrázek 21).



Obrázek 21: Srovnání frakcí RNAP wt a rRNAP

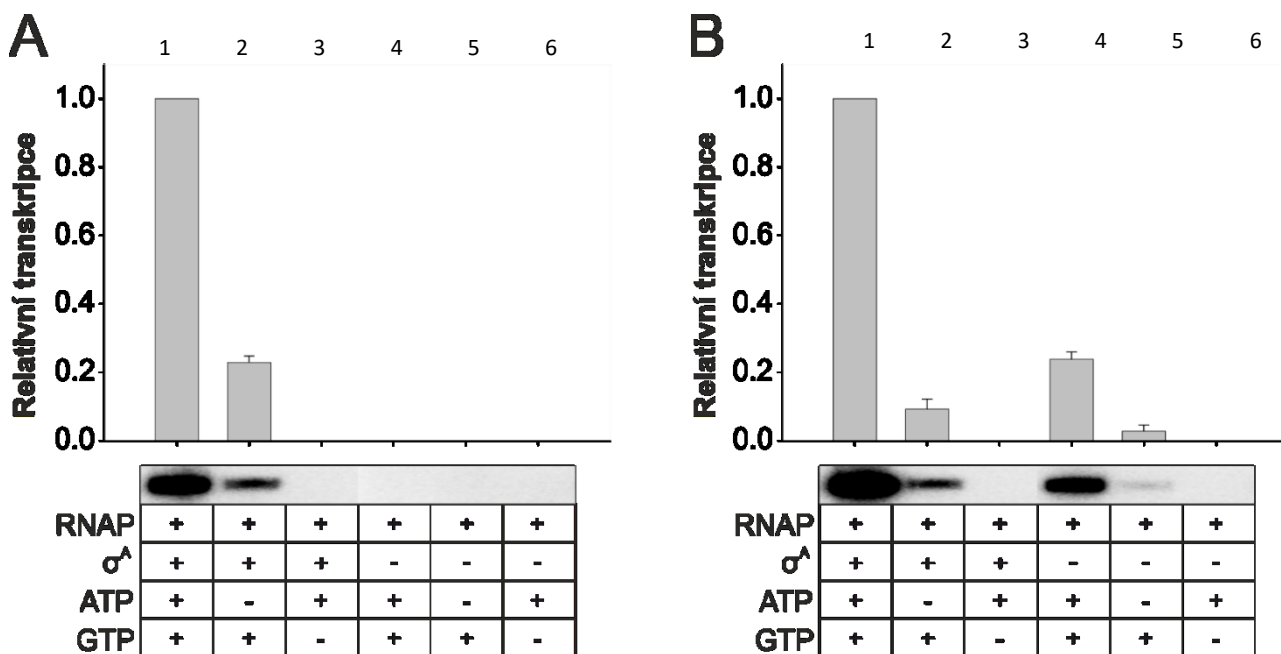
Vzorky, u kterých byla provedena analýza MS z SDS–PAGE proteinového gelu jsou označeny *. M označuje marker.

Pořadí vzorků:

1) RNAP z *B. subtilis* – wt (tato RNAP obsahuje podjednotku HelD) 2) RNAP z *B. subtilis* po izolaci afinitní chromatografií (izolace z *E. coli*), 7 a 8) RNAP z *B. subtilis* po gelové chromatografii (izolace z *E. coli*), 9 a 10) *E. coli* RNAP holoenzym.

Analýzou MS bylo zjištěno, že se nejedná o podjednotku β či β' z *E. coli*, ale je to odštěpená část dvojproteinu $\beta + \beta'$ z *B. subtilis*.

S klonovanou rRNAP byla následně provedena transkripce *in vitro* (Obrázek 22) pro ověření aktivity RNAP. Také byla testována transkripce bez přítomnosti GTP a ATP. Pro srovnání byla transkripce prováděna také s wt RNAP, která byla v naší laboratoři k dispozici.



Obrázek 22: Transkripce *in vitro* s rRNAP z *B. subtilis* a s wt RNAP

A – vzorky s rRNAP

B – vzorky s wt RNAP

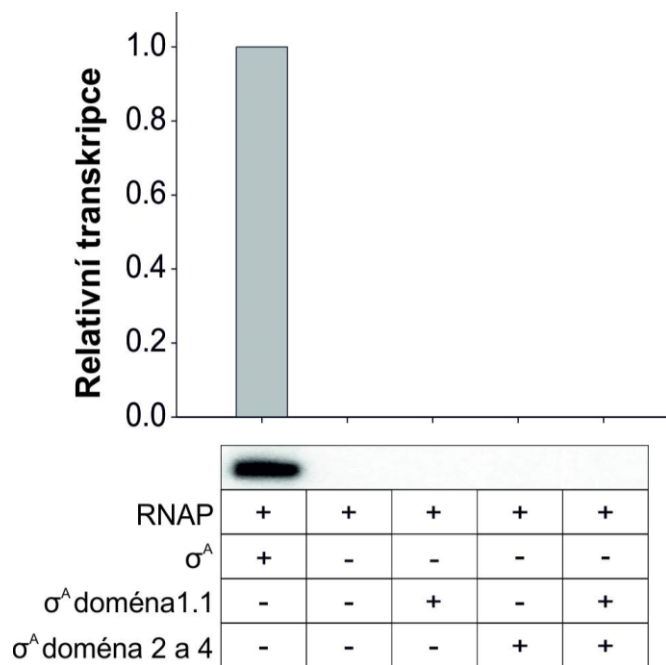
Na ose y je znázorněna intenzita transkripce a na ose x jsou rozepsané jednotlivé vzorky. Pod osou x jsou ukázána primární data z transkripčního gelu. Jako templát byl použit promotor P_{veg} , který byl přidán na plazmidu 1177 (p770) (Tabulka 1).

Pořadí vzorků: 1) Transkripce s holoenzymem a všemi NTP, 2) Transkripce s holoenzymem bez ATP, 3) Transkripce s holoenzymem bez GTP, 4) Transkripce s RNAP bez σ^A a všemi NTP, 5) Transkripce s RNAP σ^A a bez ATP, 6) Transkripce s RNAP σ^A a bez GTP

Analýza dat z transkripce *in vitro* potvrdila aktivitu rRNAP z *B. subtilis*. Z grafu vyplývá, že rRNAP není kontaminována faktorem σ^A , jelikož v jeho nepřítomnosti nedochází k transkripci. Naopak wt RNAP vykazuje transkripční aktivitu i bez přidání faktoru σ^A , protože při izolaci byl částečně izolován také faktor σ^A vázaný na RNAP v buňce.

V naší laboratoři byla již v minulosti pozorováno, že pokud nebylo přidáno ATP, k transkripci stále docházelo. K tomuto jevu dochází i u rRNAP z *B. subtilis*, a to dokonce o něco více než u wt RNAP. rRNAP musí tedy vázat ATP v buňkách *E. coli*, kde je exprimována. Jako negativní kontrola byly použity vzorky bez přidaného GTP. V těchto případech k transkripci nedochází. GTP při izolaci RNAP není navázán. Tento jev byl také pozorován u wt RNAP.

S nově vytvořenou funkční rRNAP byly provedeny pokusy pro analýzu vazby domény 1.1 na domény 2 a 4 a to opět pomocí transkripce *in vitro* (Obrázek 23).



Obrázek 23: Test vazby domény 1.1 na konstrukt domén 2 a 4 za pomoci transkripce

Na obrázku je na ose y znázorněna intenzita transkripce a na ose x jsou rozepsané jednotlivé vzorky. Pod osou x jsou ukázána primární data z transkripčního gelu. Jedná se o vzorky s rRNAP. Jako templát byl použit promotor P_{veg} , který byl přidán na plazmidu 1177 (p770) (Tabulka 1).

Analýza dat ukázala, stejně jako u transkripce s wtRNAP, že přidání domény 1.1, konstruktů domén 2 a 4 či jejich kombinace, neovlivní intenzitu transkripce.

6 Diskuze

6.1 Doménové konstrukty faktoru σ^A

6.1.1 Izolace doménových konstruktů faktoru σ^A

Doménové konstrukty faktoru σ^A byly nejprve klonovány a poté izolovány pomocí histidinové kotvy a následně afinitní chromatografie. Při izolaci konstruktů často docházelo k vysoké srážlivosti, jelikož fragmenty proteinů často odhalí na povrchu části, které normálně ve styku s okolním prostředím nejsou. Může docházet také ke špatnému sbalení domén z důvodu absence některých jejich částí a absence vazby na okolní domény. Nerozpustnost izolovaných proteinů není neobvyklá, například při izolaci domény G elongačního faktoru Tu (EF-Tu) z *E. coli*, která má GTPázovou aktivitu, nebylo možné tuto doménu izolovat v rozpustné formě (Tomincová et al., 2002). Proto byly do konečných pokusů vybrány konstrukty, které byly v dostatečné koncentraci a měly dostatečnou čistotu, aby mohly být použity v transkripčních experimentech *in vitro* a zároveň byly rozpustné. To se týkalo hlavních konstruktů určených k experimentům, domén 2 a 4 a domény 1.1. Tyto konstrukty byly vybrány pro další experimenty, jelikož byla již v minulosti testována vazba domény 1.1 na zbytek faktoru σ a testy naznačovaly, že se jedná o vazbu na domény 2 a 4. Vazba byla testována na organismu *Thermotoga maritima* a bylo pozorováno, že faktor σ tvoří mimo holoenzym kompaktní konformaci, kde se doména 1.1 nachází v bezprostřední blízkosti domén 2 a 4. Vazba mezi doménami však nebyla prokázána (Schwartz et al., 2008). Navíc se právě na doménách 2 a 4 nachází hlavní vazebná místa pro promotorovou sekvenci. Přítomnost izolovaných proteinů a jejich čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly přečištěny gelovou chromatografií.

6.1.2 Testování funkce autoinhibiční domény 1.1 za použití metody Nitrocellulose filter binding assay a transkripce *in vitro*

Vybrané doménové konstrukty byly testovány metodou Nitrocellulose filter binding assay, kde byla analyzována vazba jednotlivých konstruktů na promotorovou sekvenci *rrnBP1* či P_{veg} . Z analýzy výsledků vyplynulo, že autoinhibiční doména 1.1 neváže konstrukt domén 2 a 4

a nezabraňuje jeho vazbě na promotor. Výsledky ukazovaly spíše opačný charakter, konstrukt domén 2 a 4 i doména 1.1 se vážou na promotorovou sekvenci. Přidáním domény 1.1 v poměru k doménám 2 a 4 nesnížila vazba na promotor prokazatelným způsobem, ve většině případů se vazba naopak zvýšila.

Stejně výsledky se týkaly vazby domény 1.1 na σ^A rest. Samotná σ^A rest vykazovala vazbu na DNA, kterou by dle hypotézy měla vazba domény 1.1 snížit. Docházelo však opět k opačnému efektu. Nedochozí tedy k vazbě domény 1.1 na ostatní domény faktoru σ^A a k inhibici vazby na promotor, ale dochází kromě vazby σ^A rest také k vazbě domény 1.1 na promotorovou DNA. Tato vazba byla dále ověřena metodou EMSA, nicméně výsledky potvrdily předešlé závěry.

Pro otestování interakce mezi doménami a současně interakce domén s RNAP byla použita metoda transkripce *in vitro*. K tomuto účelu byla použita wt RNAP z *B. subtilis* a rRNAP. Analýza dat ukázala, že přidání domény 1.1, konstruktů domén 2 a 4 či jejich kombinace, neovlivní intenzitu transkripce.

Závěrem, nedochází tedy k interakci doménových konstruktů mezi sebou ani s RNAP. Doménové konstrukty klonované samostatně nefungovaly tak, jak by fungovaly v celém faktoru σ^A v přirozeném prostředí buňky, pravděpodobně z důvodu absence jejich kovalentního spojení. Pokud je vazba mezi doménou 1.1 a ostatními doménami slabá, je možné, že k ní dochází pouze díky bezprostřední blízkosti domén v kovalentní vazbě. Například pokud bylo uměle vytvořeno kovalentní spojení mezi σ^{70} a RNAP u *E. coli* (podjednotka β'), došlo mezi nimi k desetinásobnému zvýšení frekvence tvorby vazby (Mooney & Landick, 2003). Je tedy možné, že bez kovalentního spojení mezi doménami k vazbě vůbec nedochází, nebo se frekvence vazby natolik sníží, že již není možné jí detekovat.

Pro další studium interakcí mezi doménami faktoru σ by bylo vhodné použít metody, u kterých bude kovalentní vazba domén zachována. Je možné například mutovat AK na vybraných doménách na cystein a díky následnému naznačení cysteinu sledovat pomocí NMR interakce mezi mutovanými doménami (Skinner & Laurence, 2010). Podobně byla studována podjednotka δ RNAP, u které byly N–koncové a C–koncové domény naznačeny paramagnetickými molekulami (Papoušková et. al., 2013).

6.2 Expresní systém pro izolaci rRNAP z *B. subtilis*

6.2.1 Izolace rRNAP z *B. subtilis* exprimované v *E. coli*

Byla klonována rRNAP a následně izolována (za pomoci histidinové kotvy) afinitní chromatografií. Původní postupy izolace proteinu, které nepoužívaly kotvu pro označení izolovaného proteinu, byly méně specifické a přinášely menší výtěžky. Tento postup byl například aplikován při izolaci RNAP z *T. aquaticus*, kde bylo použito opakované srážení a filtrace. Nakonec byly izolované protein přečištěny na iontové chromatografii (Zhang et. al., 1999). Stejný postup byl použit také při izolaci RNAP z *E. coli* (Polyakov et. al., 1995).

rRNAP se podařilo izolovat v dostatečné koncentraci a čistotě pro následné pokusy. Přítomnost proteinu a čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE a následně byl protein přečištěn gelovou chromatografií. Současně byla použita wt RNAP, která již byla k dispozici v naší laboratoři. Wt RNAP sloužila pro srovnání funkčnosti a vlastností s rRNAP.

Izolace proteinu v heterologním hostiteli *E. coli* byla zvolena zejména proto, že původní expresní systémy založené na izolaci proteinu přímo z dané buňky pomocí vloženého His-tagu neumožňovaly získat protein v potřebné koncentraci a čistotě. Navíc pokud se studovaný gen nachází na chromozomu bakterie, nelze efektivně provádět mutace pro studium struktury a vlastností. Tento postup byl použit při izolaci RNAP z *C. glutamicum* (Holátko et al., 2012) či při izolaci RNAP z *B. subtilis* (Qi & Hulett, 1998).

Byl opublikován také heterologní expresní systém, ve kterém byl konstrukt RNAP vnesen na dvou vektorech do buněk *E. coli* a tam následně exprimován (Yang & Lewis, 2008). Tento způsob se však v naší laboratoři nepovedlo efektivně zopakovat, výsledný protein nebyl vhodný pro biochemické experimenty nebo strukturní studie.

Vložením konstruktů do plazmidu pAC22 a expresí v *E. coli* se v naší laboratoři již úspěšně podařilo izolovat RNAP z *Mycobacterium smegmatis* (Kouba et al., 2019). Navíc byly geny pro podjednotky β a β' navrženy se společnou SD sekvencí a stop kodonem, exprimoval se tudíž jeden společný protein. Zamezilo se tak kontaminaci rRNAP doménami z *E. coli*.

Další výhodou nově vytvořeného systému je, že izolovaná rRNAP neobsahuje faktor HelD, což umožňuje testování rRNAP v jeho nepřítomnosti či naopak testování změny vlastností po přidání tohoto faktoru.

6.2.2 Test funkce a vlastností rRNAP pomocí transkripce *in vitro*

Metodou transkripce *in vitro* byla ověřena funkčnost rRNAP. Transkripce fungovala ve všech případech (5 opakování), rRNAP tedy zajišťuje transkripci stejně jako v přirozeném prostředí buňky. Stejným způsobem byla v naší laboratoři testována wt RNAP z *B. subtilis*, samostatně a v komplexu s faktorem σ^1 (Ramaniuk et. al., 2018).

Samostatná rRNAP nevykazovala transkripci, zatímco po rekonstrukci s faktorem σ^A vykazovala vysokou transkripci. Tento výsledek dokazuje, že rRNAP vytvořená v této práci nebyla izolována s faktorem σ z *E. coli*, což se ukázalo jako nesporná výhoda heterologního expresního systému. V případě wt RNAP se držela stálá hladina transkripce i bez přítomnosti σ^A , což byl následek kontaminace izolované wt RNAP přirozeně se vyskytující σ^A v buňce *B. subtilis*.

Cílem bylo také ověřit, zda je rRNAP kontaminována ATP z buňky, jelikož se tento fenomén v naší laboratoři potvrdil již v minulosti při transkripci *in vitro* s RNAP z *E. coli* exprimovanou v kmeni DE3 (Janoušková, Krásný, neublikováno). Pokud nebylo přidáno ATP, k transkripci stále docházelo. A to jak v případě wt RNAP z *B. subtilis*, u které tento jev byl pozorován už dříve, tak u rRNAP. Z těchto výsledků vyplývá, že rRNAP váže ATP v buňkách *E. coli*, kde je exprimována.

Kontaminace dalšími molekulami je při izolaci velmi častá, v literatuře je již diskutována. Například při izolaci rekombinantní laktátdehydrogenázy u bílých krevet, která katalyzuje konverzi laktátu na pyruvát, byla nalezena kontaminace histidinem a asparaginem. Tyto dvě AK byly v aktivním místě, jelikož tam přirozeně působí jako akceptory protonů (Leyva-Carrillo et. al., 2019). Tento fenomén se netýká pouze proteinů, kupříkladu izolace RNA z kávy je náročná kvůli vysoké hladině kontaminace polysacharidy, polyfenoly a dalšími sekundárními metabolity. Tímto problémem se laboratoře stále zabývají a přichází s novými postupy izolace (Huded et. al., 2018).

V literatuře nebyla nalezena zmínka o kontaminaci konkrétně molekulou ATP, tento jev prozatím nebyl vysvětlen. Může se například jednat o další formu regulace iniciace transkripce. Jako negativní kontrola byly použity vzorky bez přidaného GTP. V těchto případech k transkripci nedochází ani u jedné RNAP. V naší laboratoři byla testována transkripce v nepřítomnosti všech jednotlivých NTP a ve všech případech kromě nepřítomnosti ATP transkripce nebyla aktivní (Janoušková, Krásný, nepublikováno). Pokud by docházelo k náhodné vazbě NTP do RNAP v buňce, s největší pravděpodobností by se vážala molekula ATP, jelikož je jí v buňce nejvíce, ale jelikož u jiných NTP nebyla pozorována ani velmi nízká hladina transkripce, může se jednat o specifickou vazbu.

Shrnuto, tímto způsobem byla vytvořena funkční rRNAP, kterou je na plazmidu snadné mutovat a je tudíž vhodná pro další testy jejích vlastností. Díky snadné mutagenezi je možné studovat konkrétní místa důležitá pro interakci s regulačními faktory a DNA. Jelikož je exprimováno čisté jádro rRNAP v *E. coli*, je zde možnost libovolně přidávat další interagující partnery či podjednotky, například HELD či faktory σ a studovat tak jejich vlastnosti. Tento systém má tak potenciál studie RNAP z *B. subtilis* za účelem tvorby nových antibiotik či studie regulačních faktorů, které ovlivňují transkripci. V bakterii by mohla být také snáze regulovatelná exprese potřebných proteinů, například pro použití v biotechnologiích.

7 Souhrn

Byly úspěšně izolovány a purifikovány doménové konstrukty faktoru σ^A . U vybraných konstruktů byly provedeny prvotní pokusy pro ověření jejich vzájemné interakce a funkčnosti se zaměřením na autoinhibiční funkci domény 1.1. K tomuto účelu byly použity metody Nitrocellulose filter binding assay, EMSA a transkripce *in vitro*. Těmito metodami bylo zjištěno, že zvyšujícím se poměrem domény 1.1 k doménám 2 a 4 nedošlo k inhibici vazby domén 2 a 4 na promotor. Výsledky ukázaly opačnou tendenci.

Z pokusů vyplývá, že pokud se vytvoří rekombinantní doménové konstrukty, jejich vlastnosti neodpovídají přirozeným podmínkám.

V druhé části této práce byla klonována rRNAP, kterou se podařilo izolovat funkční a v dostatečné koncentraci. Funkčnost byla úspěšně prokázána v transkripci *in vitro*. Pomocí transkripce *in vitro* bylo také zjištěno, že rRNAP na rozdíl od wt RNAP není kontaminována faktory σ , což by mohlo přispět k snadnější krystalizaci proteinu. Klonovaná rRNAP však stejně jako wt RNAP obsahuje ATP z buňky *E. coli*. Předmětem dalšího výzkumu bude, zda tato vazba může mít biologickou roli, či zda se jedná o kontaminaci, byť specifickou.

7 Použitá literatura

- Adelman, J.L. et al., 2006. Mechanochemistry of Transcription Termination Factor Rho. *Molecular Cell*, 22(4), pp.611–621.
- Aldridge, P.D. et al., 2006. The flagellar-specific transcription factor, σ_{28} , is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti- σ_{28} factor FlgM. *Genes & Development*, 20, pp.2315–2326.
- Arthur, T.M. & Burgess, R.R., 1998. Localization of a sigma70 Binding Site on the N Terminus of the Escherichia coli RNA Polymerase β' Subunit. *The journal of biological chemistry*, 273(47), pp.31381–31387.
- Azriel, S. et al., 2016. The Stringent Response Regulator DksA Is Required for Salmonella enterica Serovar Typhimurium Growth in Minimal Medium, Motility, Biofilm Formation, and Intestinal Colonization. *Infection and immunity*, 84(1), pp.375–384.
- Bae, B. et al., 2013. Phage T7 Gp2 inhibition of Escherichia coli RNA polymerase involves misappropriation of σ_{70} domain 1.1. *PNAS*, 110(49), pp.19772–19777.
- Barne, K.A. et al., 1997. Region 2 . 5 of the Escherichia coli RNA polymerase σ_{70} subunit is responsible for the recognition of the “ extended – 10 ” motif at promoters. *The EMBO journal*, 16(13), pp.4034–4040.
- Barrios, H., Valderrama, B. & Morett, E., 1999. Compilation and analysis of σ_{54} –dependent promoter sequences. *Nucleic acids research*, 27(22), pp.4305–4313.
- Battesti, A., Majdalani, N. & Gottesman, S., 2011. The RpoS–Mediated General Stress Response in Escherichia coli. *Annual Review of Microbiology*, 65, pp.189–213.
- Bentley, S. et al., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). *Nature*, 417(9), pp.141–147.
- Bogden, C.E. et al., 1999. The Structural Basis for Terminator Recognition by the Rho Transcription Termination Factor. *Molecular Cell*, 3, pp.487–493.
- Borukhov, S., Lee, J. & Laptenko, O., 2005. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology*, 55(5), pp.1315–1324.
- Borukhov, S. & Nudler, E., 2008. RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Cell press*, 16(3), pp.126–134.
- Bose, D. et al., 2008. Organization of an Activator–Bound RNA Polymerase Holoenzyme. *Molecular Cell*, 32(3), pp.337–346.
- Bougdour, A. & Gottesman, S., 2007. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti–adaptor

- protein IraP. *PNAS*, 104(31), pp.12896–12901.
- Burrows, P.C. et al., 2004. Reorganisation of an RNA polymerase – promoter DNA complex for DNA melting. *The EMBO journal*, 23(21), pp.4253–4263.
- Campbell, E.A. et al., 2002. Structure of the Bacterial RNA Polymerase Promoter Specificity sigma Subunit. *Molecular Cell*, 9(3), pp.527–539.
- Cannon, W. et al., 1999. Amino-terminal sequences of σ_N (σ_{54}) inhibit RNA polymerase isomerization. *Genes & development*, 13, pp.357–370.
- Cannon, W., Gallegos, M. & Buck, M., 2001. DNA Melting within a Binary σ_{54} –Promoter DNA Complex. *The journal of biological chemistry*, 276(1), pp.386–394.
- Cardinale, C. et al., 2008. Termination Factor Rho and Its Cofactors NusA and NusG Silence Foreign DNA in E. coli. *Science*, 320(5878), pp.935–938.
- Cavanagh, A.T. et al., 2008. Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4 . 2 of σ_{70} . *Molecular Microbiology*, 67(6), pp.1242–1256.
- Cavanagh, A.T. & Wassarman, K.M., 2014. 6S RNA , a Global Regulator of Transcription in Escherichia coli , Bacillus subtilis , and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, 68, pp.45–60.
- Chadsey, M.S. & Hughes, K.T., 2001. A Multipartite Interaction between Salmonella Transcription Factor σ_{28} and its Anti-sigma Factor FlgM: Implications for σ_{28} Holoenzyme Destabilization Through Stepwise Binding. *Journal of Molecular Biology*, 306, pp.315–929.
- Chen, Y.F. & Helmann, J.D., 1995. The Bacillus subtilis flagellar regulatory protein sigma D: overproduction, domain analysis and DNA-binding properties. *Journal of Molecular Biology* 16;249(4):743-53.
- Crouch, M. et al., 2005. The alternative sigma factor σ_E is required for resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium to anti-microbial peptides. *Molecular Microbiology*, 56(3), pp.789–799.
- Dalebroux, Z.D. & Swanson, M.S., 2012. ppGpp : magic beyond RNA polymerase. *Nature reviews microbiology*, 10(3), pp.203–212.
- Débarbouillé, M. et al., 1991. The Bacillus subtilis sigL gene encodes an equivalent of σ_{54} from Gram-negative bacteria. *PNAS*, 88, pp.9092–9096.
- Devkota, S.R. et al., 2017. Structural insights into the regulation of Bacillus subtilis SigW activity by anti-sigma RsiW. *PLOS one*, 12(3), pp.1–15.

- Donohue, T.J., 2009. Targeted σ factor turnover inserts negative control into a positive feedback loop. *Molecular Microbiology*, 73(5), pp.747–750.
- Dove, S.L. & Hochschild, A.N.N., 2001. Bacterial Two–Hybrid Analysis of Interactions between Region 4 of the σ 70 Subunit of RNA Polymerase and the Transcriptional Regulators Rsd from *Escherichia coli* and AlgQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 183(21), pp.6413–6421.
- Dufour, A. & Haldenwang, W.G., 1994. Interactions between a *Bacillus subtilis* Anti– σ Factor (RsbW) and Its Antagonist (RsbV). *Journal of bacteriology*, 176(7), pp.1813–1820.
- Durfee, T. et al., 2008. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(3), pp.1084–1096.
- Epshtein, V. et al., 2010. An Allosteric Mechanism of Rho–dependent Transcription Termination. *Nature*, 463(7278), pp.245–249.
- Fitzgerald, D.M. et al., 2014. Comprehensive Mapping of the *Escherichia coli* Flagellar Regulatory Network. *PLoS Genetics*, 10(10), p.1004649.
- Ghosh, P. et al., 2003. Inter–subunit recognition and manifestation of segmental mobility in *Escherichia coli* RNA polymerase : a case study with ω – β' interaction. *Biophysical chemistry*, 103(3), pp.223–237.
- Gildehaus, N. et al., 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 research*, 35(6), pp.1885–1896.
- Goldman, S.R. et al., 2015. The primary σ factor in *Escherichia coli* can access the transcription elongation complex from solution in vivo. *eLife*, 4(10514), pp.1–17.
- Govan, J.R.W. & Deretic, V., 1996. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological reviews*, 60(3), pp.539–574.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557–580.
- Haugen, S.P. et al., 2006. rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, 125(6):1069–82.
- Haugen, S.P. et al., 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature reviews microbiology*, 6(7), pp.507–519.

- Heinrich, J. & Wiegert, T., 2009. Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors. *Research in Microbiology*, 160(9), pp.696–703.
- Helmann, J.D., 1999. Anti-sigma factors. *Current Opinion in Microbiology*, 2, pp.135–141.
- Helmann, J.D., 2006. Deciphering a complex genetic regulatory network : the *Bacillus subtilis* σ protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. *Science progress*, 89(3/4), pp.243–266.
- Hesketh, A. et al., 2007. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome biology*, 8(8), p.161.
- Hilbert, D.W. & Piggot, P.J., 2004. Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(2), pp.234–262.
- Hnilicová, J. et al., 2014. Ms1 , a novel sRNA interacting with the RNA polymerase core in mycobacteria. *Nucleic acids research*, 42(18), pp.11763–11776.
- Holátko, J. et al., 2012. Construction of in vitro transcription system for *Corynebacterium glutamicum* and its use in the recognition of promoters of different classes. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(2):521-9.
- Hook-Barnard, I. & Hinton, D.M., 2009. The promoter spacer influences transcription initiation via sigma70 region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase. *PNAS*, 106(3), pp.737–742.
- Huded, A.K.C. et. al., 2018. A rapid and efficient SDS-based RNA isolation protocol from different tissues of coffee. *3 biotech*, 8(3):183.
- Hurwitz, J., 2005. The discovery of RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), pp.42477–42485.
- Ishihama, A., 1992. Role of the RNA polymerase α subunit in transcription activation. *Molecular Microbiology*, 6(22), pp.3283–3288.
- Jishage, M. et al., 1996. Regulation of RNA Polymerase Sigma Subunit Synthesis in *Escherichia coli*: Intracellular Levels of Four Species of Sigma Subunit under Various Growth Conditions. *Journal of bacteriology*, 178(18), pp.5447–5451.
- Keiltys, S. & Rosenberg, M., 1987. Constitutive Function of a Positively Regulated Promoter Reveals New Sequences Essential for Activity. *The journal of biological chemistry*, 262(13), pp.6389–6395.
- Keller, A.N. et al., 2014. ϵ , a New Subunit of RNA Polymerase Found in Gram-Positive Bacteria. *Journal of bacteriology*, 196(20), pp.3622–3632.

- Kim, M. et al., 2009. Positive and negative feedback regulatory loops of thiol–oxidative stress response mediated by an unstable isoform of σ R in actinomycetes. *Molecular Microbiology*, 73(5), pp.815–825.
- Kouba, T. et al., 2019. The Core and Holoenzyme Forms of RNA Polymerase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 10.1128/JB.00583–18.
- Krásný, L. et al., 2008. The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 69(1), pp.42–54.
- Krásný, L. & Gourse, R.L., 2004. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *The EMBO journal*, 23(22), pp.4473–4483.
- Kriner, M.A. & Groisman, E.A., 2017. RNA secondary structures regulate three steps of Rho–dependent transcription termination within a bacterial mRNA leader. *Nucleic acids research*, 45(2), pp.631–642.
- Kuo, H. et al., 2015. The core–independent promoter–specific binding of *Bacillus subtilis* σ B. *The FEBS journal*, 282, pp.1307–1318.
- Lee, J. & Borukhov, S., 2016. Bacterial RNA Polymerase–DNA Interaction — The Driving Force of Gene Expression and the Target for Drug Action. *Frontiers in molecular biosciences*, 3(73).
- Leibman, M. & Hochschild, A., 2007. A σ –core interaction of the RNA polymerase holoenzyme that enhances promoter escape. *The EMBO journal*, 26(6), pp.1579–1590.
- Leyva-Carrillo, L. et al., 2019. Purification and partial biochemical characterization of recombinant lactate dehydrogenase 1 (LDH-1) of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Protein expression and purification*, 164:105461.
- Linder, P., Lemeille, S. & Redder, P., 2014. Transcriptome–Wide Analyses of 5′–Ends in RNase J Mutants of a Gram–Positive Pathogen Reveal a Role in RNA Maturation, Regulation and Degradation. *PLoS Genetics*, 10(2), p.1004207.
- Lonetto, M. et al., 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase or factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *PNAS*, 91, pp.7573–7577.
- MacLellan, S.R. et al., 2009. The YvrI Alternative σ Factor Is Essential for Acid Stress Induction of Oxalate Decarboxylase in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 191(3), pp.931–939.
- Magnusson, L.U., Farewell, A. & Nystrom, T., 2005. ppGpp : a global regulator in *Escherichia*

- coli*. *Trends in microbiology*, 13(5), pp.236–242.
- Mathur, J. et al., 2007. Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* σ E regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Molecular Microbiology*, 63(3), pp.848–858.
- Mauri, M. & Klumpp, S., 2014. A Model for Sigma Factor Competition in Bacterial Cells. *PLOS Computational biology*, 10(10), pp.29–34.
- Mecenas, J. et al., 1993. The activity of σ E, an *Escherichia coli* heat-inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & Development*, 7, pp.2618–2628.
- Mitchell, J.E. et al., 2003. Identification and analysis of “extended -10 ” promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 31(16), pp.4689–4695.
- Mooney, R.A. & Landick, R., 2003. Tethering sigma70 to RNA polymerase reveals high in vivo activity of sigma factors and sigma70-dependent pausing at promoter-distal locations. *Genes and development*, 15;17(22):2839-51.
- Murakami, K., 2015. Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules*, 5(2), pp.848–864.
- Murakami, K., 2013. X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase σ 70 holoenzyme. *The journal of biological chemistry*, 288(13):9126-34.
- Murakami, K. et al., 2002. Structural Basis of Transcription Initiation: RNA Polymerase Holoenzyme at 4 Å Resolution. *Science*, 296, pp.1280–1285.
- Murakami, K.S. & Darst, S.A., 2003. Bacterial RNA polymerases: The whole story. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(1), pp.31–39.
- Murray, H.D. et al., 2003. Control of rRNA Expression by Small Molecules Is Dynamic and Nonredundant. *Molecular Cell*, 12(1), pp.125–134.
- Nagler, K. et al., 2016. Identification of Differentially Expressed Genes during *Bacillus subtilis* Spore Outgrowth in High-Salinity Environments Using RNA Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 7(1564), pp.1–15.
- Nannapaneni, P. et al., 2012. Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology*, 158, pp.696–707.
- Osanai, T. et al., 2005. Positive Regulation of Sugar Catabolic Pathways in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the Group 2 σ Factor SigE. *The journal of biological chemistry*, 280(35), pp.30653–30659.

- Österberg, S. et al., 2011. Regulation of Alternative Sigma Factor Use. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), pp.37–55.
- Paget, M.S., 2015. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), pp.1245–65.
- Paget, M.S.B. & Helmann, J.D., 2003. The σ 70 family of sigma factors. *Genome biology*, 4(203), pp.1–6.
- Papoušková, V. et al., 2013. Structural study of the partially disordered full-length δ subunit of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *ChemBiochem*, 14(14):1772-9.
- Park, J. & Roberts, J.W., 2006. Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *PNAS*, 103(13), pp.4870–4875.
- Parshin, A. et al., 2015. DksA regulates RNA polymerase in *Escherichia coli* through a network of interactions in the secondary channel that includes Sequence Insertion 1. *PNAS*, 112(50), pp.6862–71.
- Patikoglou, G.A. et al., 2007. Crystal structure of the *Escherichia coli* regulator of σ 70, Rsd, in complex with σ 70 domain 4. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), pp.649–659.
- Pemberton, I.K. et al., 2000. The G+C-rich discriminator region of the *tyrT* promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *Journal of Molecular Biology*, 299(4), pp.859–864.
- Penas, A.D. et al., 1997. The σ E-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ E. *Molecular Microbiology*, 24(2), pp.373–385.
- Piccirilli, J.A. & Koldobskaya, Y., 2011. Crystal structure of an RNA polymerase ribozyme in complex with an antibody fragment. *Philosophical transactions B of the royal society*, 366(1580), pp.2918–2928.
- Polyakov, A. et al., 1995. Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell*, 83(3):365-73.
- Potrykus, K. & Cashel, M., 2008. (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiology*, 62, pp.35–51.

- Qi & Hulett 1998. PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *Molecular microbiology*, 28(6):1187-97.
- Rabatinová, A. et al., 2013. The δ Subunit of RNA Polymerase Is Required for Rapid Changes in Gene Expression and Competitive Fitness of the Cell. *Journal of bacteriology*, 195(11), pp.2603–2611.
- Ramaniuk O. et al., 2018. σ^I from *Bacillus subtilis*: Impact on Gene Expression and Characterization of σ^I -Dependent Transcription That Requires New Types of Promoters with Extended -35 and -10 Elements. *Journal of bacteriology*, pii: e00251-18. doi: 10.1128/JB.00251-18.
- Richardson, J.P., 2002. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochimica et biophysica acta*, 1577, pp.251–260.
- Roberts, J.W., 2019. Mechanisms of Bacterial Transcription Termination. *Journal of molecular biology*, pii: S0022-2836(19)30185-8.
- Ross, W. et al., 1990. E.coli Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *EMBO Journal*, 9, 3733–3742.
- Ruff, E.F. et al., 2015. Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*, 5(2), pp.1035–62.
- Saecker, R. et al., 2011. Mechanism of Bacterial Transcription Initiation: RNA Polymerase – Promoter Binding, Isomerization to Initiation– Competent Open Complexes, and Initiation of RNA Synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), pp.754–771.
- Saini, S. et al., 2011. Continuous control of flagellar gene expression by the σ^{28} – FlgM regulatory circuit in *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 79(1), pp.264–278.

- Schneider, D.A. & Gourse, R.L., 2003. Changes in Escherichia coli rRNA promoter activity correlate with changes in initiating nucleoside triphosphate and guanosine 5' diphosphate 3'-diphosphate concentrations after induction of feedback control of ribosome synthesis. *Journal of bacteriology*, 185(20), pp.6185–6191.
- Schöbel, S. et al., 2004. The Bacillus subtilis σ^W anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Molecular Microbiology*, 52(4), pp.1091–1105.
- Schwartz, E.C. et al., 2008. A Full Length Group 1 Bacterial Sigma Factor Adopts a Compact Structure Incompatible with DNA Binding. *Chemical biology*, 15(10), pp.1091–1103.
- Sengupta, S. et al., 2015. Promoter Escape with Bacterial Two-component σ Factor Suggests Retention of σ Region Two in the Elongation complex. *The journal of biological chemistry*, 290(47), pp.28575–28583.
- Serizawa, M. et al., 2004. Systematic analysis of SigD-regulated genes in Bacillus subtilis by DNA microarray and Northern blotting analyses. *GENE*, 329, pp.125–136.
- Sevcikova, B. et al., 2010. The Anti-Anti-Sigma Factor BldG Is Involved in Activation of the Stress Response Sigma Factor σ^H in Streptomyces coelicolor A3 (2). *Journal of bacteriology*, 192(21), pp.5674–5681.
- Sharma, U.K. & Chatterji, D., 2010. Transcriptional switching in Escherichia coli during stress and starvation by modulation of σ^{70} activity. *Fems microbiology reviews*, 34, pp.646–657.
- Shechner, D.M. et al., 2009. Crystal Structure of the Catalytic Core of an RNA-Polymerase Ribozyme. *Science*, 326(5957), pp.1271–1275.
- Skinner & Laurence 2010. Probing residue-specific interactions in the stabilization of proteins using high-resolution NMR: a study of disulfide bond compensation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(6):2643-54.
- Sojka, L. et al., 2011. Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in Bacillus subtilis. *Nucleic acids research*, 39(11), pp.4598–4611.
- Southern, E. & Merrick, M., 2000. The role of Region II in the RNA polymerase σ factor σ^N (σ^{54}). *Nucleic acids research*, 28(13), pp.2563–2570.

- Srivatsan, A. & Wang, J.D., 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), pp.100–105.
- Staron, A. et al., 2009. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. *Molecular Microbiology*, 74(3), pp.557–581.
- Steinchen, W. et al., 2015. Catalytic mechanism and allosteric regulation of an oligomeric (p)ppGpp synthetase by an alarmone. *PNAS*, 112(43), pp.13348–53.
- Steitz, T.A. et al., 1994. A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science*, 266(5193):2022-5.
- Steuten, B. et al., 2013. Mapping the Spatial Neighborhood of the Regulatory 6S RNA Bound to Escherichia coli RNA Polymerase Holoenzyme. *Journal of Molecular Biology*, 425(19), pp.3649–3661.
- Tagami, S. et al., 2010. Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein. *Nature*, 468(7326), pp.978–982.
- Testerman, T.L. et al., 2002. The alternative sigma factor σ^E controls antioxidant defences required for Salmonella virulence and stationary-phase survival. *Molecular Microbiology*, 43(3), pp.771–782.
- Tomincová, H. et al., 2002. Isolation of chimaeric forms of elongation factor EF-Tu by affinity chromatography. *Journal of chromatography*, 25;770(1-2):129-35.
- Trotochaud, A.E. & Wassarman, K.M., 2004. 6S RNA Function Enhances Long-Term Cell Survival. *Journal of bacteriology*, 186(15), pp.4978–4985.
- Tsujikawa, L. et al., 2002. Interaction of RNA polymerase with forked DNA: Evidence for two kinetically significant intermediates on the pathway to the final complex. *PNAS*, 99(6), pp.3493–8.
- Vassylyev, D.G. et al., 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, 417(13), pp.712–719.
- Vrentas, C.E. et al., 2008. Still Looking for the Magic Spot: The Crystallographically Defined Binding Site for ppGpp on RNA Polymerase Is Unlikely to Be Responsible for rRNA Transcription Regulation. *Journal of Molecular Biology*, 377(2), pp.551–564.
- Wang, Y. et al., 1997. Determinants for Escherichia coli RNA Polymerase Assembly within the β Subunit. *Journal of Molecular Biology*, 270(5), pp.648–662.

- Wassarman, K.M. & Storz, G., 2000. 6S RNA Regulates E. coli RNA Polymerase Activity. *Cell*, 101, pp.613–623.
- Weiss, A. & Shaw, L.N., 2015. Small things considered: the small accessory subunits of RNA polymerase in Gram-positive bacteria. *Fems microbiology reviews*, 39(4), pp.541–554.
- Weixlbaumer, A. et al., 2013. Structural basis of transcriptional pausing in bacteria. *Cell*, 152(3):431-41.
- Westblade, L.F. et al., 2004. Studies of the Escherichia coli Rsd – σ 70 Complex. *Journal of Molecular Biology*, 335, pp.685–692.
- Wiedermannova, J. et al., 2014. Characterization of HelD, an interacting partner of RNA polymerase from Bacillus subtilis. *Nucleic acids research*, 42(8), pp.5151–5163.
- Wigneshweraraj, S.R. et al., 2001. Regulatory Sequences in Sigma 54 Localise Near the Start of DNA Melting. *Journal of Molecular Biology*, 306, pp.681–701.
- Wigneshweraraj, S.R. et al., 2002. Correlating protein footprinting with mutational analysis in the bacterial transcription factor σ 54 (σ N). *Nucleic acids research*, 30(4), pp.1016–1028.
- Wilson, C. & Dombroski, A.J., 1997. Region 1 of σ 70 is Required for Efficient Isomerization and Initiation of Transcription by Escherichia coli RNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 267(1), pp.60–74.
- Winkelman, J.T. et al., 2015. Crosslink Mapping at Amino Acid–Base Resolution Reveals the Path of Scrunched DNA in Initial Transcribing Complexes. *Molecular Cell*, 59(5), pp.768–780.
- Xu, X. et al., 2016. Role of ppGpp in Pseudomonas aeruginosa acute pulmonary infection and virulence regulation. *Microbiological Research*, 192, pp.84–95.
- Yang, X. & Lewis, P., 2008. Overproduction and purification of recombinant Bacillus subtilis RNA polymerase. *Protein Expression and Purification*, 59, pp. 86–93
- Yin, Y. et al., 2013. Evidence for Sigma Factor Competition in the Regulation of Alginate Production by Pseudomonas aeruginosa. *PLOS one*, 8(8), p.72329.
- Young, B.A. et al., 2001. A Coiled–Coil from the RNA Polymerase β ' Subunit Allosterically Induces Selective Nontemplate Strand Binding by σ 70. *Cell*, 105, pp.935–944.
- Zachrdla, M. et al., 2017. Solution structure of domain 1.1 of the σ^A factor from Bacillus subtilis is preformed for binding to the RNA polymerase core. *The journal of biological chemistry*, 14;292(28):11610-11617.

- Zhang, G. et al., 1999. Crystal Structure of *Thermus aquaticus* Core RNA Polymerase at 3 . 3 Å Resolution. *Cell*, 98(6), pp.811–824.
- Zhang, G. & Darst, S.A., 1998. Structure of the *Escherichia coli* RNA Polymerase alpha Subunit Amino–Terminal Domain. *Science*, 281(5374), pp.262–266.
- Zhang, N. & Buck, M., 2015. A Perspective on the Enhancer Dependent Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules*, 5, pp.1012–1019.
- Zhang, Y. et al., 2012. Structural basis of transcription initiation. *Science*, 338(6110), pp.1076–1080.