

Abstrakt

RNA polymeráza (RNAP) je klíčový vícejednotkový 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 zabráňuje 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 transkripce *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.

Shrnuto, 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