

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



Delta podjednotka RNA polymerasy u gram pozitivních bakterií

Jitka Matějčková

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha 2010

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Liboru Krásnému, Ph.D. za trpělivé vedení bakalářské práce, cenné rady a ochotu zabývat se vzniklými problémy. Všem ostatním členům Laboratoře molekulární genetiky bakterií za trpělivost a za vytvoření příjemné atmosféry.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Libora Krásného, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 20. dubna 2010 Jitka Matějčková

Abstrakt

Aby bakteriální buňka přežila neustále se měnící podmínky, musí se na ně adaptovat. Tato adaptace je podmíněna změnou genové exprese. Klíčovým krokem genové exprese je transkripce. Hlavním enzymem bakteriální transkripce je RNA polymerasa (RNAP), což je esenciální vícepodjednotkový enzym. RNAP je nejvíce prostudována u *Escherichia coli*, modelového organismu gram negativních bakterií. Porovnala jsem *E. coli* a *Bacillus subtilis* (zástupce gram pozitivních bakterií) a shrnula jsem rozdíly v RNAP a transkripci. Jejich RNA polymerasy se liší přítomností podjednotky δ u gram pozitivních bakterií. Tato podjednotka zvyšuje promotorovou selektivitu, recykluje jádro RNAP a celkově stimuluje syntézu RNA. Podjednotka δ ovlivňuje sporulaci a virulenci některých bakterií. V této práci jsem shromáždila současné poznatky o jednotlivých částech genové exprese, zejména o regulaci iniciace transkripce a o podjednotce δ RNAP.

To survive under changing environmental conditions, the bacterial cell must adapt to them. This adaptation depends on changes in gene expression. A key step in gene expression is transcription. Bacterial RNA polymerase (RNAP) is an essential multisubunit enzyme, which is the main transcription enzyme. The most studied RNAP is from *Escherichia coli*, which is a model organism of gram-negative bacteria. I have compared the differences in RNAP between *E. coli* and *Bacillus subtilis* (a representative gram-positive bacteria). Their RNAPs differ by the presence of the δ subunit in gram-positive bacteria. This subunit increases promotor selectivity, enhances recycling of RNAP core, and generally stimulates RNA synthesis. The δ subunit affects sporulation and is essential for virulence of some bacteria. In this work, I have summarized current knowledge about gene expression, namely about regulation of transcription initiation and about the δ subunit of RNAP.

klíčová slova: genová exprese, transkripce, regulace iniciace transkripce, RNA polymerasa, podjednotka delta, gram pozitivní bakterie, *B. subtilis*

keywords: gene expression, transcription, regulation of transcription initiation, RNA polymerase, delta subunit, gram-positive bacteria, *B. subtilis*

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	6
Úvod	8
1 Genová exprese	9
1.1 Transkripce	9
1.2 Posttranskripční modifikace	9
1.3 Translace	10
1.4 Posttranslační modifikace	10
2 Transkripce	10
2.1 Iniclace	10
2.1.1 Bakteriální RNAP	11
2.1.2 Podjednotky RNAP	12
2.1.3 Interakce podjednotky σ s promotorem	13
2.1.4 Molekulární mechanismus syntézy DNA a RNA	13
2.1.5 Mechanismus iniciace transkripce	14
2.1.6 Rozdíly v RNAP a transkripci mezi <i>E. coli</i> a <i>B. subtilis</i>	16
2.2 Promotor	16
2.3 Promoter escape	17
2.4 Elongace	18
2.4.1 Elongační faktory GreA a GreB	18
2.4.2 Elongační faktor Mfd	18
2.4.3 Elongační faktor NusA	18
2.5 Terminace	19
2.5.1 Rho-dependentní terminace	19
2.5.2 Rho-independentní terminace	20
3 Regulace iniciace transkripce	20
3.1 Regulace transkripčními faktory (bílkoviny)	20
3.2 Regulace malými molekulami (iNTP, ppGpp)	21
3.2.1 Role ppGpp a DksA	22
3.2.2 Regulace iniciace transkripce u <i>B. subtilis</i>	23
4 Podjednotka delta	24
4.1 Základní informace a struktura podjednotky δ z <i>B. subtilis</i>	24
4.2 Biochemické vlastnosti podjednotky δ	25
4.2.1 Positivní vliv na procesivitu transkripce	28
4.3 Podjednotka δ <i>in vivo</i>	29
4.4 Shrnutí dosavadních poznatků po podjednotce δ	30
5 Srovnání aminokyselinových sekvencí podjednotek delta	30
6 Závěr	32
Reference	33

Seznam zkratek a symbolů

AMK	aminokyselina
Arc	kontrola anaerobního dýchání (anaerobic respiratory control)
Asp	kyselina asparagová
ATPasa	adenosin trifosfatasa
ATP	adenosin-5'-trifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	páry bazí (base pairs)
CRP	cAMP receptorový protein, často uváděný také jako CAP
CTD	karboxy terminální doména
Da	jednotka molekulové hmotnosti
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
dsDNA	dvojvláknová DNA (double strand)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
$E\delta$	jádra RNAP s navázanou podjednotkou δ
$E\sigma$	jádro RNAP s navázanou podjednotkou σ
Fis	faktor pro stimulaci inverze (factor for inversion stimulation)
FNR	faktor důležitý pro indukci fumarát reduktasy a nitrit reduktasy
GBS	streptococcus třídy B
Glu	kyselina glutamová
GTP	guanosin-5'-trifosfát
IHN	integration host factor
I	intermediát komplexu RNAP a promotorové DNA
IMP dehydrogenasa	inosin monofosfát dehydrogenasa
iNTP	iniciační nukleosid trifosfát
KCl	chlorid draselný
LD	spojovací doména u podjednotky σ
Lrp	protein regulující leucin (leucin regulatory protein)
mRNA	messenger RNA
Nar	anaerobní nitrátová regulace (anaerobic nitrate regulation)
$N\delta$	amino terminální doména podjednotky δ

NK	nukleová kyselina
NMR	nukleární magnetická resonance
NTD	amino terminální doména
NTP	nukleosid trifosfát
PAPI	poly(A) polymerasa
pI	isoelektrický bod
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
ppGpp	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
pppGpp	guanosin-5'-trifosfát-3'-difosfát
RNAP	RNA polymerasa
RNA	ribonukleová kyselina
RNasa	enzym ribonukleasa
RP _C	uzavřený komplex RNAP a promotorové DNA
RP _e	elongační komplex RNAP a DNA
RP _O	otevřený komplex RNAP a promotorové DNA
rRNA	ribosomální RNA
ssDNA	jednovláknová DNA (single strand)
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
tRNA	transferová RNA

Úvod

Žijící bakterie se nacházejí v nejrůznějších biotopech – od vulkanických kráterů, ledových oceánů až po vnitřek buněk rostlin a živočichů. Schopnost bakterií přežít v mimořádných podmínkách vyžaduje efektivní molekulární mechanismy, které přizpůsobí genovou expresi aktuálním podmínkám (dostupnost živin, teplota, tlak, pH a další) [5].

U bakterií se vyskytuje jediná DNA dependentní RNA polymerasa (RNAP), která je nepostradatelná pro genovou expresi. Nezávisle na sobě ji objevili S. Weiss, J. Hurwitz, A. Stevens a J. Bonner v roce 1960 [29].

Tato bakalářská práce je rozdělena na tři hlavní části. V první části je shrnuto, co je to genová exprese, její fáze a podrobně se zabývá iniciací transkripce. Transkripce je nejvíce prostudována u modelového organismu *Escherichia coli*, který patří mezi gram negativní bakterie. Jako zástupce gram pozitivních bakterií byla zvolena půdní bakterie *Bacillus subtilis*. Rozdíl mezi těmito organismy je značný nejen ve stavbě buněčných struktur, ale i v regulačních a signalizačních procesech. Dále je kladen důraz na vlastnosti jednotlivých podjednotek RNAP a vlastní mechanismus transkripce.

Druhá část této práce je věnována regulaci iniciace transkripce. Je to bezesporu klíčový moment transkripce, kdy se rozhoduje o budoucnosti buňky. Je zde poukázáno na molekulární mechanismy odpovědi buňky na určité faktory a detailně popsáno působení nejdůležitějších molekul v tomto kroku transkripce.

Třetí část je zaměřena na podjednotku δ RNAP. Tato podjednotka se vyskytuje pouze u gram pozitivních bakterií a hraje důležitou roli při regulaci transkripce. Zároveň se podílí na procesu sporulace a na míře virulence některých bakterií. Byla určena její struktura, ale zatím neznáme její přesnou fyziologickou funkci a roli v bakteriích. Proto se stává zajímavým objektem pro další bádání.

1 Genová exprese

Genová exprese je základní proces, ve kterém dochází k expresi, neboli vyjádření lineární sekvence kódované v DNA do 3-rozměrné struktury proteinu. Genovou expresi rozdělujeme na dvě hlavní části: transkripci a translaci. První krok genové exprese, transkripce, zajišťuje DNA dependentní RNA polymerasa (RNAP), která přepisuje DNA vlákno do vlákna RNA. Druhá část je charakteristická syntézou bílkovin, což je zajištěno translačním aparátem buňky. Obě tyto části obsahují mnoho kroků, kde může docházet k regulaci. Největší pozornost budu věnovat regulaci iniciace transkripce, protože je to bezpochyby klíčový krok genové exprese.

1.1 Transkripce

Na rozdíl od eukaryotních organismů (kde RNAP I přepisuje rRNA, RNAP II přepisuje mRNA a RNAP III přepisuje tRNA a 5S rRNA), bakterie mají pouze jednu RNAP, která je zodpovědná za tvorbu stabilních RNA (tRNA a rRNA), protein kódující RNA (mRNA) i malých nekódujících RNA. Všestrannost bakteriální RNAP závisí na dynamických interakcích s kofaktory a DNA [38].

Transkripce je proces, při kterém RNAP nasedá na dvoušroubovici DNA, rozplete vlákna od sebe a zahájí prepis DNA vlákna podle principu komplementarity do vlákna RNA. Transkripce probíhá ve třech stupních:

1. Iniciace (zahájení), kdy se RNAP váže na specifickou sekvenci DNA zvanou promotor (vzniká transkripční bublina) a zahajuje transkripci.
2. Elongace, kdy se RNAP posunuje podél řetězce DNA a podle templátového řetězce postupně syntetizuje novou RNA. Připojuje komplementární nukleotidy na volnou 3'-OH skupinu ribosy. Vznikající RNA se postupně uvolňuje z elongačního komplexu a DNA samovolně obnovuje svou původní konformaci.
3. Terminace je charakteristická ukončením syntézy a úplným uvolněním nově syntetizované RNA.

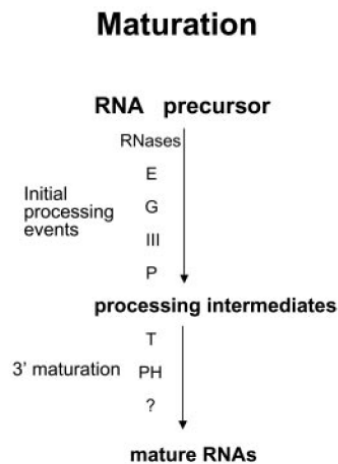
1.2 Posttranskripční modifikace

Posttranskripční modifikace se u prokaryot označují jako RNA maturace. Většina RNA molekul (zejména stabilní RNA molekuly rRNA a tRNA) je syntetizována ve formě prekurzorů. Prekurzory musí být upraveny do své finální podoby, aby mohly vykonávat funkci, ke které jsou určeny. Tyto úpravy vyžadují velké množství energie a aktivitu několika RNAs.

Obecně se dá říci, že jednotlivé RNA jsou vystřiženy endonukleasami z prekurzorových RNA, které jsou většinou společné pro několik RNA. Tím je myšleno např. vystřižení rRNA a tRNA ze společného ribosomálního transkriptu nebo individuální tRNA vystřihované z multimerního tRNA prekurzoru. Po oddělení jednotlivých RNA následuje maturace 3' a 5' konce. Proces maturace u *E. coli* je zobrazen na obr. 1.

RNA prekurzory jsou velmi rychle upraveny do finální podoby, protože sekvence prekurzorů je evolučně optimalizována jako substrát RNAs. Nicméně již maturovaná RNA (stabilní RNA) je díky svoji struktuře chráněna proti další aktivitě RNAs [20].

Mezi posttranskripční modifikace primárního transkriptu se řadí i polyadenylace 3' konce RNAs u *B. subtilis* i u *E. coli*. Hlavní poly(A) polymerasovou aktivitu u *E. coli* má enzym PAPI. U *B. subtilis* pravý homolog PAPI dosud nebyl nalezen. Zjevným homologem by mohla být nukleotidyltransferasa, která přidává sekvenci CCA na tRNA [15]. Na rozdíl od eukaryot, kde polyadenylace stabilizuje mRNA, u prokaryot naopak může urychlit degradaci.



Obrázek 1: **Proces maturace RNA u *E. coli***. Vystřížení z RNA prekurzoru provádí endoribonukleasy RNasy: RNasa E, G, III a P. K maturaci 3' konce tRNA a některých rRNA slouží RNasy T nebo PH. Pro maturaci 3' konce 16S rRNA zatím není enzym znám [20].

1.3 Translace

Translace užívá genetickou informaci obsaženou v *messenger* RNA (mRNA) k syntéze proteinů. Transferové RNA (tRNAs) jsou „nabity“ aminokyselinami a přinášeny na ribosom, kde jsou párovány s odpovídajícím tripletem kódovaným v mRNA. Aminokyseliny jsou připojovány ke vznikajícímu polypeptidu a ribosom se posouvá k dalšímu kodonu. Tento proces je opakován až do fáze, než vznikne celý protein a dojde k terminaci translace. Kontrola a úprava tohoto procesu je prováděna v průběhu celé syntézy proteinů a je tak zajištěna úspěšná translace genetické informace.

Translace je regulována zejména v těchto krocích: integrita mRNA a tRNA, správné přiřazení tRNA k aminokyselině aminoacyl-tRNA synthetasou, párování aminoacyl-tRNA s odpovídajícím mRNA kodonem. Je to velmi přesný proces a uvádí se, že 1 špatně zařazená aminokyselina se objeví mezi 10 000 správně zařazenými aminokyselinami [31].

1.4 Posttranslační modifikace

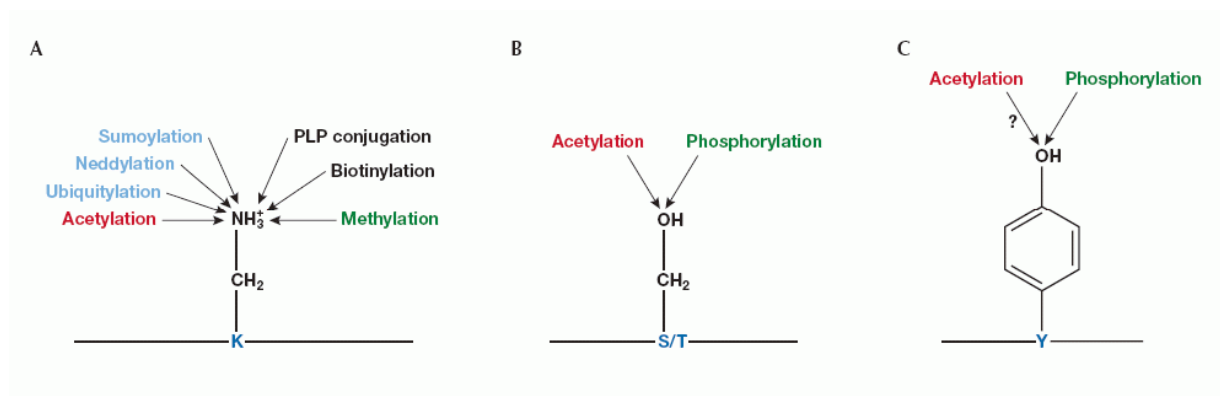
Po dokončení syntézy proteinů při translaci přichází fáze jejich modifikace. Těmito modifikacemi získají konečnou podobu a mohou vykonávat funkci, ke které byly stvořeny. Modifikace proteinů záleží na chemických skupinách na jejich povrchu. Např. aminoskupina může být modifikována acetylací, metylací, fosforylací a dalšími. Hydroxylová skupina je nejčastěji acetylována či fosforylována (viz obr. 2) [65].

Příkladem významných posttranslačních modifikací je syntéza lantibiotik (skupina unikátních antibiotik, které jsou produkovány gram pozitivními bakteriemi) [57].

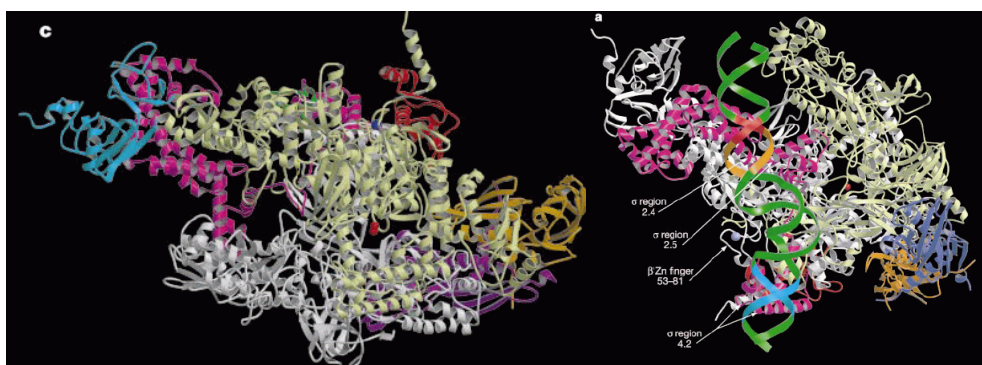
2 Transkripce

2.1 Iniclace

Iniclace transkripce je často klíčovou fází regulaci transkripce. Iniciační transkripce rozdělíme do několika částí: formace komplexu RNAP na promotoru, abortivní iniciace a promoter escape (tedy únik RNAP z promotoru a pokračování v transkripci) [8].



Obrázek 2: **Posttranslační modifikace aminokyselin.** **A** – Aminokupina lysinu (K) se stává objektem pro acetylaci a ostatní modifikace. Mohou existovat další modifikace jako např. propionylace, butyrylace a modifikace pomocí PLP (pyridoxal-5'-fosfát), což je biologicky aktivní forma vitamínu B₆. **B** – Hydroxylová skupina serinu (S) a threoninu (T) může být fosforylována nebo acetylována. **C** – Hydroxylová skupina tyrosinu (Y) se stává cílem kompetice fosforylace a acetylce [65].



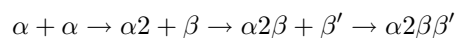
Obrázek 3: **Krystalová struktura RNAP u *T. thermophilus*.** Barevné zobrazení podjednotek: β khaki, β' bílá, αI modrá, αII oranžová, purpurová, ω růžová. **c** – Celková struktura RNAP ve tvaru krabího klepeta. **a** – Uzavřený komplex RNAP s promotorovou oblastí [61].

2.1.1 Bakteriální RNAP

Bakterie obsahují pouze jednu formu RNAP jádra (E), které je tvořeno pěti podjednotkami ($\alpha 2\beta\beta'\omega$) s hmotností cca 400 kDa [67]. Jádro samo o sobě není schopno rozpoznat promotor. K tomuto účelu jádro naváže podjednotku σ ($E\sigma$) a tento komplex se označuje jako RNAP holoenzym (viz obr. 3) [11], který dokáže rozpoznat promotor, navázat se a iniciovat transkripci.

Šest podjednotek holoenzymu RNAP ($\alpha 2\beta\beta'\omega\sigma$) je u bakterií vysoce konzervovaných. Všechny, až na podjednotku σ , mají homology u eukaryot a archeí (viz tab. 1).

Dimer podjednotek α tvoří lešení, na které se váží β a β' podjednotky s katalytickou funkcí [26] a které propůjčují RNAP tvar krabího klepeta. Jedno klepeta tvoří podjednotka β a druhé β' . Klepeta tvoří vnitřní kanál široký 27 Å (= 2,7 nm) s aktivním místem na zadní straně ve kterém jsou pro katalýzu potřeba Mg^{2+} ionty [25]. Skládání podjednotek RNAP probíhá podle schématu:



Podjednotka ω , která není esenciální pro buňku, asistuje β' při navazování na $\alpha 2\beta$ [26].

Již v roce 1969 bylo objeveno, že iniciace transkripce je inhibována rifampicinem, který se váže na RNAP [10].

Tabulka 1: Homology podjednotek RNAP [47].

Bakteriální	Archaea	Eukaryotické		
		RNAPI	RNAPII	RNAPIII
β'	RpoA', RpoA''	RPA1, RPB1, RPC1	RPA1, RPB1, RPC1	RPA1, RPB1, RPC1
β	RpoB (RpoB'/RpoB'')	RPA2, RPB2, RPC2	RPA2, RPB2, RPC2	RPA2, RPB2, RPC2
α_I a α_{II}	RpoD, RpoL	RPC5 a RPC9	RPB3 a RPB11	RPC5 a RPC9
ω	RpoK	RPB6	RPB6	RPB6

2.1.2 Podjednotky RNAP

alfa Je tvořena asi 330 AMK (její molekulová hmotnost je 36 kDa). Je rozdělena na 2 domény, větší je amino-terminální doména (α NTD), která se podílí na dimerizaci α podjednotek a je zodpovědná za vazbu β a β' . Kratší karboxy-terminální doména (α CTD) váže DNA a hraje důležitou roli při vazbě na promotor [24]. Na podjednotku α se váží některé transkripční aktivátory [22].

Podjednotka α tvoří dimer v jádře RNAP. Obě podjednotky α jsou sekvenčně totožné, ale každá jinak interaguje s RNAP (podjednotka α_I se váže na β a podjednotka α_{II} se váže na β') [42].

beta Je složena z asi 1 340 AMK [9] (molekulová hmotnost je přibližně 150 kDa). Je kódována genem *rpoB*. Zaujímá s podjednotkou β' tvar klepeta RNAP a zároveň obsahuje aktivní centrum RNAP (Mg^{2+} ionty). Na tuto podjednotku se váží antibiotika (např. rifampicin a streptolydigin) [22].

beta' Je složena z asi 1 400 AMK (molekulová hmotnost je přibližně 155 kDa) a tvoří s β aktivní centrum RNAP [9]. Napomáhá se vázat na DNA (β' NH2 – terminální Zn^{2+} vázající doména (β' ZBD) se váže na mezerník promotoru, na pozici -22 templátového a -27 netemplátového vlákna) a hraje roli při terminaci transkripce [44, 22].

omega Je nejmenší podjednotka RNAP (molekulová hmotnost je 10 kDa) [10, 41]. Je kódována genem *rpoZ* u *E. coli*. Tento gen se nachází ve stejném operonu jako *spoT* (který kóduje pyrofosfát degradující ppGpp a pppGpp) a bylo prokázáno, že ω hraje roli v regulaci stringentní odpovědi (viz 3.2). Podjednotka ω váže a chrání podjednotku β' a tím se podílí na uspořádání RNAP. Dále se ω podílí na regulaci transkripce, pomáhá RNAP adaptovat se na stres a přispívá k přežití stacionární fáze [41].

Podjednotka ω není esenciální pro funkci RNAP. Transkripce je schopna běžet i bez její přítomnosti [10].

sigma Podjednotka σ má hlavní roli při iniciaci transkripce. Rozpoznává a váže RNAP na promotor, hraje důležitou roli při oddělení DNA vláken, promotor *escape* a *clearence* [61]. Pouze RNAP holoenzymem ($E\sigma$) je schopna rozpoznat promotor. Naopak nenavázaná σ je auto-inhibována a neváží se na ni promotorové elementy a transkripční aktivátory [8, 11].

Sequenace bakteriálních genomů a jejich analýza odhalily dvě nepříbuzné rodiny bakteriálních sigma faktorů. Do první rodiny patří ty, které tvoří promotorový komplex za nepřítomnosti dalších faktorů či energie (př. σ^{70} – pojmenována podle molekulové hmotnosti 70 kDa, σ^A u *T. aquaticus*) [8, 22, 45].

Druhá minoritní rodina sigma faktorů, rodina σ^{54} , tvoří RNAP holoenzym, který při tvorbě promotorového komplexu nachází promotor, ale požaduje další proteinové faktory a získává energii hydrolýzou ATP či GTP při tvorbě promotorového komplexu [8]. Rodina σ^{54} tedy využívá odlišnou cestu při formaci otevřeného komplexu (RP_O) než σ^{70} [25].

Většina eubakterií obsahuje mnoho faktorů σ z rodiny σ^{70} a většinou pouze několik málo reprezentantů z rodiny σ^{54} . Rozdělení členů z rodiny σ^{54} je různorodé, např. neznáme reprezentanty u gram pozitivních bakterií ani u sinic [25].

Genomy obsahující rodinu σ^{70} mohou mít tento faktor v zastoupení od jednoho (*Mycoplasma sp.*) až po 60 faktorů (*S. coelicolor*). Např. *E. coli* obsahuje 6 faktorů σ z rodiny σ^{70} , kdežto *B. subtilis* obsahuje 18 faktorů z rodiny σ^{70} .

U gram pozitivních bakterií je vyšší počet σ faktorů vysvětlován využitím faktorů při sporulaci [25].

Rovněž byl v současnosti popsán případ 2-podjednotkového faktoru σ u *B. subtilis* složeného z proteinů YvrI a YvrHa. YvrI obsahuje doménu podobnou podjednotce σ regionu 4, který se váže na podjednotku β . YvrHa obsahuje doménu podobnou podjednotce σ regionu 2 a váže se na podjednotku β' . Protein YvrHa hraje esenciální roli při stabilizaci otevřeného komplexu RNAP a interaguje s NTD proteinu YvrI. Protein YvrHa se nejspíše váže na místo promotoru -10, zatímco YvrI nalézá místo -35 (což se shoduje s funkcemi homologních σ regionů). Po spojení těchto dvou podjednotek faktoru σ je umožněna efektivní iniciace transkripce [40].

2.1.3 Interakce podjednotky σ s promotorem

Jak již bylo zmíněno, pouze pokud σ interaguje s RNAP holoenzymem, je schopna rozpoznat promotor. Podjednotka σ interaguje s RNAP holoenzymem plochou $8\,230\text{ \AA}^2$ [45]. Podjednotka σ je orientovaná C-terminální doménou proti proudu a N-terminální doménou po proudu transkripce při navázání RNAP holoenzymu na DNA [26].

Podjednotka σ byla rozdělena podle struktury do čtyř domén. Dále byly tyto domény rozděleny na regiony (oblasti) a číselně seřazeny podle vzdálenosti od N' konce (viz obr. 6). Rozlišujeme čtyři strukturální domény podjednotky σ [61]:

- N-terminální doména 1 (ND1) – obsahuje oblast 1.2 a rozkládá se až do poloviny oblasti 2.4,
- N-terminální doména 2 (ND2) – obsahuje oblasti 2.4 až 3.1,
- „linker“ doména (LD) – obsahuje oblast 3.2,
- C-terminální doména (CD) – obsahuje oblasti 4.1 a 4.2.

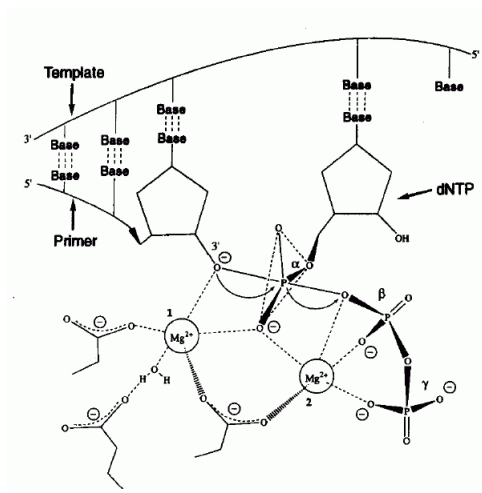
Oblast 4.2 interaguje s -35 hexamerem promotoru; region 2.4 rozeznává a váže -10 oblast promotoru, což jsou nejdůležitější oblasti pro rozeznání promotoru pomocí σ (více informací v sekci 2.2). Vzdálenost mezi regiony 2.4 a 4.2 v σ je cca 40 \AA , což je mnohem menší vzdálenost, než mezi -35 a -10 oblastí promotoru. Aby se σ mohla navázat, dochází ke konformační změně σ a vzdálenost mezi zmíněnými regiony se rozšíří. Mechanismus konformační změny zajišťuje vazba σ region 4.2 na podjednotku β (β flap). β flap se dá do pohybu a prodlužuje tak vzdálenost mezi regiony σ a díky tomu se σ může navázat na promotor [8].

Region 1.1 zajišťuje auto-inhibici σ pokud není navázána na RNAP (zakrývá DNA- vazebné oblasti na σ a tím znemožňuje nalézt promotor).

Region 3.2 nejspíše zapřičiňuje vznik abortivních transkriptů. Region 2.3 se účastní při oddělování vláken dvoušroubovice DNA [61, 8, 25].

2.1.4 Molekulární mechanismus syntézy DNA a RNA

Proces polymerace (d)NTP probíhá stejným mechanismem u všech enzymů, které jsou schopny tuto funkci vykonávat. Tedy DNA/RNA polymerasa a reverzní transkriptasa. V aktivním místě enzymu se vyskytují dva ionty Mg^{2+} , které jsou koordinovány v katalytickém místě pomocí kyselých aminokyselin (např. konkrétně RNAP obsahuje dva aspartáty). Pro všechny tyto enzymy shodně platí, že Mg^{2+} jsou v kontaktu s koncem vznikajícího řetězce RNA $3'\text{OH}$ a s (d)NTP α -fosfátem. Polymerace dNTP probíhá díky vznikající vazbě mezi $3'\text{OH}$ skupinou ribosy a α -fosfátem dNTP (odštěpí se pyrofosfát). Mg^{2+} č. 2 interaguje se všemi třemi fosfáty dNTP a usnadňuje odpojení pyrofosfátu. Mg^{2+} č. 1 snižuje pK_a $3'\text{OH}$

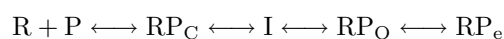


Obrázek 4: **Přechodný stav v rámci polymerace dNTP.** Mg^{2+} č. 1 koordinuje vazbu mezi $3'OH$ a α -fosfátem dNTP. Mg^{2+} č. 2 stabilizuje pentagonické uspořádání okolních kyslíků a usnadňuje odtrhnout pyrofosfát [58].

při tvorbě vazby $3'O^-$ a stabilizuje úhel 90° mezi $3'-O-H-O$ a α -fosfátem v přechodném stavu [58]. Tyto vazby jsou názorně ukázány na obr. 4.

2.1.5 Mechanismus iniciace transkripce

Existují tři stavy komplexu RNAP(R) s promotorovou DNA (P): uzavřený komplex (RP_C), přechodný komplex (I), otevřený komplex (RP_O), elongační komplex (RP_e). Tyto konformační změny nejsou poháněny hydrolyzou ATP, ale vazbou volné energie a tvorbou intermediátů. Největší konformační změna nastává, když RNAP nasedne na DNA a “sevre klepeta” kolem DNA [26]. Průběh iniciace transkripce vyjadřuje schéma [44]:

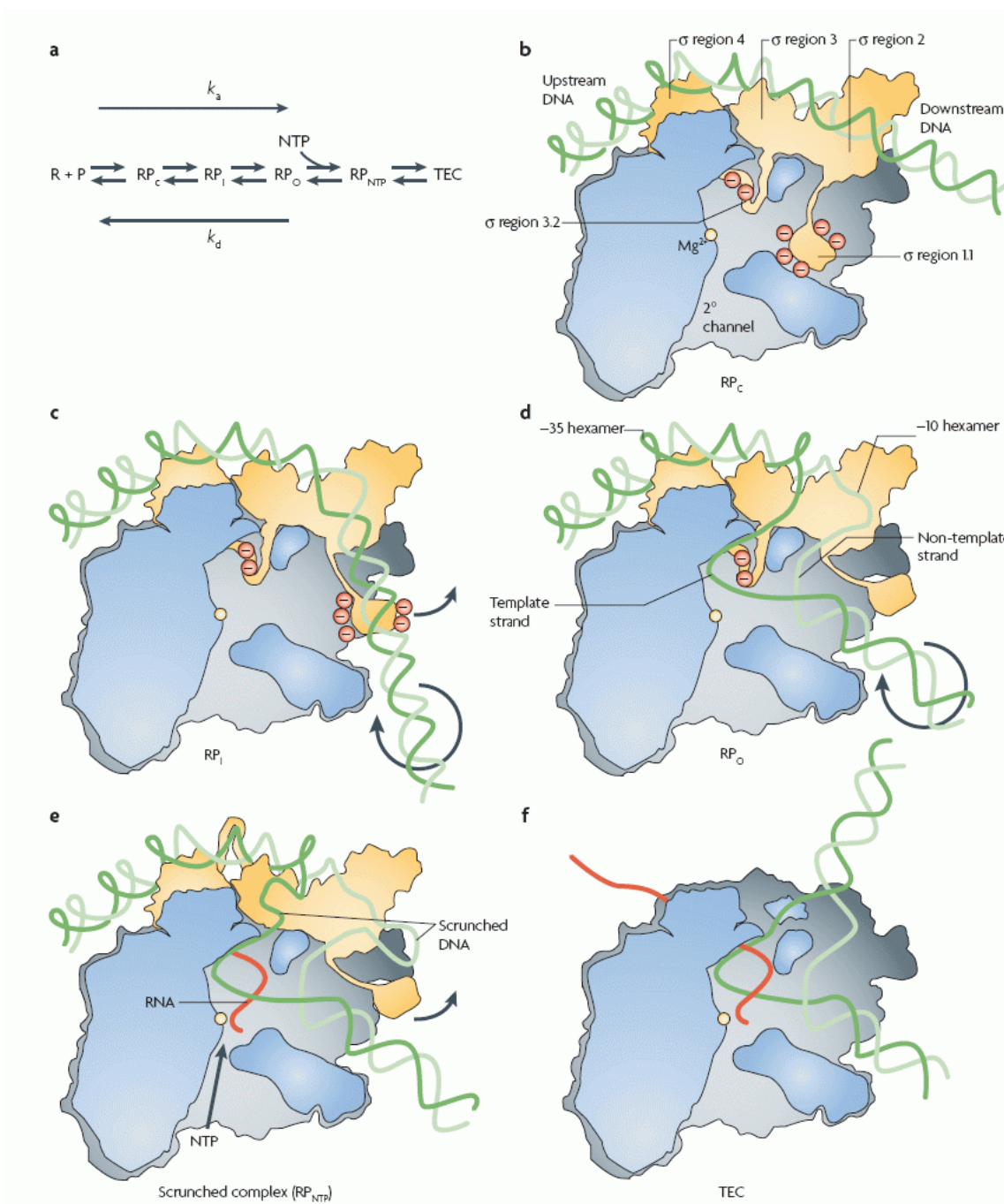


Nejdříve se RNAP naváže na promotor a vytvoří uzavřený komplex RP_C . V tomto stádiu RNAP obklopuje DNA v pozici od -55 do +1 (v +1 pozici začíná transkripce) a DNA je stále kompletně dvouvláknová. RNAP chrání -35 i -10 hexamery a DNA zatím ještě nevstoupila do hlavního kanálu.

Posléze nastává proces, který byl označen jako isomerizace. Jedná se o změnu jak RNAP, tak i DNA. Spodní okraj přechodného komplexu se rozšíří až na pozici -12 a báze DNA se začínají oddělovat v okolí -10 hexameru (tání promotoru).

Jakmile RNAP přejde do formy RP_O , +1 pozice templátového vlákna je připravena k přiřazení iniciačního nukleotidtrifosfátu (iNTP). V RP_O jsou separována vlákna DNA v rozmezí -11 až po +3 [26]. RP_O je v rovnováze s I a tato rovnováha záleží na mnoha faktorech: teplotě, koncentraci Mg^{2+} , promotorové sekvenci a dalších [44].

Z dřívějších poznatků vyplývá, že iniciaci transkripce výhradně ovlivňují pouze aktivátory a represory, které se váží na DNA poblíž RNAP. Díky intenzivnímu studiu iniciace transkripce bylo zjištěno, že mnoho iniciačních faktorů se váže přímo na RNAP bez přímé vazby na DNA. Tyto faktory působí na specifické kinetické kroky při přechodu na otevřený komplex RNAP.



Obrázek 5: **Kroky iniciace transkripce:** **a** – RNAP se naváže na promotor (R+P), přechází přes uzavřený komplex (RP_c), intermediát (I) na otevřený komplex (RP_o). Iniciace transkripce je naznačena jako připojení NTP do RP_o a následuje transkripce samotná (TEC). k_a je určena asociační konstantou vytvoření RP_o a k_d značí disociační konstantu. Každý krok je zobrazen na **b-f**. Tmavě zelenou je zobrazeno templátové vlákno, světle zelenou nekódující vlákno a červené vlákno zobrazuje RNA transkript opouštějící kanál RNAP. Mg^{2+} ionty jsou v aktivním místě zobrazeny žlutými kroužky, naopak červené náboje značí acidické zbytky regionu 1.1 a 3.2 podjednotky σ . **b** – V RP_c je DNA dvouvláknová a přesouvá se do hlavního kanálu. **c** – V intermediátu (I) se region 1.1 σ podjednotky vysouvá směrem od aktivního místa a tím se DNA dostává do hlavního kanálu a začínají se od sebe vlákna DNA separovat. **d** – V RP_o se vlákna DNA oddělí a templátové vlákno se nasouvá na pozici pro začlenění iNTP – tzv. scrunched komplex. **e** – Templátové vlákno je posouváno směrem po směru transkripce a podle něj jsou zařazovány NTP, které přicházejí sekundárním kanálem. **f** – Elongační komplex RNAP opustila σ podjednotka [26].

2.1.6 Rozdíly v RNAP a transkripci mezi *E. coli* a *B. subtilis*

Z několika milionů až miliard bakterií byly studovány RNAP pouze u několika bakterií, přičemž hlavní důraz byl na tyto tři: gram negativní *Escherichia coli* a *Thermus aquaticus*, gram pozitivní *Bacillus subtilis*. Zejména o těchto třech polymerasách byly získány poznatky, které tvoří většinu dostupných informací. Bohužel, zatím ani o jedné bakteriální RNAP nejsou známy kompletní informace (struktura, biochemie, genetika) [5].

Celkový tvar RNAP je konzervován i mezi vzdáleně příbuznými eubakteriemi. Např. struktury RNAP *T. aquaticus* (3,3 Å) a *E. coli* (12 Å) obsahují stejný základ [67]. Důležité mechanismy transkripce jsou kódovány v evolučně konzervovaných regionech, zatímco na povrchu enzymu jsou variabilní proteiny zprostředkovávající interakci s regulačními proteiny. RNAP u *E. coli* a *B. subtilis* jsou identické pouze z 50 %.

Hlavní rozdíly RNAP [3, 5]:

- Formování otevřeného komplexu u *E. coli* je esenciálně ireversibilní, kdežto na většině promotorů u *B. subtilis* zůstává v nestabilním otevřeném komplexu, který je v rovnováze s uzavřeným komplexem lehce přeměnitelným na nenavázanou RNAP.
- *B. subtilis* má menší RNAP, oproti *E. coli*. RNAP *E. coli* má navíc některé domény.
- RNAP u *B. subtilis* váže pro nalézání promotoru σ^A . *E. coli* používá podjednotku σ ze stejné rodiny (σ^{70}).
- *B. subtilis* váže na RNAP podjednotku δ , ω_1 a ω_2 . U *E. coli* se vyskytuje pouze ω (homolog ω_2).
- Pozastavování (pausing) RNAP během transkripce u *E. coli* hraje důležitou roli v regulaci genové exprese pomocí atenuace. Odpovídají operony u *B. subtilis* jsou také regulovány pomocí atenuace, ale jiným mechanismem, neboť pausing RNAP nevyužívá.
- *B. subtilis* a *E. coli* se liší v rozpoznání terminačních signálů.

Rozdíl v transkripci:

- 75 % genů v *B. subtilis* je transkribováno ve směru vedoucího vlákna, kdežto u *E. coli* je stejnoměrně přepisováno kódující i nekódující vlákno.

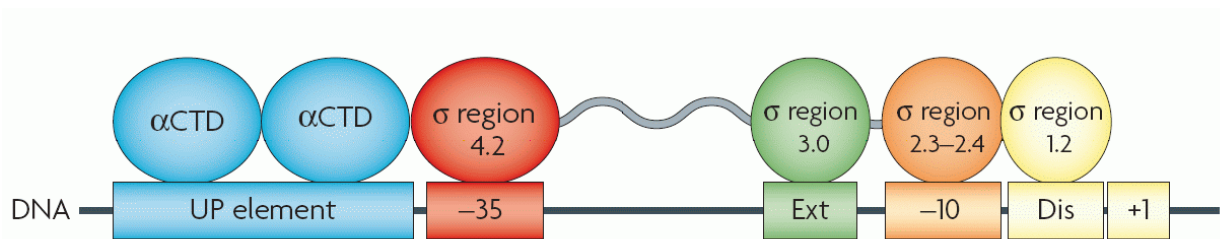
2.2 Promotor

Promotor je regulační oblast DNA, ležící proti směru transkripce od +1 místa. +1 místo značí první nukleotid, od něhož transkripce začíná. Jak již bylo řečeno, jádro RNAP samo není schopno rozpoznat promotor. Proto váže podjednotku σ , která rozpozná a naváže se na promotor. Promotor je rozdělen na tyto části:

UP element – AT bohatá oblast mezi -40 a -60. Interaguje s α CTD RNAP [19].

Oblast -35 oblast – interaguje s regionem 4.2 podjednotky σ . Konsensusní sekvence pro tuto oblast je určena hexamerem 5'-TTGACA-3' od -35 do -30 pozice proti směru transkripce. Tato oblast společně s oblastí -10 se udává jako nejdůležitější pro rozeznání podjednotkou σ [26].

Mezerník (spacer) – je obvykle dlouhý 17 bp a odděluje oblasti -35 a -10 [19]. Terminální NH2 doména podjednotky β' , která obsahuje Zn^{2+} (β' ZBD) má kontakt s mezerníkem promotoru (na -22 templátového a -27 netemplátového vlákna). Tato interakce se však nepovažuje za příliš významnou [44].



Obrázek 6: **Elementy DNA a jednotky RNAP, které přispívají k rozpoznání promotoru $E\sigma^{70}$.** Optimální UP elementy interagují s C-terminální doménou podjednotky α (α CTD) RNAP. σ region 4.2 interaguje s -35 oblastí, σ region 2.3 a 2.4 interaguje s vazebným místem -10. σ region 3.0 (2.5) se váže na rozšířenou -10 oblast. Region 1.2 σ interaguje s diskriminátorem. +1 je označení pro start transkripce [26].

Rozšířená oblast -10 – interaguje s σ regionem 3.0 (2.5), který váže 5'-TGX-3' motiv. Region 2.5 byl objeven dříve, než byly objeveny domény (které jsou 4 a podle nich jsou regiony očíslovány), proto posléze se mu začalo říkat region 3.0, protože leží v doméně 3.

Oblast -10 – také nazývána jako Pribnowův box či TATA box. S vazebným místem -10 interagují σ region 2.3 a 2.4. Jeho konsensus sekvence je 5'-TATAAT-3' od -12 do -7 [19, 26].

Diskriminátor – region 1.2 podjednotky σ se váže na tuto oblast. Optimální sekvence je určena jako 5'-GGG-3' od -6 až -4 pozici.

2.3 Promoter escape

Jako promoter escape je označována fáze přechodu z iniciace do elongace transkripce, neboli opuštění promotoru RNAP, která pokračuje v syntéze RNA.

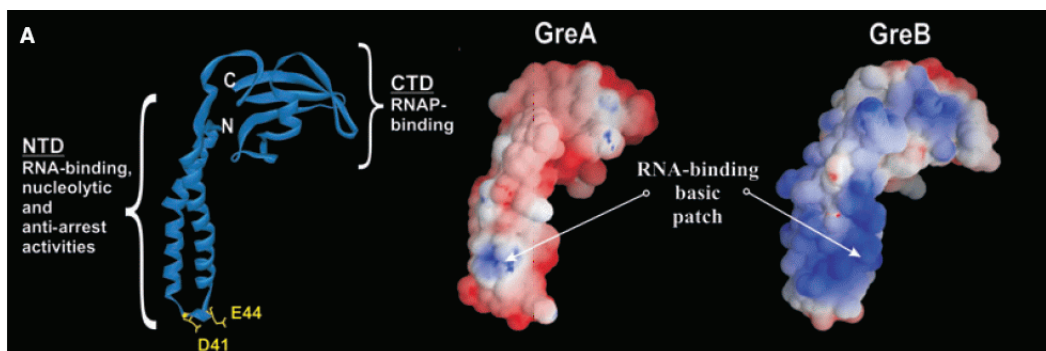
Po zahájení iniciace transkripce jsou v několika cyklech nasyntetizovány krátké oligomery (od 2 do 9 nukleotidů nebo i delší), kdy se RNAP nedaří započít produktivní elongaci, nicméně se RNAP posléze podaří tuto fázi překonat, faktor σ se uvolní a RNAP pokračuje v syntéze RNA. Syntéze těchto krátkých nukleotidů se říká aboritivní iniciace. Aboritivní iniciace je dokumentována u bakterií, bakteriofágů a eukaryotních RNA polymeras pro RNA syntézu *in vitro* [28]. Pomocí hybridizace byl potvrzen výskyt aboritivní transkripce i *in vivo*, kde může hrát důležitou roli [23].

Po oddělení vláken (DNA a RNA) nově syntetizované vlákno RNA opouští RNAP kanálem v podobě vlákna bez určité konformace. To je zapříčiněno přítomností domén σ LD a β flap, které vytvářejí velmi úzký kanál (tzv. RNA-exit kanál) určující v tomto prostoru konformaci RNA. RNA-exit kanál blokuje C-terminální doménu podjednotky σ . Potenciální kolize mezi C-terminální doménou podjednotky σ a vznikající RNA usnadňuje posun RNAP z oblasti -35 na promotoru, spouští se disociace podjednotky σ a RNAP pokračuje elongací [61].

Promoter escape RNAP je nejlépe zdokumentován u *E. coli* RNAP a lze jej rozdělit do 3 kroků [28]:

- RNAP vytváří ternární komplex (RNAP-RNA-DNA) a vznikající transkript se stává vysoce stabilní,
- RNAP se pohybuje po DNA a opouští promotor,
- podjednotka σ je uvolněna z RNAP.

Elongační faktory GreA a GreB usnadňují produktivitu iniciace transkripce *in vitro* i *in vivo* v závislosti na promotoru. Tyto faktory usnadňují únik RNAP z promotoru [28].



Obrázek 7: **Struktura Gre proteinů.** Struktura GreA *E. coli* (vlevo). GreA (uprostřed) a GreB (vpravo) – Povrch je barevně kódován podle elektrostatického potenciálu. Bílá (nenabitá), červená (negativně nabitá – Asp, Glu), modrá (pozitivně nabitá – Arg, Lys) [56].

2.4 Elongace

Elongace je proces, kdy se RNAP posouvá podél řetězce DNA, uvolňuje kódující řetězec a podle templatového řetězce postupně syntetizuje novou RNA, tak, že na volnou 3'-OH skupinu ribosy připojuje komplementární nukleotidy, jejichž donorem jsou NTP. Vznikající RNA se postupně uvolňuje z komplexu s DNA a dvoušroubovice DNA se samovolně obnovuje.

Stejně tak jako iniciace i elongace a terminace slouží jako velmi důležité cíle regulace v průběhu transkripčního cyklu. Aktivita RNAP je v buňce regulována transkripčními faktory, které působí na DNA, RNA nebo na RNAP v průběhu všech fází cyklu. Tyto faktory jsou proteiny, malé peptidy, nekódující RNA (např. 6S RNA), polyfosfáty, aminokyseliny a další molekuly [7]. Elongační faktory předcházejí předčasnému ukončení transkripce, jsou zodpovědné za signály pauz, transkripční překážky, zastavení transkripčního komplexu a regulují rychlost transkripce se zabezpečením správného párování [66].

V průběhu elongace a terminace se v *E. coli* účastní na regulaci např. tyto faktory: Nus faktory (NusA, NusB, NusG a NusE), RfaH, ribosomální S4 protein, Gre faktory (GreA, GreB), Mfd, RapA (HepA) a Rho [7].

2.4.1 Elongační faktory GreA a GreB

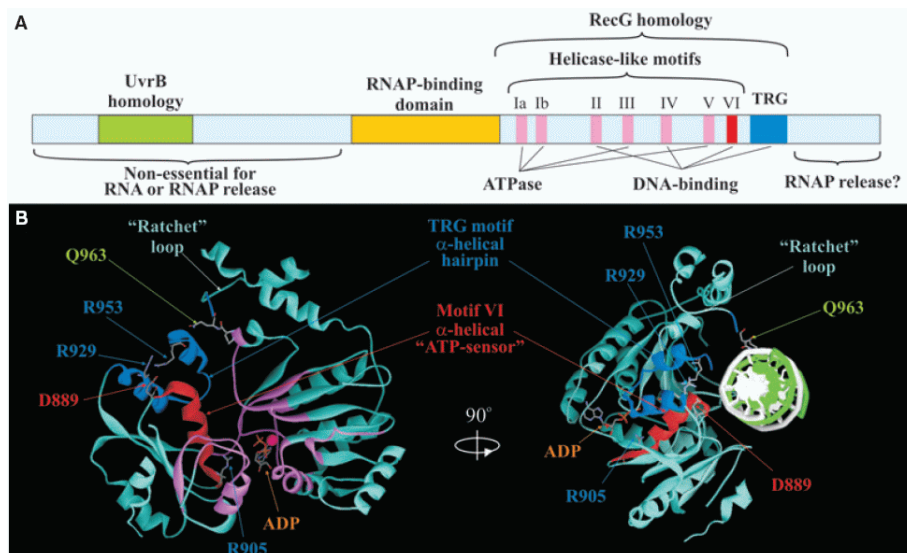
Tyto faktory potlačují pausing RNAP a zastavení *in vitro* a *in vivo* stimulací nukleolytické aktivity RNAP. Všichni členové Gre rodiny proteinů mají délku zhruba 160 AMK a jsou strukturálně rozděleny na 2 domény: N-terminální „coiled-coil“ doména a C-terminální globulární doména. NTD je zodpovědná za RNA-vázající, nukleolytickou a „anti-arrest“ aktivitu, kdežto CTD se váže k RNAP. Gre faktory se vážou do sekundárního kanálu RNAP [7]. Struktura Gre faktorů je zobrazena na obr. 7.

2.4.2 Elongační faktor Mfd

Jeho hlavní funkce spočívá v reaktivaci zastavené RNAP a obnově elongační fáze. Je to evolučně konzervovaný protein o velikosti 130 kDa, který je strukturálně podobný DNA helikase (ale nemá helikasovou aktivitu). Mfd se váže k primárnímu kanálu (DNA vazebnému) RNAP [7]. Struktura Mfd je zobrazena na obr. 8.

2.4.3 Elongační faktor NusA

U *E. coli* i u *B. subtilis* se vyskytuje vysoce konzervovaný elongační faktor NusA, který hraje významnou roli v anti-terminaci, pausingu, terminaci a v *E. coli* je důležitý pro potlačení toxické aktivity u cizích genů [66]. Díky strukturální podobnosti N-terminální domény NusA a regionu 2 podjednotky σ se předpokládá,



Obrázek 8: Strukturální organizace Mfd. **A** – Funkční mapa Mfd. Konzervované úseky jsou označeny barevně. **B** – Model RecG-like translokasové domény Mfd (553 – 966 AMK) vlevo a komplex s dsDNA vpravo. Pozice Mg^{2+} v centru ATPasy je naznačena purpurovou barvou [7].

že oba proteiny interagují se stejným místem RNAP [7]. Nicméně, současné výsledky napovídaly, že σ a NusA se mohou vázat současně [66].

NusA interaguje s částí RNAP zvanou β flap pomocí NTD a nespecifická interakce mezi CTD a RNAP tuto interakci stabilizuje. β flap při formování promotorového komplexu interaguje s regionem 4 podjednotky σ , stejně jako se podílí na formování kontaktu s nascentní RNA v průběhu elongace a terminace [66], viz obr. 9.

NusA u *E. coli* obsahuje dvě přídavné C-terminální domény, které interagují s CTD podjednotky α (α CTD) RNAP. Tyto NusA domény nebyly nalezeny u *B. subtilis* ani u dalších bakterií. Což znamená, že nebyla nalezena ani interakce mezi NusA a podjednotkou α RNAP.

Region 2.2 podjednotky σ interaguje s podjednotkou β' (clamp helix = CH region podjednotky β'), σ region 4 se váže na β flap a NusA interaguje s β flap regionem pomocí NTD. Interakce σ regionu 4 s RNAP je slabá, proto je to první místo, kde dojde k porušení vazby při disociaci σ a přechodu do elongační fáze. Regulační funkce NusA je zřejmě podmíněna C-terminální doménou NusA, která se nachází v okolí primárního kanálu a RNA exit kanálu, kde může interagovat se vznikající RNA. Tím je zřejmě dána role v pausingu, terminaci, anti-terminaci [66].

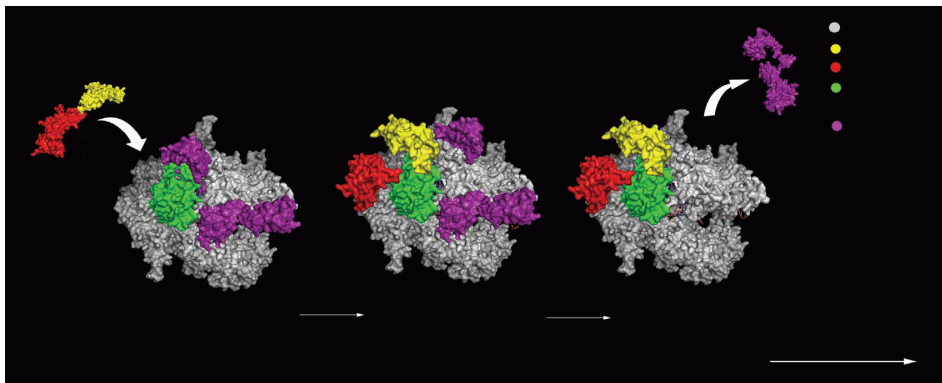
2.5 Terminace

Terminace neboli ukončení syntézy a úplné uvolnění nově vzniklé RNA. Terminace je kódována speciálními sekvencemi ve struktuře DNA, tzv. terminátory.

Bakterie užívají dva hlavní modely terminace transkripce: Rho-independentní, převážně využívající elementy umístěny na mRNA (tzv. „cis-acting“ elementy), a Rho-dependentní, spoléhající se na oba: mRNA elementy i terminační faktory (Rho proteiny, „trans-acting“ elementy) [14].

2.5.1 Rho-dependentní terminace

Zhruba polovina dosud známých terminačních faktorů u *E. coli* je Rho-dependentní. Tyto terminátory leží na přirozeném konci genu a v kontrolní oblasti předcházející kódující oblasti genů, kde hrají velmi důležitou roli při kontrole genové exprese. U *B. subtilis* není Rho esenciální a terminuje jen svoji transkripci.



Obrázek 9: **Navázání σ podjednotky a NusA elongačního faktoru.** **A** – Holoenzym, σ se naváže a probíhá iniciace transkripce. **B** – Na RNAP je stále navázána σ , po disociaci regionu 4 z β flap se naváže NTD NusA přesto, že zbytek σ je stále navázán. **C** – σ opustila RNAP, dochází k utvoření elongačního komplexu [66].

Protein Rho tvoří homohexamery s RNA-dependentní ATPasovou a helikasovou aktivitou, které se vážou na C bohaté oblasti mRNA bez ribosomů. ATPasová aktivita je aktivována interakcí Rho a mRNA a poskytuje energii pro translokaci Rho podél mRNA, dokud nenarazí na RNAP. Poté nastane terminace transkripce a transkript je uvolněn helikasovou aktivitou Rho faktoru. Při opuštění ukončeného transkriptu hrají důležitou roli Rho-dependentní terminační faktory, jako např. NusG, NusA a NusB, se kterými se Rho protein váže.

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

NusA je esenciální pro *E. coli*, je závislý na Rho. U *B. subtilis* je NusA také nepostradatelný, ale je potřebný i v dějích nezávislých na Rho. NusA také působí jako elongační faktor a na rozdíl od NusG zvyšuje RNAP pausing na některých pozastavujících místech a tím zpomaluje elongaci transkripce. Terminaci transkripce pomáhá snižováním rychlosti elongace vedoucí k úplnému zastavení RNAP a následné terminaci [14].

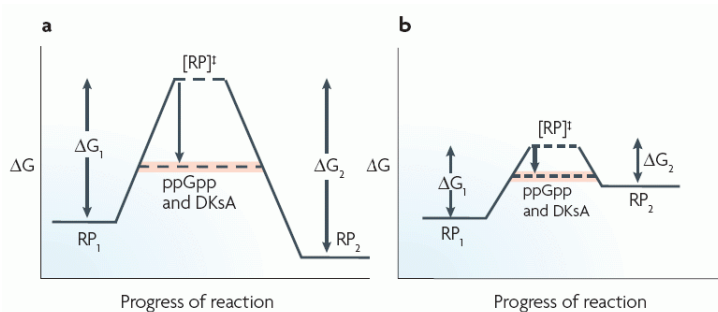
2.5.2 Rho-independentní terminace

Rho-independentní terminace je založena na inverzních (obrácených) opakujících se sekvencích v primární DNA sekvenci (nejčastěji CG bohatá oblast) a následovaných několika thyminovými zbytky. Palindromické sekvence se uspořádají do vlásenky tvořené transkribovanou mRNA. Tato vlásenka zastaví RNAP komplex. Snižující se schopnost uridinu v nascentní RNA vázat adenin v DNA (váží se pouze dvěma vodíkovými můstky) usnadní disociaci RNAP z DNA a ukončení transkripce. Tento způsob ukončení transkripce převládá u *B. subtilis* na rozdíl od *E. coli* [16].

3 Regulace iniciace transkripce

3.1 Regulace transkripčními faktory (bílkoviny)

Genom *E. coli* obsahuje více než 300 genů kodujících proteiny, které jsou předurčeny k vazbě na promotor a regulaci po směru nebo proti směru transkripce. Asi u poloviny těchto proteinů byla jejich funkce objevena experimentálně. Většina těchto proteinů jsou sekvencně specifické DNA-vázající proteiny, což zajišťuje zacílení jejich aktivity na specifický promotor. Některé proteiny kontrolují mnoho genů, jiné naopak pouze jeden či dva geny.



Obrázek 10: **Pozitivní a negativní regulace pomocí ppGpp a DksA.** Kinetické zobrazení vysvětlující pozitivní a negativní regulaci transkripce pomocí ppGpp a DksA. **a** Pozitivní regulace promotorů biosyntézy aminokyselin, RP_2 komplex by měl být stabilní (má nižší volnou energii než RP_1), ale při přechodu musí překonat bariéru s vysokou volnou energií. Tu snižují ppGpp a DksA, snižují aktivační energii a zvyšují frekvenci iniciace transkripce. **b** Negativní regulace rRNA promotorů. RP_2 má vyšší volnou energii než RP_1 , ppGpp a DksA snižují energetickou bariéru a tím podporují disociaci RNAP a inhibují transkripci. RP_1 a RP_2 značí cestu RNAP v tvorbě otevřeného komplexu [49].

Je odhadováno, že sedm transkripčních faktorů (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL a Lrp) řídí asi 50 % regulovaných genů. Přibližně 60 transkripčních faktorů řídí pouze jediný promotor. Jako u většiny proteinů *E. coli* jsou transkripční faktory označovány třípísmennou zkratkou, která popisuje jejich funkci. Čtvrté písmeno, které se vyskytuje pouze u některých názvech, označuje specifický produkt tohoto genu [9].

Transkripční faktory jsou regulovány pomocí kontroly jejich aktivity či kontroly jejich exprese. Existuje několik odlišných mechanismů:

1. DNA-vazebná afinita transkripčních faktorů může být regulována pomocí malých ligandů. Jejich koncentrace fluktuuje v závislosti na nutričním stavu buňky a stresu.
2. Regulace transkripčních faktorů kovalentními modifikacemi, např. fosforylace pomocí kinas.
3. Koncentrace určitého transkripčního faktoru kontroluje míru jeho aktivity, což ovlivňuje expresi a proteosyntézu [9].

Zde jsou uvedeny některé transkripční faktory, které se váží přímo na RNAP:

- GreA a GreB – vázající se do sekundárního kanálu RNAP (viz 2.4.1 na straně 18).
- NusA, NusB, NusC, NusE a NusG – účastní se regulace elongace a terminace závislé na Rho faktoru[5]. NusE a NusB jsou známé jako ribosomální proteiny S10 a jejich hlavní role je regulace antiterminace [38]. Více o NusA v 2.4.3 na straně 18, a o NusG v 2.5.1 na straně 19.
- Mfd – vázající se k primárnímu kanálu RNAP. Účastní se oprav při probíhající transkripci (viz 2.4.2 na straně 18).
- DksA – vázající se do sekundárního kanálu RNAP. Zesiluje účinek malých regulačních molekul (např. iNTP, ppGpp). Viz 3.2.1 na následující straně.

3.2 Regulace malými molekulami (iNTP, ppGpp)

Bakterie se dokáží přizpůsobit změnám prostředí (např. produkují a vylučují antibiotika a enzymy, tvoří spory) [48]. Při nedostatku aminokyselin začne *E. coli* výrazně měnit genovou expresi, čemuž se říká

„stringentní odpověď“. Tato regulační odpověď je aktivována vstupem nenabitě tRNA do A místa ribosomu a zároveň se aktivuje s ribosomem asociovaný protein RelA, který dává signál k syntéze „alarmu“ ppGpp (guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát). Při aminokyselinovém hladovění buňky je exprese stabilních RNA (rRNA, tRNA) inhibována, zatímco exprese enzymů pro biosyntézu aminokyselin a jejich transport je indukována. ppGpp hraje důležitou roli v negativní i pozitivní regulaci (viz obr. 10) [49].

U *B. subtilis* je regulována genová exprese zejména pomocí iNTP. Efekt ppGpp je pouze nepřímý a nezávislý na homologních molekulách DksA [35].

3.2.1 Role ppGpp a DksA

Syntéza ppGpp Enzym RelA syntetizuje (p)ppGpp z GTP/GDP s použitím ATP. Při syntéze (p)ppGpp se zvyšuje koncentrace RelA proteinu v buňce, což je zřejmě způsobeno disociací RelA z ribosomu a schopností se na jiném ribosomu navázat a syntetizovat další (p)ppGpp.

Druhý enzym, který je k syntéze (p)ppGpp potřeba je SpoT. SpoT je bifunkční enzym, který může syntetizovat (p)ppGpp a zároveň ho může hydrolyzovat na GTP/GDP a pyrofosfát (záleží na okamžité rovnováze reakce) [55].

Na rozdíl od *E. coli*, u *B. subtilis* byly nalezeny dva geny, které kódují homogenní molekuly k RelA a SpoT. Produkty genů *yjbM* a *ywaC* jsou relativně malé a odpovídají (p)ppGpp syntetasové doméně RelA-SpoT. Tyto genové produkty byly označeny jako „alarmon syntetases“ (SASs) a jsou schopny syntetizovat (p)ppGpp (produkt genu *ywaC* je indukovaný alkalickým šokem) [46].

Pozitivní a negativní regulace pomocí ppGpp Při nedostatku aminokyselin je syntetizován alarmon ppGpp, který dokáže pozitivně i negativně regulovat genovou expresi.

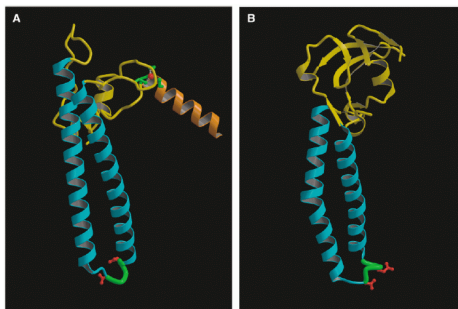
Alarmon ppGpp specificky inhibuje iniciaci transkripce stabilních RNA promotorů *in vitro* i *in vivo*. Promotory rRNA mají CG bohaté oblasti v diskriminátoru, kde se váže region 1.2 podjednotky σ RNAP. Tyto promotory tvoří extrémně nestabilní otevřené komplexy s RNAP v průběhu iniciace transkripce. ppGpp/DksA snižují tuto stabilitu a tím inhibují iniciaci transkripce.

ppGpp přímo aktivuje aminokyselinové promotory *in vivo*, v buněčném extraktu i *in vitro* za přítomnosti purifikované molekuly DksA tím, že zvyšuje rychlost isomerizace RNAP při tvorbě RP_O . Množství ppGpp v buňce slouží jako regulátor odpovědi na vnitřní signály, zatímco DksA působí jako koregulátor (je jí relativně stálé množství v buňce). Na rozdíl od promotorů pro stabilní RNA, promotory pro syntézu aminokyselin mají v diskriminátoru AT bohaté oblasti a proto je RP_O RNAP stabilní a podporovaný ppGpp a DksA [55].

ppGpp snižuje afinitu podjednotky σ^{70} k RNAP holoenzymu a zvyšuje afinitu alternativních σ faktorů k RNAP, které určují globální změnu genové exprese [55].

Transkripční faktor DksA Transkripční faktor DksA (cca 17,5 kDa [52]) je klíčový při pozitivní i negativní kontrole transkripce rRNA *in vivo*. DksA se neváže na DNA, ale do sekundárního (NTP) kanálu RNAP. Delece genu *dksA* má na bakterie pleiotropní efekt. Tento efekt se projevuje v genové expresi, funkci chaperonů, buněčném dělení, požadavcích na aminokyseliny, vnímání hustoty okolních bakterií a virulenci. Přímý efekt delece se projevilo pouze u exprese rRNA, u všech ostatních fenotypů se projevilo nepřímo [49].

Molekula DksA je složena ze 2 domén: globulární domény a „coiled-coil“ domény s dvěma kyselými zbytky (Asp). DksA vykazuje strukturní podobnost s GreA a GreB elongačními faktory, ale sekvenční homologie nalezena nebyla (viz obr. 11). Všechny tyto transkripční faktory se váží do sekundárního kanálu RNAP [52, 50].



Obrázek 11: **Struktura DksA(A) a GreA(B)**. Acidické invariantní AMK jsou označeny červeně jako ball-and-stick model [50].

Vazba ppGpp, DksA a podjednotky ω na RNAP Podle nových poznatků o krystalové struktuře vazby ppGpp na RNAP bylo zjištěno, že DksA nezávisí na přítomnosti či absenci ppGpp. DksA přesouvá Mg^{2+} ionty v aktivním centru RNAP pomocí Asp na koncích své „coiled-coil“ domény, tak, aby je pak mohlo ppGpp kontaktovat. Zároveň nebyla pozorována kompetice mezi ppGpp a iNTP o rRNA promotorový komplex *E. coli* v průběhu iniciace transkripce [62].

Pomocí krystalografie RNAP *T. thermophilus* bylo zjištěno, že ppGpp se může vázat na RNAP ve dvou odlišných orientacích do jednoho místa na zadní stranu sekundárního kanálu blízko aktivního centra (každým difosfátem koordinuje vazbu k Mg^{2+}). Orientace navázání ppGpp nejspíše určuje spuštění pozitivní či negativní regulační odpovědi.

Podjednotka ω je kodována genem *rpoZ*, který leží na stejném operonu jako *spoT* (viz. 3.2.1). Při použití RNAP holoenzymu s chybějící podjednotkou ω byla zjištěna necitlivost k ppGpp *in vitro*. Po přidání purifikované ω k RNAP, opět byla zaznamenána senzitivita k ppGpp. Transkripční faktor DksA dokáže potlačit nedostatečnost odpovědi RNAP holoenzymu bez ω na ppGpp *in vitro*. To nám vysvětluje rozpor mezi reakcí mutantů s delecí genu *rpoZ* *in vitro* a *in vivo*. Ačkoliv DksA nám dovolí obejít nepřítomnost ω při odpovědi na ppGpp, je důležité zdůraznit, že tyto dva proteiny nejsou přebytné: ω nemůže nahradit funkci DksA v regulaci iniciace transkripce a DksA nemůže nahradit funkci podjednotky ω při stavbě RNAP [63].

Podjednotka ω i ppGpp se váží na podjednotku β' . Podjednotka ω může ovlivňovat funkci ppGpp pomocí alosterických efektů na ppGpp-vázací místo či alosterických efektů na aktivitu ppGpp [6, 63, 50].

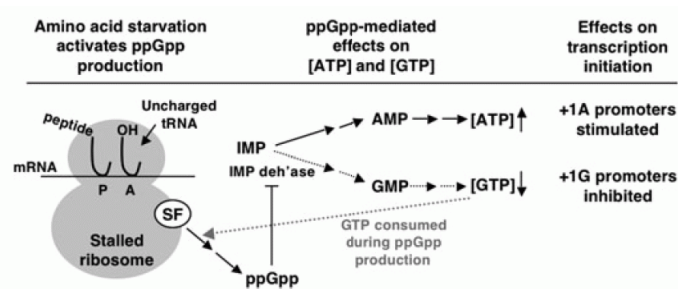
3.2.2 Regulace iniciace transkripce u *B. subtilis*

Dvě malé molekuly regulují mnoho promotorů: iniciační NTP (iNTP) a ppGpp. Koncentrace těchto molekul se mění při změnách růstového cyklu či fáze [52].

E. coli a *B. subtilis* používají odlišné strategie změny genové exprese pomocí malých molekul jako odpověď na nedostatek aminokyselin [36].

Na rozdíl od *E. coli*, je efekt ppGpp na transkripci promotorů rRNA u *B. subtilis* nepřímý (zvyšováním koncentrace ppGpp se v buňce snižuje koncentrace GTP, která přímo reguluje aktivitu těchto promotorů) a nezávislý na homologních molekulách DksA. rRNA promotory *B. subtilis* jsou *in vitro* necitlivé na ppGpp, ale jsou závislé na koncentraci iNTP, stejně jako u *E. coli* (GTP u *B. subtilis* a GTP, CTP, ATP u *E. coli*) [35].

U *B. subtilis* jsou obecně nejčastějšími iNTP +1A a +1G (vyskytují se +1A > +1G > +1T > +1C). Senzitivita promotoru k iNTP je důležitá pro efektivitu transkripce, která je úměrná fyziologické koncentraci iNTP v buňce. Po mutaci promotorové oblasti +1 (+1G na A, +1A na G) se ukázalo, že pro maximální iniciaci transkripce +1A na +1G mutanty je potřeba vysoká koncentrace GTP a pro +1G na



Obrázek 12: **Regulace iniciace transkripce pomocí iNTP v průběhu stringentní odpovědi u *B. subtilis*.** Nedostatek AMK zapříčiní vstup nenabitých AMK do A místa ribosomu, což aktivuje stringentní faktor (SF). SF produkuje pppGpp, který se rychle mění na ppGpp. Vysoká koncentrace ppGpp inhibuje IMP dehydrogenasu. Tato inhibice způsobí snížení koncentrace GTP a zvýšení koncentrace ATP v buňce. Vysoká koncentrace ATP stimuluje iniciaci transkripce stringentně regulovaných promotorů obsahujících +1A. Naopak snížení koncentrace GTP v buňce inhibuje iniciaci transkripce stringentně regulovaných promotorů obsahujících +1G [60].

+1A mutanty promotorů potřebují vysokou koncentraci ATP *in vitro*. Při testování stringentní odpovědi těchto mutantů se ukázalo, že +1G je důležitý při snižující aktivitě, protože iGTP je limitující pro iniciaci těchto promotorů. +1A je důležitý pro zvyšující se aktivitu promotoru. Tedy obecně iNTP určují, jestli stringentně hlídaný operon bude při stringentní odpovědi aktivován či reprimován [36].

V průběhu stringentní odpovědi u *B. subtilis* se koncentrace ATP a GTP mění recipročně. To je zprostředkováno pomocí alarmonu (p)ppGpp, který inhibuje inosin monofosfát (IMP) dehydrogenasu, první enzym v cestě biosyntézy GTP. Inhibice biosyntézy GTP způsobí akumulaci IMP, což je poslední společný intermediát syntézy ATP a GTP (viz obr. 12). Proto při hladovění se v buňce sníží koncentrace GTP a zvýší se koncentrace ATP, což iniciuje sporulaci [39].

4 Podjednotka delta

První zmínka o δ se objevuje v roce 1975, kdy byla popsána jako faktor kodovaný hostitelem, který je součástí virové RNAP a zvyšuje transkripci DNA sekvence středních a pozdních (SP01) fágových genů [51]. Naopak transkripci časných fágových genů silně ovlivňuje faktor σ , zatímco δ peptid transkripci těchto genů neovlivňuje. Díky zjištění, že peptid δ je navázán na RNAP, začal být považován za podjednotku δ RNAP [59].

Později byla podjednotka δ zaznamenána i u několika druhů rodu *Bacillus* [2] a obecně se vyskytuje jen u gram pozitivních bakterií. Srovnání AMK sekvencí podjednotky delta je zobrazeno v sekci 5 na straně 30.

4.1 Základní informace a struktura podjednotky δ z *B. subtilis*

Relativní molekulární hmotnost podjednotky δ je cca 21 400 a je složena z 173 AMK u *B. subtilis*. Je kodována genem *rpoE* [37, 51], který je exprimován ze σ^A dependentního promotoru [53].

Isoelektrický bod (pI) má hodnotu 3,6. Protein δ je složen ze 2 hlavních oblastí:

- N-terminální doména o velikosti 13 kDa (95 AMK). Ve své struktuře obsahuje 32 % alfa-helixů a 16 % beta listů (při pH = 8,0). Náboj AMK je rovnoměrně rozložen.
- C-terminální doména o velikosti 8,5 kDa (69 AMK). Tato doména je vysoce nestrukturovaná a celkově výrazně záporně nabitá. Je velmi bohatá na aspartát a glutamát.


```

MGIKQYSQEELKEMALVEIAHELFEHKKPVPFQELL
NEIASLLGVKKEELGDRIAQFYTDLNIDGRFLALSDQ
TWGLRSWYPYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEHLID
LDEFEEDIDEDDIDLEVEEELDLEADDFDEELDEDD
DBLEFEEDIIDEDDEEYDDEEEEIK

```

Obrázek 13: **Aminokyselinová sekvence proteinu δ** . Primární struktura proteinu δ je prezentována pomocí písmena označující aminokyselinu. Možné opakující se hydrofobní elementy v NTD jsou podtrženy. Kyselé zbytky v CTD jsou označeny šrafováním a ohraničením je označena lysinová sekvence [17].

Tyto 2 regiony jsou spojeny lysinovou sekvencí (7-9 AMK). δ také obsahuje několik opakujících se hydrofobních elementů (po 7 AMK). Viz obr. 13.

N-terminální doména (NTD) se váže na RNAP a zároveň orientuje C-terminální doménu (CTD) k vazbě na povrch RNAP. CTD napodobuje svou strukturou NK a kompetuje s ní ve vazbě do aktivního místa. Tím odstraňuje RNA transkript z RNAP-RNA binárního komplexu, což může mít za následek recyklaci jádra RNAP (tímto mechanismem RNAP ukončí aktuální transkripci a je schopna opět nasednout na promotor a transkribovat jiný gen). Podobnost CTD a NK může mít za následek schopnost δ odstranit RNAP z nepromotorových oblastí a slabých promotorů [17].

Struktura podjednotky δ byla studována pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Na obr. 14 je zachycena struktura NTD podjednotky δ ($N\delta$) RNAP z *B. subtilis*, resp. prvních 100 AMK. Skládá se ze 4 α -helixů, antiparalelní β -list je složen ze 3 krátkých β -vláken a navazuje na helixy I, III, IV (připomíná „rozklíženou“ trojnožku).

Přestože byly nalezeny strukturní homology $N\delta$ (viz obr. 14), nebyly nalezeny žádné sekvenční homology. Ačkoliv strukturní homology $N\delta$ jsou klasifikovány jako 3-helikální svazky vázající DNA/RNA (tzv. SCOP fold), které váží NK pomocí helixu IV, u $N\delta$ nebyl nalezen důkaz o vazbě NK v komplexu RNAP. Také kvůli plnění správné biologické funkce pravděpodobně nemůže být $N\delta$ asociována s NK [43].

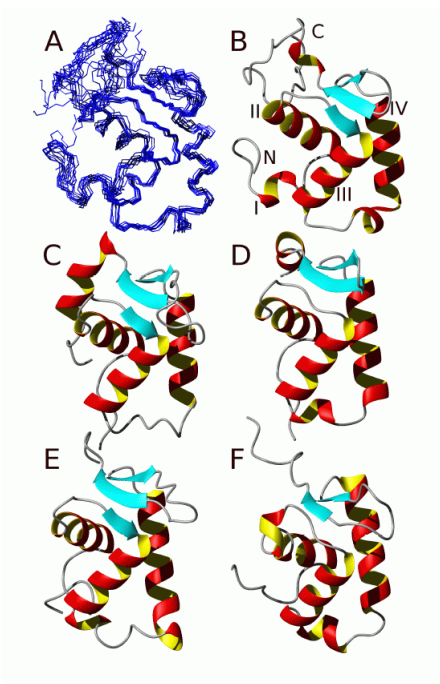
4.2 Biochemické vlastnosti podjednotky δ

Podjednotka δ se váže na RNAP. Působení podjednotky δ závisí na typu templátu a podmínkách transkripce. δ ovlivňuje míru syntézy RNA (může zvyšovat nebo snižovat) [32].

Podjednotka δ zvyšuje promotorovou selektivitu. Podjednotka δ inhibuje RNAP z neinfikovaných buněk *B. subtilis* v průběhu transkripce. Inhibiční efekt je silně závislý na koncentraci KCl v reakční směsi. δ zvyšuje selektivitu syntézy RNA pomocí modifikované formy RNAP SP01 fágem infikovaných bakterií [59]. Za nepřítomnosti δ se RNAP váže nespecificky a transkribuje i časné fágové geny namísto středních a pozdních [4].

Podjednotka δ omezuje interakce podjednotek σ a β (pravděpodobně i β') s nepromotorovými oblastmi DNA. Nejpravděpodobnější vysvětlení pro toto pozorování je, že δ působí jako alosterický efektor konformačních změn RNAP. δ snižuje počet vazeb mezi σ a jádrem RNAP a tím zvyšuje selektivitu vazby RNAP na promotory (Viz obr. 17). Pouze pokud se vytvoří stabilní vazba podjednotky σ na promotor, RNAP zahájí transkripci. Tím je zajištěna vazba specifických úseků DNA. Stabilita komplexu RNAP s nepromotorovou DNA je snižována δ až 1 000krát [1, 27, 32, 54].

Vliv δ na iniciaci transkripce je teplotně závislý. Při nízkých teplotách δ inhibuje iniciaci transkripce a při vyšších naopak stimuluje iniciaci transkripce (což platí pro silné i slabé promotory). Toto je názorně zobrazeno na obr. 15 [32]. *B. subtilis* RNAP všeobecně netvoří stabilní binární komplex (RNAP + RNA). Po porovnání schopnosti formace komplexu RNAP na slabých a silných promotorech (v přítomnosti i



Obrázek 14: **Struktura N δ RNAP a jejich strukturních homologů.** **A** – Zobrazení páteře deseti N δ s nejnižší energií. **B** – Struktura N δ . **C** – Porovnaná s jejím nejbližším homologem Forkhead Box Protein K2. **D** – Forkhead Box Protein P2. **E** – Forkhead Box Protein O1. **F** – Kvasinkový spojovník histonů Hho1p [43].

absenci δ) se ukázalo, že vytvoření transkripční bubliny je snadnější na silném promotoru než na slabém [34].

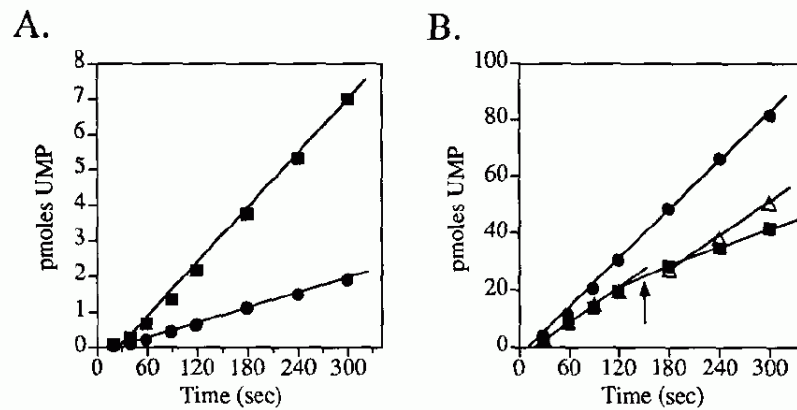
Za podmínek (40 °C), kdy δ stimuluje množství syntetizované RNA na slabých promotorech, δ zároveň snižuje rovnovážnou koncentraci tvorby otevřených komplexů RNAP. Za přítomnosti δ RNAP převážně vytváří uzavřené komplexy (RP_C). Pokud δ chybí, RNAP vytváří zejména otevřené komplexy RNAP (RP_O). S tím souvisí i další pozorování na slabých promotorech, kde se ukázalo, že δ inhibuje formaci komplexu pro rychlý start iniciace transkripce. Na obr. 16 je ukázáno, že v přítomnosti δ je RNAP rychleji inaktivována než pokud δ chybí [32].

Stabilita komplexu RNAP s nepromotorovou DNA je snižována δ až 1 000krát. δ snižuje počet vazeb mezi σ a jádrem RNAP a tím zvyšuje selektivitu vazby RNAP na promotory. Viz obr. 17 [32].

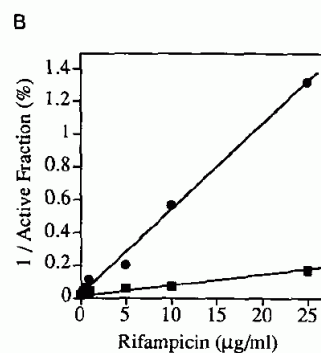
Negativní kooperace mezi podjednotkami σ a δ RNAP *B. subtilis* vyžaduje pro svou správnou funkci mimo jiné dva peptidy: σ je nutná pro vyhledání promotoru a iniciace transkripce a peptid δ snižuje pravděpodobnost nespecifické vazby RNAP na DNA (patrně zvýšením disociace nespecifických komplexů RNAP) [4]. Při hledání promotoru se tedy δ a σ naváží na jádro RNAP současně. Při vysoké koncentraci NaCl se ale snižuje schopnost vazby δ a σ na jádro RNAP.

Tyto dva peptidy jsou ve vztahu negativní kooperace. Negativní kooperace je nejspíše důležitá až v pozdějších fázích transkripce, kdy δ i σ jsou uvolněny z jádra RNAP [30].

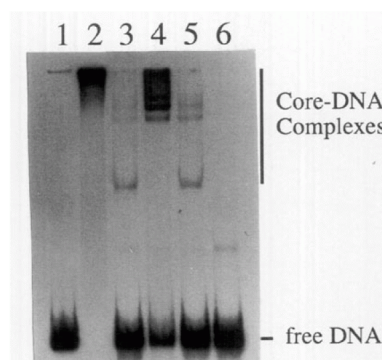
Efekt peptidu δ z *B. subtilis* na kompetici σ -gp28 Genová aktivita v průběhu vývoje fága SP01 je regulovaná na úrovni transkripce. Časné virové geny jsou transkribovány hlavní RNAP (E σ). Střední virové geny jsou naopak transkribovány RNAP (E) ve spojení s SP01 genem kodující protein 28 (gp28) místo podjednotky σ . Chelm a kolektiv testovali, jak ovlivní protein δ kompetici mezi podjednotkou σ a gp28. Ukázalo se, že protein δ ovlivnil výsledek ve prospěch podjednotky σ . Ačkoli pouze lehce,



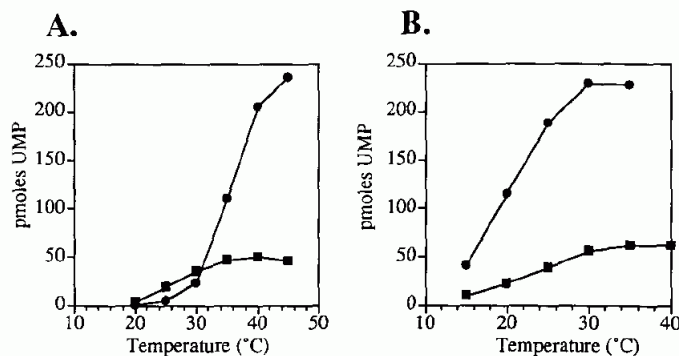
Obrázek 15: **Efekty δ na lokalizaci promotoru a iniciaci v různých teplotách.** RNAP obsahující δ (kolečko), RNAP bez δ (čtverec). **A** – Syntéza RNA při 25 °C. **B** – Syntéza RNA při 40 °C. Šipka značí přidání δ 140 s po začátku reakce a další vývoj je naznačen trojúhelníkem. Přidání δ při 25 °C snižuje a při 40 °C naopak zvyšuje množství vytvořené RNA [32].



Obrázek 16: **Rifampicinová senzitivita RNAP při iniciaci transkripce.** RNAP obsahující δ (kolečko), RNAP bez δ (čtverec), při 40 °C. Převrácená hodnota aktivní frakce RNAP (1/1 %) versus finální koncentrace rifampicinu. Sklon linií ukazuje citlivost, že RNAP obsahující δ je citlivější a bude rychleji inaktivována než RNAP bez δ [32].



Obrázek 17: **Vliv proteinu δ na stabilitu komplexu jádra RNAP s nepromotorovou DNA.** 1 – bez přidání proteinu, 2 – jádro RNAP (E), 3 – E δ , 4 – nejdříve přidáno E a posléze δ , 5 – nejdříve přidána δ a potom E, 6 – pouze δ . DNA s navázanou RNAP se při elektroforéze pohybuje pomaleji [32].



Obrázek 18: **Efekt δ na syntézu RNA z P_{11v} promotoru.** Holoenzym byl složen z proteinu σ^A a δ (kolečko) či bez δ (čtverec). **A** – Transkripce lineárního fragmentu P_{11v} promotoru. **B** – Transkripce supercoiled pACB1 plasmidu [32].

protože δ dramaticky inhibovala celou transkripci a měření probíhalo pouze na zbytku (stále probíhající transkripci). Tento výsledek je “anti-fysiologický” pro vývoj SP01, proto se předpokládá, že protein δ nenapomáhá přechodu časných a středních genů v transkripci *in vivo* [12].

Možná funkční homologie podjednotky δ a σ^{70} U gram negativních bakterií se objevuje podjednotka σ^{70} , která redukuje afinitu RNAP k nepromotorové DNA až 10 000krát a přispívá k selektivě vazby na promotor. Spekuluje se, že podjednotka σ^A (43 kDa) ve spojení s podjednotkou δ (21,5k Da) u *B. subtilis* by mohli mít stejnou funkci jako σ^{70} (70 kDa) u *E. coli*. Po srovnání AMK sekvence podjednotek σ^A a σ^{70} se ukázalo, že jsou homologní až na 245 AMK obsažených mezi regiony 1 a 2 u σ^{70} . V této „inzerci“ je obsaženo 80 AMK záporně nabitých, které mají podobný záporný náboj jako CTD podjednotky δ [18].

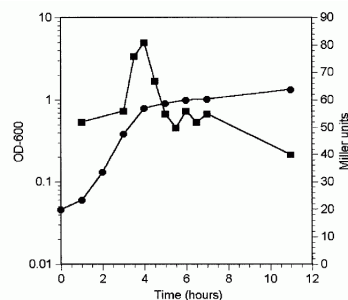
4.2.1 Positivní vliv na procesivitu transkripce

I přes inhibiční efekt podjednotky δ vytvořit transkripční bublinu [33] se ukázalo, že δ stimuluje množství RNA transkriptu v reakcích o několika cyklech. Tento efekt je přisuzován zvýšení recyklace jádra RNAP (tento mechanismu je popsán v kapitole 4.1) [32]. Na obr. 18 je názorně ukázáno, že protein δ celkově stimuluje syntézu RNA [54].

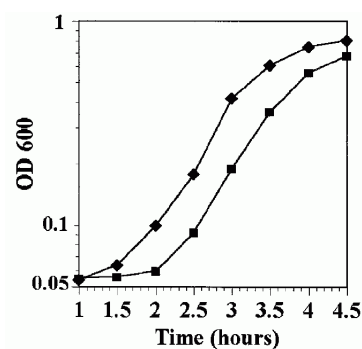
Polyanionické polymery jsou schopny se vázat do místa RNAP pro templát či produkt (např. heparin, ssDNA, AMK kopolymery). CTD peptidu δ obsahuje polyanionický region, který umožňuje odstranění RNA z inhibovaného RNAP-RNA komplexu. RNAP se recykluje a může se účastnit další exprese [17].

Tvorba transkripční bubliny a procesivita transkripce Podjednotka δ ovlivňuje schopnost vytvořit transkripční bublinu. Jak již bylo ukázáno, δ ovlivňuje rovnováhu mezi tvorbou uzavřených a otevřených komplexů RNAP v závislosti na teplotě. δ je schopna zabránit plné maturaci binárního komplexu, tím změni afinitu RNAP a podjednotky σ , čímž zabrání správnému navázání na promotor. CTD podjednotky δ působí jako alosterický efektor RNAP a tím brání konformačním změnám RNAP při torbě transkripční bubliny [13].

Polyanionické polymery jsou schopny se vázat do místa RNAP pro templát či produkt (např. heparin, ssDNA, AMK kopolymery). CTD peptidu δ obsahuje polyanionický region, který umožňuje odstranění RNA z inhibovaného RNAP-RNA komplexu. RNAP se recykluje a může se účastnit další exprese [17].



Obrázek 19: **Expresse *rpoE* genu.** Růstová křivka (kruh) a promotorová aktivita genu *rpoE* (čtverec) byla měřena v závislosti na čase. Značný vzrůst exprese je vidět na konci exponenciální fáze [18].



Obrázek 20: **Mutant genu *rpoE* má prodlouženou lag fázi.** Růst kultury s δ (kosočtverec), kultura bez δ (čtverec) [18].

4.3 Podjednotka δ *in vivo*

Podjednotka δ reprezentuje cca 0,1 % solubilních proteinů buňky. Vzhledem k relativnímu molárnímu nadbytku δ nad RNAP přibližně 5:1 ve vegetativních buňkách, je protein δ poměrně hojný. Srovnatelné množství tohoto proteinu bylo nalezeno i ve sporách [18].

Bakterie s delecí v genu *rpoE* vykazují prodlouženou lag fázi a morfologické odlišnosti Mutanty *rpoE* (částečná delece genu *rpoE*) u *B. subtilis* se neliší v rychlosti růstu ani životaschopností za standardních podmínek. Mutanty vykazují prodlouženou lag fázi (obr. 20) a odlišnou morfologii (prodloužené buňky, které se shlukují v průběhu začátku exponenciální fáze). Expresse δ je maximální při přechodu z exponenciální do stacionární fáze (obr. 19) [18].

Funkce podjednotky δ při sporulaci Spora u bakterií (endospora) vzniká za účelem přežití nepříznivých podmínek. Sporulace (proces tvorby spor) začíná v době, kdy dochází bakterii živiny v okolním prostředí, tedy na konci exponenciální fáze (kdy je protein δ exprimován s největší intenzitou). Proces sporulace se dělí do 7 fází. Druhá fáze je charakteristická rozdělením jádra a rozdělením buňky přepážkou na dvě nestejněměrné části (sporu a vegetativní buňku). Ve fázi tři vzniká membránou obalená speciální buňka – prespora. Při mutaci v genu *rpoE* (vlození transposonu Tn10) se projevila rozdílná transkripce určitých genů v časně III. fázi sporulace [21].

Schopnost přežití mutant genu *rpoE* u *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus aureus* je jeden z hlavních lidských patogenů. Způsobuje širokou škálu nemocí od lehkých infekcí až po sepsi. Mutant v homologu genu *rpoE* (inserce transposonu Tn19) se projevil jako defektní při podmínkách s limitujícím množstvím aminokyselin. Projevila se citlivost na nízké pH a rezistence vůči peroxidu vodíku. Expresse

těchto mutant je indukována ve středu exponenciální fáze, což podporuje předpoklad, že gen *rpoE* hraje regulační roli ve stacionární fázi [64].

Ovlivnění míry virulence podjednotkou δ u *Streptococcus agalactiae* Streptococcus třídy B (GBS) způsobuje pneumonii, sepsi a meningitidu u novorozenců v rozvojovém světě. U dospělých lidí se objevují tyto bakterie jako komenzální organismy, kolonizující urogenitální a gastrointestinální trakt. Nejčastější přenos infekce na dítě je při porodu.

Pomocí transposonové inserce byl objeven gen *rpoE* jako důležitý pro virulenci buněk infikovaných GBS při rozvoji sepse. Mutanty s delecí genu *rpoE* snížily virulenci až o dva řády oproti „wild-type“. Relativní množství exprese δ v transposomálním mutantu byla 10krát snížena oproti „wild-type“. Po propojení těchto informací dojdeme k závěru, že je potřeba alespoň minimální intracelulární koncentrace proteinu δ pro vyvolání onemocnění bakterií a pro přežití v hostitelské buňce.

Podjednotka δ hraje pravděpodobně přímou či nepřímou roli v transkripci určitých genů při sporulaci [53].

4.4 Shrnutí dosavadních poznatků po podjednotce δ

- Molekulární hmotnost je 21,4 kDa, je složena z 173 AMK, isoelektrický bod má hodnotu 3,6.
- Je kodována genem *rpoE*, který je exprimován ze σ^A dependentního promotoru.
- N-terminální doména je složena z 95 AMK a váže se na RNAP. Vysoce nestrukturovaná a záporně nabitá C-terminální doména obsahuje 69 AMK a podílí se na recyklaci RNAP. Tyto dvě domény jsou spojeny krátkou lysinovou sekvencí.
- Zvyšuje promotorovou selektivitu díky destabilizaci nepromotorových komplexů.
- Exprese δ je maximální při přechodu z exponenciální do stacionární fáze.
- Mutanty genu *rpoE* vykazují prodlouženou lag fázi a odlišnou morfologii.
- Zvyšuje efektivitu syntézy RNA (podporuje recyklaci RNAP).
- Zvyšuje míru virulence u *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus*.

5 Srovnání aminokyselinových sekvencí podjednotek delta

Porovnání aminokyselinových sekvencí podjednotky δ u gram pozitivních bakterií je důležité pro nalezení konzervovaných AMK. U konzervovaných AMK se dá předpokládat jejich klíčová role ve vazbě na RNAP a správnou funkci podjednotky δ . V nestrukturované CTD nebyly nalezeny žádné konzervované AMK. V NTD se naopak objevily oblasti, kde jsou AMK sekvence konzervované u většiny gram pozitivních bakterií. AMK jsou vyznačeny na obr. 21.

B subtilis	MGIKYSQEEELKEMALVEIAHEAFEEHKKPVPPEQLINELNEIASLLGKKEBIGDRLAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B amyloliquefaciens	MSIKOYSQELKQMALVEIAHEAFSEHKKPVPPEQLINEMISLIGYTKELGDRLAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B licheniformis	MSLKYSQELKEMALVEIAHEAFSEHKKPITFQELDPDASLLGKKELEDRLAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B pumilus	MSLKYSQELKHMSELVLAIEYFRDSTPTITFSELDLDMVQLQKSDLDRLAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B cereus_cytotoxis	MDFKOYSEELQEFSEIIVVHSLVLEDKKQATSFQDQVEAVQVIGLSQEVNARLAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B coahuilensis	MNRELSQDELKEVSEIENAILLEKKEAIPENEIVKDIKILELSEEMKRAAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B cereus	MGFKOYSEELKCESMIEVHSLVGNKQATFNELVQEIAGVIGLSQGVNKLAAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B welhensthephanensis	MGFKOYSEELKCESMIEVHSLVGNKQATFNELVQEIAGVIGLSQGVNKLAAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B mycoides	MGFKOYSEELKCESMIEVHSLVGNKQATFNELVQEIAGVIGLSQGVNKLAAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B thuringiensis	MDFKOYSEELKCESMIEVHSLVGNKQATFNELVQEIAGVIGLSQGVNKLAAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B anthracis	MDFKOYSEELKCESMIEVHSLVGNKQATFNELVQEIAGVIGLSQGVNKLAAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B pseudomycoides	MDFKYSPEELKCESMIEVHSLVLEDKKQATSFHDLVQEIAGVIGLSQEVNARLAOFYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
L monocytogenes	MDLKNLTQEERSELSDIIVAHFILLEQRKETILFPELVKKEIQAFLGKDAEIRERLVOFYTDMIDENFTSLGNNTWGLRAWVPMDAIDEEVQITPTPKRRKSDDDDDDE
L innocua	MDLKNLTQEERSELSDIIVAHFILLEQRKETILFPELVKKEIQAFLGKDAEIRERLVOFYTDMIDENFTSLGNNTWGLRAWVPMDAIDEEVQITPTPKRRKSDDDDDDE
L welshineri	MDLKNLTQEERSELSDIIVAHFILLEQRKETILFPELVKKEIQAFLGKDAEIRERLVOFYTDMIDENFTSLGNNTWGLRAWVPMDAIDEEVQITPTPKRRKSDDDDDDE
B clausii	MDLSTLKEELNEMSMVAAFIVANKQPFNFIDLLEVAKKGISETEMDERISFLYTDLIDGRFLALSDQITWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B pseudofirmus	MNIREMKEEIQEELSMVEVAVALMKEKQPYFPTLVKKEISEIKGMKAEVNRMSFLYTDLIDGRFVTLGDNWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B halodurans	MKLAELEKEEQEELSMVEVAVALMKEKQPYFPTLVKKEISEIKGMKAEVNRMSFLYTDLIDGRFVTLGDNWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac fermentum	MDLKVFDGQEKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac rhamnosus	MKLAFANADKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac brevis	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac casei	MKLKAFANADKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B cellulolyticus	MSIKOYSEALKEIAMELANEITLQESKNPVDHSHIINLIIAEAKGSEEDLKNRSLAHLAEMSDGRFVNI GENRWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac reuteri	MDLKVFDGQKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac plantarum	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Leu citreum	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac ruminis	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac buchneri	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac hilgardii	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
Lac sakei	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
P pentosaceus	MELKVFEGQNKSELSMIEVAHAILAYHNEAMAEADLNEIQTFLGKDEERERLSQFYTDLAVDGSFTSLGNTWGLRAWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
W paramesenteroides	MALTFDQGNKDELSMIEVARAILSDRETMGFNDLNEVSAFSGKDEEIRTRLSQFYTDLIDGFSFTSLGNTWGLRSWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL
B selenitireducens	MHYKMNNEELQEVAMVEIAAATLILEDKPEFEEHLLKRVGDIKGYTEEDLMKRLANLADTMSMDGRFVNLGNARWGLRWVYDQLDEETQPTVKAKKKKAKKAVEEDL



Obrazek 21: Srovnání AMK sekvence podjednotky NTD δ u různých bakteriálních druhů. ★100 % shoda AMK, : AMK téměř shodné, • AMK s podobným nábojem. B – *Bacillus*, L – *Listeria*, Lac – *Lactobacillus*, Leu – *Leucomostoc*, P – *Pediococcus*, W – *Weissella*, B – *Brevibacillus*.

6 Závěr

Aby dokázala bakteriální buňka přežít, musí přesně a přiměřeně odpovídat na změny v okolním prostředí. Účinnost odpovědi je závislá na expresi správných genů ve správný čas. Tento proces zajišťuje esenciální vícepodjednotkový enzym, RNA polymerasa. Na rozdíl od velmi důkladně prostudované RNAP u gram negativních bakterií, obsahuje RNAP u gram pozitivních bakterií navíc některé podjednotky (δ , ω_1). Podjednotka δ byla objevena před více než 30 lety a dosud není známa její přesná fyziologická funkce. Intenzivně byla studována její aminokyselinová sekvence a byla vyřešena struktura její N-terminální domény, která poukázala na podobnost s některými proteiny vázajícími NK v komplexu RNAP, což u proteinu δ nebylo pozorováno. Bylo studováno *in vitro*, že podjednotka δ zvyšuje promotorovou selektivitu tím, že působí jako alosterický efektor konformačních změn RNAP a omezuje počet kontaktů RNAP s nepromotorovou DNA. RNAP za přítomnosti δ převážně vytváří uzavřené komplexy, zatímco RNAP s navázanou σ vytváří zejména otevřené komplexy. Podjednotky σ a δ mají mezi sebou vztah vzájemné negativní kooperace, což je nejspíše důležité až v pozdějších fázích transkripce, kdy δ i σ jsou uvolněny z jádra RNAP. Podjednotka δ celkově zvyšuje syntézu RNA díky schopnosti recyklace jádra RNAP. *In vivo* bylo pozorováno, že δ ovlivňuje sporulaci a zvyšuje virulenci některých patogenních bakterií. Mutanty v genu kódující δ prokázaly stejnou rychlost růstu a životaschopnost, ale také u nich byla pozorována prodloužená lag fáze a morfologické odlišnosti. Zatím není známa celá 3D struktura tohoto proteinu ani přesná pozice vazby na RNAP. Chtěla bych svou další práci zaměřit na tento protein a prozkoumat jeho vazbu na další proteiny vyskytující se u gram pozitivních bakterií.

Reference

- [1] E. C. Achberger, M. D. Hilton, and H. R. Whiteley. The effect of the delta subunit on the interaction of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with bases in a SP82 early gene promoter. *Nucleic Acids Res*, 10(9):2893–2910, May 1982.
- [2] E. C. Achberger, M. Tahara, and H. R. Whiteley. Interchangeability of delta subunits of RNA polymerase from different species of the genus *Bacillus*. *J Bacteriol*, 150(2):977–980, May 1982.
- [3] E. C. Achberger and H. R. Whiteley. The interaction of *Escherichia coli* core RNA polymerase with specificity-determining subunits derived from unmodified and SP82-modified *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J Biol Chem*, 255(24):11957–11964, Dec 1980.
- [4] E. C. Achberger and H. R. Whiteley. The role of the delta peptide of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase in promoter selection. *J Biol Chem*, 256(14):7424–7432, Jul 1981.
- [5] I. Artsimovitch, V. Svetlov, L. Anthony, R. R. Burgess, and R. Landick. RNA polymerases from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* differ in recognition of regulatory signals in vitro. *J Bacteriol*, 182(21):6027–6035, Nov 2000.
- [6] Irina Artsimovitch, Vsevolod Patlan, Shun ichi Sekine, Marina N Vassilyeva, Takeshi Hosaka, Kozo Ochi, Shigeyuki Yokoyama, and Dmitry G Vassilyev. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell*, 117(3):299–310, Apr 2004.
- [7] Sergei Borukhov, Jookyung Lee, and Oleg Laptenko. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol Microbiol*, 55(5):1315–1324, Mar 2005.
- [8] Sergei Borukhov and Konstantin Severinov. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res Microbiol*, 153(9):557–562, Nov 2002.
- [9] Douglas F Browning and Stephen J Busby. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol*, 2(1):57–65, Jan 2004.
- [10] R. R. Burgess. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem*, 244(22):6168–6176, Nov 1969.
- [11] Elizabeth A Campbell, Oriana Muzzin, Mark Chlenov, Jing L Sun, C. Anders Olson, Oren Weinman, Michelle L Trester-Zedlitz, and Seth A Darst. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell*, 9(3):527–539, Mar 2002.
- [12] B. K. Chelm, J. J. Duffy, and E. P. Geiduschek. Interaction of *Bacillus subtilis* RNA polymerase core with two specificity-determining subunits. Competition between sigma and the SPO1 gene 28 protein. *J Biol Chem*, 257(11):6501–6508, Jun 1982.
- [13] Y. F. Chen and J. D. Helmann. DNA-melting at the *Bacillus subtilis* flagellin promoter nucleates near -10 and expands unidirectionally. *J Mol Biol*, 267(1):47–59, Mar 1997.
- [14] M. Sofia Ciampi. Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology*, 152(Pt 9):2515–2528, Sep 2006.
- [15] Ciaron Condon. RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(2):157–74, table of contents, Jun 2003.
- [16] Michiel J L de Hoon, Yuko Makita, Kenta Nakai, and Satoru Miyano. Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Comput Biol*, 1(3):e25, Aug 2005.

- [17] F. J. López de Saro, A. Y. Woody, and J. D. Helmann. Structural analysis of the *Bacillus subtilis* delta factor: a protein polyanion which displaces RNA from RNA polymerase. *J Mol Biol*, 252(2):189–202, Sep 1995.
- [18] F. J. López de Saro, N. Yoshikawa, and J. D. Helmann. Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 274(22):15953–15958, May 1999.
- [19] P. L. deHaseth, M. L. Zupancic, and M. T. Record. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J Bacteriol*, 180(12):3019–3025, Jun 1998.
- [20] Murray P Deutscher. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res*, 34(2):659–666, 2006.
- [21] Haichun Gao and Arthur I Aronson. The delta subunit of RNA polymerase functions in sporulation. *Curr Microbiol*, 48(6):401–404, Jun 2004.
- [22] D. R. Gentry and R. R. Burgess. Cross-linking of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. *Biochemistry*, 32(41):11224–11227, Oct 1993.
- [23] Seth R Goldman, Richard H Ebright, and Bryce E Nickels. Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo. *Science*, 324(5929):927–928, May 2009.
- [24] R. L. Gourse, W. Ross, and T. Gaal. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol*, 37(4):687–695, Aug 2000.
- [25] Tanja M Gruber and Carol A Gross. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol*, 57:441–466, 2003.
- [26] Shanil P Haugen, Wilma Ross, and Richard L Gourse. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol*, 6(7):507–519, Jul 2008.
- [27] M. D. Hilton and H. R. Whiteley. UV cross-linking of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase to DNA in promoter and non-promoter complexes. *J Biol Chem*, 260(13):8121–8127, Jul 1985.
- [28] L. M. Hsu, N. V. Vo, and M. J. Chamberlin. *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25):11588–11592, Dec 1995.
- [29] Jerard Hurwitz. The discovery of RNA polymerase. *J Biol Chem*, 280(52):42477–42485, Dec 2005.
- [30] E. I. Hyde, M. D. Hilton, and H. R. Whiteley. Interactions of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with subunits determining the specificity of initiation. Sigma and delta peptides can bind simultaneously to core. *J Biol Chem*, 261(35):16565–16570, Dec 1986.
- [31] M. Ibba and D. Söll. Quality control mechanisms during translation. *Science*, 286(5446):1893–1897, Dec 1999.
- [32] Y. L. Juang and J. D. Helmann. The delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. An allosteric effector of the initiation and core-recycling phases of transcription. *J Mol Biol*, 239(1):1–14, May 1994.

- [33] Y. L. Juang and J. D. Helmann. A promoter melting region in the primary sigma factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic amino acids. *J Mol Biol*, 235(5):1470–1488, Feb 1994.
- [34] Y. L. Juang and J. D. Helmann. Pathway of promoter melting by *Bacillus subtilis* RNA polymerase at a stable RNA promoter: effects of temperature, delta protein, and sigma factor mutations. *Biochemistry*, 34(26):8465–8473, Jul 1995.
- [35] Libor Krasny and Richard L Gourse. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J*, 23(22):4473–4483, Nov 2004.
- [36] Libor Krasny, Hana Tiserova, Jiri Jonak, Dominik Rejman, and Hana Sanderova. The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 69(1):42–54, Jul 2008.
- [37] M. Lampe, C. Binnie, R. Schmidt, and R. Losick. Cloned gene encoding the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Gene*, 67(1):13–19, Jul 1988.
- [38] P. J. Lewis, G. P. Doherty, and J. Clarke. Transcription factor dynamics. *Microbiology*, 154(Pt 7):1837–1844, Jul 2008.
- [39] J. M. Lopez, A. Dromerick, and E. Freese. Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol*, 146(2):605–613, May 1981.
- [40] Shawn R MacLellan, Veronica Guariglia-Oropeza, Ahmed Gaballa, and John D Helmann. A two-subunit bacterial sigma-factor activates transcription in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(50):21323–21328, Dec 2009.
- [41] Renjith Mathew and Dipankar Chatterji. The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol*, 14(10):450–455, Oct 2006.
- [42] L. Minakhin, S. Bhagat, A. Brunning, E. A. Campbell, S. A. Darst, R. H. Ebright, and K. Severinov. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3):892–897, Jan 2001.
- [43] Veronika Motackova, Hana Sanderova, Lukas Zidek, Jiri Novacek, Petr Padrta, Alzbeta Svenkova, Jana Korelusova, Jiri Jonak, Libor Krasny, and Vladimir Sklenar. Solution structure of the N-terminal domain of *Bacillus subtilis* delta subunit of RNA polymerase and its classification based on structural homologs. *Proteins*, Mar 2010.
- [44] Katsuhiko S Murakami, Shoko Masuda, Elizabeth A Campbell, Oriana Muzzin, and Seth A Darst. Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, 296(5571):1285–1290, May 2002.
- [45] Katsuhiko S Murakami, Shoko Masuda, and Seth A Darst. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science*, 296(5571):1280–1284, May 2002.
- [46] Hideaki Nanamiya, Koji Kasai, Akira Nozawa, Choong-Soo Yun, Takakuni Narisawa, Kana Murakami, Yousuke Natori, Fujio Kawamura, and Yuzuru Tozawa. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 67(2):291–304, Jan 2008.

- [47] S. Nouraini, J. Archambault, and J. D. Friesen. Rpo26p, a subunit common to yeast RNA polymerases, is essential for the assembly of RNA polymerases I and II and for the stability of the largest subunits of these enzymes. *Mol Cell Biol*, 16(11):5985–5996, Nov 1996.
- [48] Kozo Ochi. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71(6):1373–1386, Jun 2007.
- [49] Brian J Paul, Melanie B Berkmen, and Richard L Gourse. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(22):7823–7828, May 2005.
- [50] Anna Perederina, Vladimir Svetlov, Marina N Vassilyeva, Tahir H Tahirov, Shigeyuki Yokoyama, Irina Artsimovitch, and Dmitry G Vassilyev. Regulation through the secondary channel–structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, 118(3):297–309, Aug 2004.
- [51] J. Pero, J. Nelson, and T. D. Fox. Highly asymmetric transcription by RNA polymerase containing phage-SP01-induced polypeptides and a new host protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(4):1589–1593, Apr 1975.
- [52] Steven T Rutherford, Justin J Lemke, Catherine E Vrentas, Tamas Gaal, Wilma Ross, and Richard L Gourse. Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *J Mol Biol*, 366(4):1243–1257, Mar 2007.
- [53] Ravin Seepersaud, Rachel H V Needham, Cathy S Kim, and Amanda L Jones. Abundance of the delta subunit of RNA polymerase is linked to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol*, 188(6):2096–2105, Mar 2006.
- [54] G. B. Spiegelman, W. R. Hiatt, and H. R. Whiteley. Role of the 21,000 molecular weight polypeptide of *Bacillus subtilis* RNA polymerase in RNA synthesis. *J Biol Chem*, 253(6):1756–1765, Mar 1978.
- [55] Anjana Srivatsan and Jue D Wang. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol*, 11(2):100–105, Apr 2008.
- [56] C. E. Stebbins, S. Borukhov, M. Orlova, A. Polyakov, A. Goldfarb, and S. A. Darst. Crystal structure of the GreA transcript cleavage factor from *Escherichia coli*. *Nature*, 373(6515):636–640, Feb 1995.
- [57] Torsten Stein. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*, 56(4):845–857, May 2005.
- [58] T. A. Steitz, S. J. Smerdon, J. Jager, and C. M. Joyce. A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science*, 266(5193):2022–2025, Dec 1994.
- [59] R. Tjian, R. Losick, J. Pero, and A. Hinnebusch. Purification and comparative properties of the delta and sigma subunits of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem*, 74(1):149–154, Mar 1977.
- [60] Charles L Turnbough. Regulation of bacterial gene expression by the NTP substrates of transcription initiation. *Mol Microbiol*, 69(1):10–14, Jul 2008.
- [61] Dmitry G Vassilyev, Shun ichi Sekine, Oleg Laptenko, Jookyung Lee, Marina N Vassilyeva, Sergei Borukhov, and Shigeyuki Yokoyama. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, 417(6890):712–719, Jun 2002.

- [62] Catherine E Vrentas, Tamas Gaal, Melanie B Berkmen, Steven T Rutherford, Shanil P Haugen, Dmitry G Vassylyev, Wilma Ross, and Richard L Gourse. Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *J Mol Biol*, 377(2):551–564, Mar 2008.
- [63] Catherine E Vrentas, Tamas Gaal, Wilma Ross, Richard H Ebright, and Richard L Gourse. Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev*, 19(19):2378–2387, Oct 2005.
- [64] S. P. Watson, M. Antonio, and S. J. Foster. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* starvation-induced, stationary-phase mutants defective in survival or recovery. *Microbiology*, 144 (Pt 11):3159–3169, Nov 1998.
- [65] Xiang-Jiao Yang and Serge Gr?goire. Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nepsilon - and O-acetylation. *EMBO Rep*, 8(6):556–562, Jun 2007.
- [66] Xiao Yang, Seesei Molimau, Geoff P Doherty, Elecia B Johnston, Jon Marles-Wright, Rosalba Rothnagel, Ben Hankamer, Richard J Lewis, and Peter J Lewis. The structure of bacterial RNA polymerase in complex with the essential transcription elongation factor NusA. *EMBO Rep*, 10(9):997–1002, Sep 2009.
- [67] G. Zhang, E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov, and S. A. Darst. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98(6):811–824, Sep 1999.