

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Mgr. Luděk Sojka

**Ribosom *Bacillus subtilis*: regulace biosyntézy ribosomální RNA
a identifikace nového ribosomálního proteinu YbxF**

***Bacillus subtilis* ribosomes: regulation of ribosomal RNA
biosynthesis and identification of the new ribosomal
protein YbxF**

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jiří Jonák, DrSc.

Praha 2011

Počátky této práce vznikly na oddělení Genové exprese Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. V roce 2009 se skupina přestěhovala na Mikrobiologický ústav AV ČR a zároveň došlo ke změně názvu skupiny na Oddělení bakteriologie. Zde jsem svou doktorskou práci v letošním roce zakončil.

Děkuji prof. MUDr. Jiřímu Jonákovi, DrSc. a Mgr. Liboru Krásnému, Ph.D. za odborné vedení této práce. Děkuji RNDr. Vladimíru Fučíkovi, CSc. za cenné rady, díky kterým jsem mohl úspěšně pracovat s modelovým organismem jakým je *Bacillus subtilis*. Děkuji i všem svým kolegům za úspěšnou spolupráci na projektu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost, podporu a klidné zázemí.

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

V Praze dne 28.4.2011

Luděk Sojka

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Literární přehled	6
1. Bakterie <i>Bacillus subtilis</i>	6
2. Ribosom v bakteriální buňce	6
3. Ribosomální RNA	8
3.1 Regulace syntézy ribosomální RNA	8
3.2 Ribosomální RNA operony	8
4. Transkripce	10
4.1 Obecné uspořádání sekvence promotoru	10
4.2 Bakteriální RNA polymeráza	11
4.2.1 Podjednotky bakteriální RNA polymerázy (<i>E. coli</i>)	12
4.2.2 RNAP z <i>Bacillus subtilis</i>	14
4.3 Mechanismus transkripce	17
4.4 Regulace transkripce	20
4.5 Regulace iniciace transkripce	22
4.6 Ribosomální RNA promotory v <i>B. subtilis</i>	28
4.6.1 Struktura rRNA promotorů v <i>B. subtilis</i>	28
4.6.2 Rozdíly v regulaci rRNA promotorů pomocí iNTP u <i>E. coli</i> a <i>B. subtilis</i>	29
5. Ribosomální proteiny	32
5.1 Uspořádání genů kódujících ribosomální proteiny v genomu <i>B. subtilis</i>	32
5.2 Streptomycinový operon <i>B. subtilis</i>	34
5.3 Gen <i>ybxF</i>	36
5.4 Transkripce <i>str</i> operonu	38
5.5 Gen <i>ymxC</i> , paralog genu <i>ybxF</i> v <i>B. subtilis</i>	38
Přístroje, materiál a metody	40
1. Přístroje	40
1.1 Centrifugy	40
1.2 Elektroforézy	40
1.3 Inkubátory a třepačky	41

1.4	Další přístroje	41
2.	Materiál	42
3.	Metody	44
3.1	Bakteriální kmeny a plazmidové konstrukty	44
3.2	Média a kultivační podmínky	49
3.3	Metody izolace DNA	50
3.4	Sekvence DNA	51
3.5	Izolace RNAP z <i>B. subtilis</i>	51
3.6	Transkripce <i>in vitro</i>	52
3.7	Stabilita otevřených komplexů	54
3.8	Extrakce RNA a reverzní transkripce	55
3.9	„Real time“ qPCR (RT-qPCR)	57
3.10	Stanovení hladiny GTP u <i>B. subtilis</i>	58
3.11	Porovnání sekvencí DNA promotorů <i>rrn</i> P1 pocházejících z vybraných bakteriálních druhů	59
3.12	Molekulární modelování <i>in silico</i>	60
3.13	Izolace ribosomů z <i>B. subtilis</i>	60
3.14	Disociace ribosomů 70S na podjednotky 50S a 30S	61
3.15	Detekce fúzního proteinu YbxF-GFP	61
3.16	Mikroskopie	62
3.17	Bodová mutageneze	63
	Cíle disertační práce	63
	Výsledky – část I	64
1.	Výběr základních promotorů	64
2.	Závislost aktivity promotorů na koncentraci iNTP <i>in vitro</i>	66
2.1	RNAP z <i>E. coli</i> a <i>B. subtilis</i> – měření senzitivity promotorů <i>in vitro</i>	66
2.2	Identifikace promotorového elementu DNA zodpovědného za senzitivitu promotorů k [iNTP] u <i>B. subtilis</i>	68
3.	Stabilita otevřených promotorových komplexů	71
3.1	Identifikace promotorové sekvence DNA zodpovědné za stabilitu otevřených promotorových komplexů	71

4.	Úloha báze -5T v senzitivě promotorů k [iNTP]	72
4.1	Bodová mutagenese v sekvenci DNA promotoru <i>rrnB</i> P1	72
4.2	Interakce báze -5T s RNA polymerázou z <i>B. subtilis</i>	74
5.	Závislost aktivity promotorů na koncentraci iNTP <i>in vivo</i>	76
5.1	Vliv promotorové 3' oblasti na senzitivitu promotorů k [iNTP] u <i>B. subtilis in vivo</i> . 76	
6.	Závislost aktivity dalších promotorů na koncentraci iNTP <i>in vitro</i>	79
6.1	Vliv promotorové 3' oblasti na senzitivitu dalších promotorů k [iNTP] <i>in vitro</i>	79
7.	Vlastnosti promotorové sekvence DNA zodpovědné za senzitivitu promotorů dalších bakteriálních druhů k [iNTP]	83
	Výsledky – část II	86
1.	Inaktivace genu <i>ybxF</i> v genomu <i>B. subtilis</i>	86
2.	Inaktivace paralogního genu <i>ymxC</i> v genomu <i>B. subtilis</i>	87
3.	Lokalizace proteinu YbxF v <i>B. subtilis</i>	88
4.	YbxF – součást ribosomu exponenciálně rostoucích bakterií <i>B. subtilis</i>	90
5.	Lokalizace proteinu YbxF na ribosomu <i>B. subtilis</i>	91
6.	Model proteinu YbxF vytvořený <i>in silico</i>	92
7.	Úloha konzervovaných lyzinů ve vazbě YbxF na ribosom	94
	Diskuze	97
	Shrnutí výsledků	102
	Seznam zkratk	104
	Prohlášení autorů	106
	Příloha – publikace autora	107
	Seznam literatury	108

Abstrakt

Tato disertační práce se zabývá biologií bakteriálního ribosomu u gram pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a zahrnuje studium obou jeho složek – ribosomální RNA (rRNA) a jednoho z ribosomálních proteinů. První část popisuje studium regulace syntézy rRNA. Druhá část popisuje identifikaci a charakterizaci nového ribosomálního proteinu kódovaného genem *ybxF*.

Hlavním regulačním mechanismem tvorby rRNA v buňce je regulace transkripce na úrovni iniciace. Iniciační nukleosid trifosfáty (iNTP) jsou důležitým regulátorem iniciace transkripce na promotorech pro rRNA. Fyziologicky se měnící koncentrace iNTP ovlivňuje aktivitu RNA polymerázy (RNAP) na těchto promotorech. Takové promotory obecně označujeme jako „senzitivní“. Nejvíce znalostí o této regulaci bylo doposud získáno ze studia bakterie *Escherichia coli*, kde je klíčová pro tuto regulaci promotorová sekvence. Avšak pravidla vztahující se na sekvenční požadavky takto regulovaných promotorů u gram negativní bakterie *E. coli* nejsou platná pro promotory gram pozitivní bakterie *B. subtilis*, neboť jejich sekvence se diametrálně liší. V rámci disertační práce jsme u *B. subtilis*, pomocí *in vitro* a *in vivo* přístupů určili promotorové sekvenční elementy zodpovědné za senzitivitu promotorů pro rRNA a další vybrané geny ke koncentraci iNTP.

Druhá část práce se zabývá objasňováním buněčné role proteinu YbxF. Již dříve jsme prokázali, že gen *ybxF*, který tento protein kóduje, je u *B. subtilis* součástí vysoce konzervovaného streptomycinového (*str*) operonu, který zahrnuje nepostradatelné geny pro ribosomální proteiny a elongační faktory. Kombinací genetických a biochemických metod a fluorescenční mikroskopie jsme ukázali, že se protein YbxF, ačkoliv není nezbytný pro růst bakterie, váže na ribosom v průběhu exponenciální růstové fáze a to na jeho velkou podjednotku (50S). Na základě molekulárního modelování a bodové mutagenese jsme pak určili oblast proteinu YbxF důležitou pro tuto vazbu.

Abstract

The biology of the bacterial ribosome of gram positive bacterium *Bacillus subtilis* is the central point of this thesis that includes studies of both ribosomal components – ribosomal RNA (rRNA) and one of ribosomal proteins. The first part of the thesis focuses on the regulation of rRNA synthesis and the second part focuses on the identification and characterization of a new ribosomal protein, YbxF.

rRNA synthesis is mostly regulated at the level of transcription initiation. Initiating nucleoside triphosphates (iNTPs) are important molecule effectors that regulate this process. Varying iNTP concentration in the cell directly affects RNA polymerase (RNAP) at rRNA promoters as these promoters are sensitive to [iNTP] *in vivo*. Most of the knowledge about this regulation is derived from *Escherichia coli*, where the rRNA promoter sequence is key for this regulation. Nevertheless, sequence characteristics of [iNTP]-regulated rRNA promoters from gram positive bacterium *B. subtilis* do not emulate the sequence characteristics derived from [iNTP]-regulated rRNA promoters from gram negative bacterium *E. coli*. Using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, we determined promoter DNA elements that are responsible for [iNTP] sensitivity of ribosomal and non ribosomal promoters in *B. subtilis*.

The second part of the thesis focuses on the protein part of the ribosome. We investigated the YbxF protein, encoded by the *ybxF* gene, which is in *B. subtilis* a member of the highly conserved streptomycin (*str*) operon coding for essential ribosomal proteins and elongation factors. Using genetic and biochemical approaches and fluorescence microscopy we showed that although YbxF is not essential for bacterial growth it binds to the ribosome, to its large ribosomal subunit (50S) in the course of exponential phase of growth. Subsequent molecular modeling and mutational analysis revealed the region of YbxF that is important for its interaction with the ribosome.

Literární přehled

1. Bakterie *Bacillus subtilis*

B. subtilis je půdní, gram pozitivní nepatogenní bakterie tyčinkovitého tvaru schopná sporulace. Je intenzivně studovaným zástupcem široké skupiny mikroorganismů s nízkým obsahem párů G + C, mezi které patří například patogenní *Bacillus anthracis*, ale i mikroorganismy využívané v potravinářském průmyslu (rod *Lactococcus* či další druhy početného rodu *Bacillus*). *B. subtilis* je systematicky zařazen do oddělení Firmicutes (Sonenshein *et al.*, 2002). Genom tvoří jediný chromosom o velikosti 4215 kb nesoucí přibližně 4100 genů. Nejméně 200 genů je pro bakterii nepostradatelných, což bylo zjištěno jejich postupnou, systematickou inaktivací (Kobayashi *et al.*, 2003). Rozmnožování probíhá klasickým dělením. *B. subtilis* je také schopen sporulace, tedy alternativního vývojového stádia, kdy za nepříznivých podmínek, při nedostatku živin vytváří endospory. Ty jsou odolné jak vůči vysoké teplotě, tak i kyselinám či solím. Právě díky schopnosti vytvářet spory je bakterie schopna přežít dočasný, pro ni nepříznivý stav prostředí. V minulosti byl *B. subtilis* využíván zejména pro studium sporulace (Schaeffer *et al.*, 1964; Piggot & Hilbert, 2004). Nespornou výhodou tohoto modelového mikroorganismu pro laboratorní práci je jeho schopnost přejít do fyziologického stavu, který označujeme jako stav kompetence. Jedná se o alternativní vývojové stádium, do kterého bakterie přechází v případě nedostatku živin, v počátku stacionární fáze růstu. V tomto stavu je bakterie schopna přijmout vysokomolekulární cizorodou DNA a následně, během genetické transformace se tato DNA může integrovat do chromozomu (Majewski & Cohan, 1999; Dubnau & Losick, 2006).

V neposlední řadě je *B. subtilis* také využíván jako modelový organismus pro studium proteinové sekrece a tvorbu heterologních proteinů. V Japonsku je využíván pro přípravu tradiční potraviny Natto (zkvašených sójových bobů).

2. Ribosom v bakteriální buňce

Ribosom je nepostradatelnou součástí proteosyntetického aparátu všech živých organismů. Je důležitou buněčnou organelou, místem, kde probíhá translace, tedy syntéza bílkovin. U bakterií je jeho velikost přibližně 20 nm v průměru. Sestává ze tří druhů (23S,

16S a 5S) ribosomální RNA (rRNA) a více jak padesáti ribosomálních proteinů (Nanamiya & Kawamura, 2010). Molekulová hmotnost bakteriálního ribosomu je přibližně $2,6 \times 10^6$. Ribosom je dnes často označován jako tzv. ribozym (anglicky „ribozyme“), neboť rRNA, která tvoří jeho aktivní složku, má katalytickou funkci (katalyzuje syntézu polypeptidického řetězce), která je pro ribozym charakteristická (Cech 2000; Rodnina *et al.*, 2007). Biosyntéza ribosomů je komplexní proces, který zahrnuje syntézu, zpracování a modifikaci rRNA i ribosomálních proteinů a pokračuje samotným sestavením zmíněných komponentů do dvou podjednotek o hodnotách sedimentačního koeficientu 30S a 50S (70S je hodnota pro celý bakteriální ribosom). Menší podjednotka 30S obsahuje jednu molekulu 16S rRNA a obvykle asi 21 molekul proteinů označovaných S1 – S21. Hlavní úloha malé podjednotky spočívá ve zprostředkování kontaktu mezi kodónem mRNA a antikodonem, který je nesen tRNA. Větší podjednotka 50S obsahuje dvě molekuly rRNA (5S a 23S rRNA) a 36 proteinů označovaných jako proteiny L1 – L36. Důležitou součástí velké podjednotky je peptidyl transferázové místo, kde se prostřednictvím peptidické vazby prodlužuje vznikající polypeptidický řetězec. Na ribosom se také přechodně váží důležité bílkovinné translační faktory regulující iniciaci, elongaci i terminaci translace.

Strukturální poměr rRNA a ribosomálních proteinů na ribosomu je přibližně 65 % ku 35 % ve prospěch rRNA. Buňka tedy v souvislosti s tvorbou nových ribosomů musí koordinovat syntézu rRNA se syntézou ribosomálních proteinů. Množství ribosomálních proteinů je závislé na množství rRNA a je buňkou regulováno celou řadou mechanismů. Množství aktivních ribosomů v buňce je v závislosti na prostředí regulováno právě syntézou rRNA. rRNA vzniká v buňce přepisem (transkripcí) ribosomálních RNA operonů, přičemž tato transkripce představuje až 70 % celkové transkripce v rychle se dělící buňce. Ribosomální RNA společně s transferovou RNA (tRNA) tvoří až 95 % veškeré buněčné RNA, takže jejich produkcí se zabírá velká část kapacity buněčné RNA polymerázy (RNAP).

Dostupnost živin je stěžejní faktor, který přímo ovlivňuje rychlost růstu bakteriální kultury. Dostane-li se buňka do prostředí bohatého na živiny, je jí tak umožněn rychlý růst, pro který potřebuje zvýšenou tvorbu nových proteinů. Naopak, náhlý nedostatek živin vede k omezení proteosyntézy a k rychlému zpomalení růstu, tak aby buňka zbytečně neplývala energií.

3. Ribosomální RNA

3.1 Regulace syntézy ribosomální RNA

Transkripcí rRNA operonů vzniká rRNA, která tvoří majoritní složku ribosomu. Hlavním regulačním mechanismem syntézy rRNA v buňce je regulace transkripce na úrovni iniciace. Tato regulace je zajišťována pomocí různých efektorových molekul, ať už bílkovinné nebo nebílkovinné povahy. Nejvíce znalostí o tomto způsobu regulace bylo doposud získáno ze studia gram negativní bakterie *Escherichia coli*. Regulaci zde můžeme rozdělit na tzv. dlouhodobou regulaci, kdy se buňka pravidelně dělí a tvorba rRNA je závislá na rychlosti růstu (z anglického „growth rate dependent control“) a na krátkodobou, okamžitou regulaci, kdy buňka musí rychle reagovat na rychlou změnu živin ať už v pozitivním nebo negativním směru. Zde se jedná například o stringentní odpověď (z anglického „stringent response“), což je fyziologický stav při kterém buňka čelí nedostatku aminokyselin (Josaitis *et al.*, 1995).

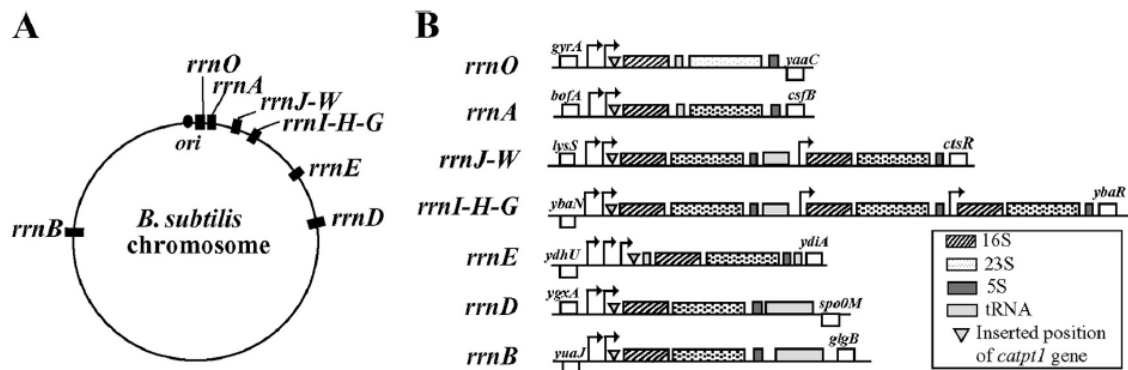
3.2 Ribosomální RNA operony

Geny pro rRNA jsou u bakterií soustředěny do rRNA operonů. Většina prokaryontních rRNA operonů sestává ze tří genů pro ribosomální RNA a to v pořadí 16S, 23S a 5S rRNA. Rozmístění rRNA operonů v rámci genomu se liší v závislosti na bakteriálním druhu a součástí rRNA operonů bývají často i geny pro tRNA. Existují mikroorganismy pouze s jediným rRNA operonem. Jedná se například o patogenní bakterie *Rickettsia prowazekii* (Andersson *et al.*, 1995) a *Mycoplasma pneumoniae* (Klappenbach *et al.*, 2000). Naopak celkem 15 kopií rRNA operonů bylo zmapováno u bakterie *Clostridium paradoxum* (Rainey *et al.*, 1996). *Escherichia coli* (Ellwood & Nomura, 1980) a stejně tak *Salmonella typhimurium* (Anderson & Roth, 1981) mají ve svém genomu 7 rRNA operonů. Obecně platí, že mikroorganismy s více kopiemi rRNA operonů patří mezi rychleji se dělící mikroorganismy v porovnání s těmi, jejichž genom obsahuje pouze jeden až dva rRNA operony. U *E. coli* byly v minulosti provedeny experimenty, jejichž cílem byla delece jednoho z rRNA operonů. Bakterie postrádající jeden z rRNA operonů byla životaschopná

a žádný vliv na rychlost růstu či fyziologii nebyl pozorován (Widom *et al.*, 1988). Je ale taktéž známo, že více kopií rRNA operonů umožňuje mnoha prokaryontním organismům se obecně lépe vypořádat s různými druhy prostředí, ve kterých jsou díky tomu schopné žít (Condon *et al.*, 1992 a 1995). V *E. coli* bylo později inaktivováno všech 7 rRNA operonů. Exprese rRNA byla u mutantů zajišťována z plazmidu, který obsahoval vždy pouze jeden rRNA operon a bakterie byla schopná života i za těchto podmínek. Tato studie navíc přispěla k objasnění významu nových mutací v genech pro rRNA, které mají za následek medicínsky problematické rezistence mikroorganismů k antibiotikům (Recht & Puglisi, 2001).

Genom námi studované bakterie *Bacillus subtilis* obsahuje 9 – 10 rRNA operonů, podle toho, o který kmen *B. subtilis* se jedná (Widom *et al.*, 1988). Každý z operonů obsahuje geny pro 16S, 23S a 5S rRNA. Součástí některých operonů jsou také geny pro tRNA. Většinou jsou lokalizovány mezi geny pro 16S a 23S, případně až do oblasti za genem pro 5S rRNA. Obrázek 1 (str. 10) (Nanamiya & Kawamura, 2010) ukazuje jmenovitě jednotlivé rRNA operony seřazené za sebou podle vzdálenosti od místa „ori“ (počátek replikace) v genomu *B. subtilis*. Z obrázku je patrné, že většina rRNA operonů je soustředěna k místu počátku replikace, čímž je zajištěna minimální prodleva mezi replikací a transkripcí. Každý z operonů je přepisován dvojicí promotorů P1 a P2. Pouze operon *rrnE* je přepisován i z promotoru P3. Operony *rrnW-I* a *rrnI-H-G* jsou přepisovány ve skupinách (Natori *et al.*, 2009). Transkripce každého z operonů je většinou ukončena dvojicí terminátorů. O samotném průběhu transkripce rRNA operonů a o její regulaci v *B. subtilis* pojednává kapitola 4.6.

Již dříve byly u některých kmenů *B. subtilis* popsány spontánní mutace, jejichž následkem došlo v těchto kmenech k samovolné inaktivaci operonů *rrnW*, *H* nebo *G*. Proto jsou tyto operony považovány v *B. subtilis* za postradatelné. Laboratoř Fujio Kawamury v Tokyu nedávno vytvořila sérii mutantů *B. subtilis* s jediným funkčním a šesti inaktivovanými rRNA operony. Genom každého z mutantů tedy obsahoval vždy pouze jeden ze sedmi „hlavních“ rRNA operonů (*rrnA*, *B*, *D*, *E*, *I J* nebo *O*). U všech sedmi mutantních kmenů byl pozorován zpomalený růst a defekty ve sporulaci a ve schopnosti dosáhnout stavu kompetence (Nanamiya *et al.*, 2010).



Obr. 1: Ribosomální RNA operony v *B. subtilis* (A): rozmístění rRNA operonů na chromozomu; (B): struktura rRNA operonů, šipky znázorňují promotory P1, P2 a případně P3 (Natori *et al.*, 2009).

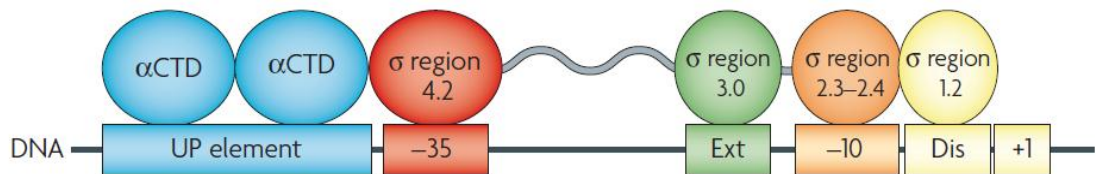
4. Transkripce

4.1 Obecné uspořádání sekvence promotoru

Promotorová sekvence DNA je nezbytná pro správný start transkripce. Čte se ve směru od 5' konce k 3' konci netemplátového (kódujícího) vlákna. Iniciační nukleotid je označován jako +1 pozice. Sekvence, která je za iniciačním nukleotidem má kladné znaménko a sekvence, která je před ním má znaménko záporné. Nukleotid v pozici 0 neexistuje. V samotné sekvenci promotoru rozpoznáváme takzvané promotorové jádro, což je sekvence od pozice -40 až do pozice +1. Promotorové jádro dále dělíme na čtyři definované úseky (obr. 2, str. 11): (i) hexamer -35: jeho konsensus sekvence je 5' TTGACA 3'; (ii) mezerník: oblast mezi hexamery -35 a -10 o délce 15 – 19 bází; (iii) hexamer -10: jeho konsensus sekvence je 5' TATAAT 3'; (iv) diskriminátor: oblast promotoru mezi iniciačním nukleotidem a 3' okrajem hexameru -10, která je např. u *E. coli* bohatá na páry guaninu a cytosinu. U *B. subtilis* je tato oblast bohatá na páry adeninu a thyminu.

Jsou to především oblasti obou hexamerů (-10 a -35), které jsou nejdůležitější pro rozpoznání promotoru a následnou vazbu σ podjednotky RNAP (Haugen *et al.*, 2008). V oblasti mezerníku, před hexamerem -10 ještě rozlišujeme takzvanou rozšířenou oblast -10. Jedná se zejména o dinukleotid 5' TG 3', který odděluje od hexameru -10 pouze jediná báze

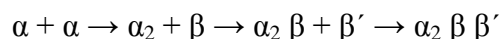
(nachází se v pozici -14/-15, Henkin & Sonenshein, 1987). Tento motiv je rozeznáván podjednotkou σ , s jejímž regionem 3.0 interaguje a napomáhá tak vazbě této podjednotky na některé promotory (Keilty & Rosenberg, 1987; Camacho & Salas, 1999). Před promotorovým jádrem se může vyskytovat takzvaný UP element, který se nachází v oblasti -40 až -60. Na tuto oblast se váže α CTD doména RNAP a zesiluje tak transkripci z některých promotorů (Hirvonen *et al.*, 2001).



Obr. 2: Obecné uspořádání sekvence promotoru a domény podjednotek RNAP vázající se na promotor (Haugen *et al.*, 2008).

4.2 Bakteriální RNA polymeráza

Transkripci u bakterií provádí enzym RNA polymeráza (DNA dependentní RNA polymeráza, RNAP). Protože se na rozdíl od eukaryont jedná o jediný enzym katalyzující transkripci, zodpovídá tak za syntézu veškeré RNA v buňce. Katalytické jádro RNAP (označuje se jako E, molekulová hmotnost přibližně 400000) se skládá z dimeru podjednotek α (α_2) a dále z podjednotek β a β' a ω . Podjednotky α_2 tvoří strukturní lešení pro podjednotky β a β' , které mají katalytickou funkci. Tyto čtyři podjednotky jsou sekvenčně, strukturně i z hlediska své funkce konzervované od bakterií až po člověka (Sweetser *et al.*, 1987; Ebright, 2000). Na katalytické jádro RNAP se váže podjednotka σ , často označovaná také jako faktor sigma a dále podjednotka ω . Samotné katalytické jádro není schopné rozpoznat sekvenci promotoru. Tuto funkci, která je stěžejní pro efektivní iniciaci transkripce zastává právě podjednotka sigma. Složením všech podjednotek vzniká holoenzym RNAP ($E\sigma$). Proces skládání RNAP probíhá v tomto pořadí:



Procesu skládání podjednotek napomáhá podjednotka ω , která jinak není pro buňku esenciální.

4.2.1 Podjednotky bakteriální RNA polymerázy (*E. coli*)

(i) Alfa (α): podjednotka α je tvořena cca 330 AK. Její molekulová hmotnost je přibližně 36000 Da. Kóduje ji gen *rpoA*. Je rozdělena do dvou domén. Větší, amino-terminální doména (α NTD) se uplatňuje při dimerizaci α podjednotek a zodpovídá také za vazbu podjednotek β a β' . Menší karboxy-terminální doména (α CTD) váže DNA a uplatňuje se při vazbě na promotor, na tzv. UP element (Ross *et al.*, 1993; Gourse *et al.*, 2000). Podjednotka α tvoří dimer dvou sekvenčně identických podjednotek α (dimer α_2). Každá z podjednotek α_2 dimeru se ale uplatňuje jinak. Jedna váže podjednotku β a druhá podjednotku β' (Minakhin *et al.*, 2001).

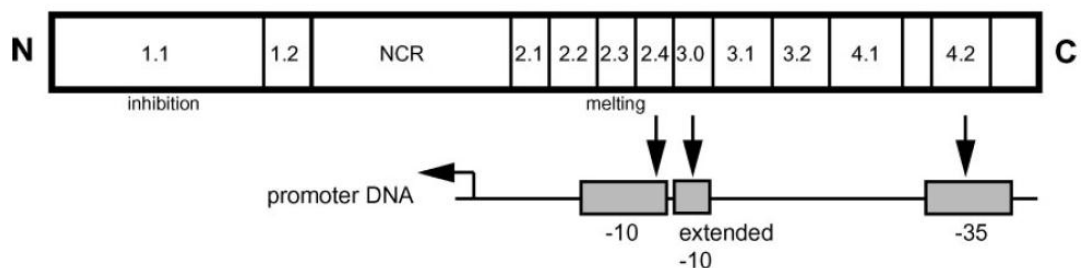
(ii) Beta (β): podjednotku β tvoří cca 1340 AK. Její molekulová hmotnost je přibližně 150000 Da a je kódována genem *rpoB*. Dohromady s podjednotkou β' dává RNAP charakteristický tvar krabího klepeta. Je místem, kam se váží antibiotika inhibující transkripci (např. rifampicin, streptovaricin, streptolydigin), (Gentry & Burgess, 1993; Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2010).

(iii) Beta' (β'): podjednotka β' je složena z 1400 AK a je tak největší podjednotkou bakteriální RNAP (molekulová hmotnost 155000 Da). Kóduje ji gen *rpoC*. Uplatňuje se především při vazbě na DNA. Její doména ZBD (β' NH₂ – Zn²⁺) se váže na pozice -22 templátového a -27 netemplátového vlákna v oblasti mezerníku na promotoru. S podjednotkou β vytváří aktivní centrum RNAP. Podílí se také na terminaci transkripce (Gentry & Burgess, 1993; Murakami *et al.*, 2002).

(iv) Omega (ω): podjednotku ω tvoří 91 AK a je tak nejmenší složkou bakteriální RNAP. Kóduje ji gen *rpoZ* a její molekulová hmotnost je 10000 Da. Je vysoce konzervovaná nejen u gram pozitivních a gram negativních bakterií ale i u Archaea (protein RpoK) a u eukaryont (protein Rpb6) (Minakhin *et al.*, 2001). Její funkce ale nebyla doposud úplně objasněna. Delecí genu *rpoZ* bylo zjištěno, že je pro buňku postradatelná a že transkripce může probíhat i bez ní (Gentry & Burgess, 1989). Podjednotka ω se váže svým N-koncem na podjednotku β' . Podílí se také na asociaci β' s komplexem $\alpha_2\beta$ (Ghosh *et al.*, 2001; Minakhin *et al.*, 2001). Podle některých zdrojů se podjednotka ω podílí také na regulaci stringentní odpovědi, ovlivňuje iniciaci transkripce a během růstu bakteriální kultury přispívá k přežití stacionární fáze (Vrentas *et al.*, 2005; Mathew & Chatterji, 2006).

(v) Sigma (σ): podjednotka σ je nepostradatelná pro správné zahájení transkripce. Během iniciace rozpoznává sekvenci promotoru a váže se s RNAP. Pouze RNAP ve formě holoenzymu ($E\sigma$) je schopna efektivní transkripce vycházející z promotoru. Podjednotka σ se dále podílí na rozplétání dvouřetězcové DNA a hraje roli i v procesu „*promoter escape and clearance*“ (Vassylyev *et al.*, 2002). Experimenty s nenávanou podjednotkou σ prokázaly, že samotná σ je autoinhibována a na promotor se neváže. Neváží se na ni ani známé transkripční aktivátory a promotorové elementy (Dombroski *et al.*, 1992; Borukhov & Severinov, 2002), i když práce z počátku tohoto roku naznačují určitou možnost vazby samotné podjednotky σ na promotor (Yeh *et al.*, 2011; Sevim *et al.*, 2011).

Bakteriální faktory sigma se dělí do dvou rodin, σ^{70} a σ^{54} (Gruber & Gross, 2003). Podjednotky σ z rodiny σ^{70} jsou složeny přibližně z 600 AA a strukturně se dělí na čtyři konzervované domény, které se dále dělí na několik podoblastí. Mezi první a druhou doménou rozlišujeme oblast, která není konzervovaná (obr. 3, str. 13).



Obr. 3: Rozdělení podjednotky σ na domény (model vytvořený na základě struktury podjednotky σ^{70} z *E. coli*; (Gruber & Gross, 2003). Obrázek znázorňuje čtyři konzervované domény (1-4) ve směru od N konci k C konci a jejich podoblasti. NCR označuje nekonzervovanou oblast mezi první a druhou doménou. Šípky znázorňují vazbu specifických podoblastí domén podjednotky σ na součásti promotoru.

Obecně do rodiny σ^{70} patří takové faktory σ , které se vážou na promotor bez přítomnosti dalších proteinových složek či energie. Dělíme je na čtyři skupiny. První skupinou (I) jsou tzv. primární faktory σ , které zodpovídají za transkripci provozních genů. Patří sem například σ^{70} z *E. coli* s názvem odvozeným od své molekulové hmotnosti, která odpovídá 70000 Da a dále také σ^A , hlavní σ faktor u *B. subtilis*. Do ostatních třech skupin

(II-IV) se řadí tzv. alternativní σ faktory, které jsou buňkou využívány při specifických růstových podmínkách, např. při stringentní odpovědi a jiných stresových situacích (Helmann & Chamberlin, 1988; Yeh *et al.*, 2011).

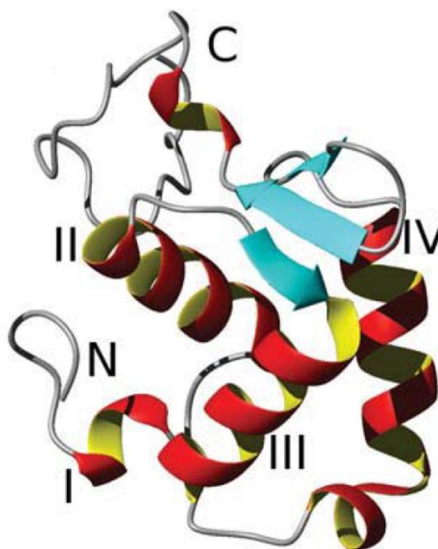
Rodina σ^{54} je minoritní skupinou, kam se řadí σ faktory, které (pokud jsou navázané na RNAP) rozeznávají sekvenci promotoru, ale pro tvorbu promotorového komplexu požadují přítomnost dalších proteinových faktorů. Hydrolýzou ATP či GTP získávají energii potřebnou pro vytvoření otevřeného transkripčního komplexu (RP_O). Tato rodina faktorů σ tedy využívá na rozdíl od rodiny σ^{70} zcela odlišnou strategii vazby RNAP na promotor (Borukhov & Severinov, 2002).

Počet σ faktorů se u různých bakteriálních druhů velmi liší. U *E. coli* rozeznáváme celkem 7 různých druhů podjednotek σ . Pouze jedinou podjednotku σ využívá bakterie *Mycoplasma genitalium*, která byla označena za bakterii s nejmenším genomem (Fraser *et al.*, 1995). Naopak až 65 podjednotek σ využívá bakterie *Streptomyces coelicolor* (Kim *et al.*, 2008). Obecně se u gram-pozitivních bakterií vyskytuje vyšší počet faktorů σ , což je vysvětlováno jejich využitím především během sporulace. *B. subtilis* obsahuje 18 druhů σ faktorů, které patří do rodiny σ^{70} . Nedávno byl u *B. subtilis* identifikován nový typ faktoru σ , který je tvořen proteiny YvrI a YvrHa. Jedná se doposud o jediný známý dvousložkový bakteriální faktor σ (MacLellan *et al.*, 2008 a 2009).

4.2.2 RNAP z *Bacillus subtilis*

RNAP z *B. subtilis* je menší než RNAP z *E. coli*. Dle posledních experimentů můžeme usuzovat, že se v porovnání s RNAP z *E. coli* chová odlišně (Sojka *et al.*, 2011). Obecně se RNAP gram pozitivních bakterií skládá navíc z dalších dvou podjednotek. Jedná se o podjednotky δ a druhou podjednotku ω .

(i) Delta (δ): podjednotka δ je kódována genem *rpoE* a skládá se ze 173 AK. Její molekulová hmotnost je přibližně 21400 Da. Dělí se na dvě domény, které jsou spojeny sedmi až devíti lyzinovými zbytky. Větší je strukturovaná N-terminální doména (NTD) o velikosti 95 AK skládající se ze čtyř α -helixů a jednoho antiparalelního β -listu. Následuje jí C-terminální doména (CTD) o velikosti 69 AK, která strukturovaná není (López de Saro *et al.*, 1999; Motáčková *et al.*, 2010).



Obr. 3A: Struktura N-terminální domény proteinu δ u *B. subtilis* (Motáčková *et al.*, 2010). Čtyři α -helixy jsou označeny číslicemi I až IV a antiparalelní β -list je označen modrou barvou. Konce domény jsou označeny písmeny N a C.

Podjednotka δ se vyskytuje pouze u gram pozitivních bakterií, kde je v rámci oddělení Firmicutes její sekvence vysoce konzervovaná. Podjednotku δ obsahuje i minimální genom *M. genitalium* (Doherty *et al.*, 2010).

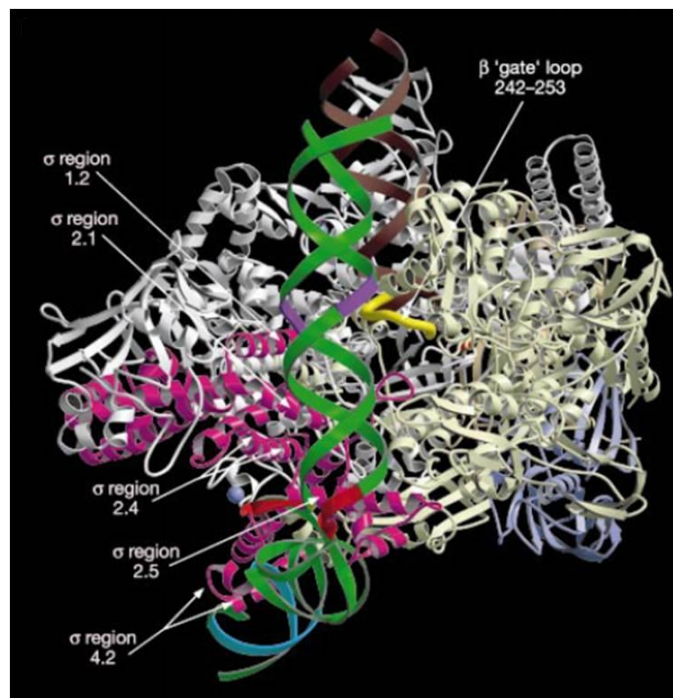
Byla objevena jako faktor kódovaný hostitelem, který je součástí virové RNAP. Bylo zjištěno, že podporuje transkripci středních a pozdních fágových genů. Díky zjištění, že se protein δ váže na RNAP byla δ od té doby považována za její regulérní součást a začala být standardně označována jako plnohodnotná podjednotka RNAP (Pero, 1975; Tjian *et al.*, 1977).

Podjednotka δ se váže na RNAP pomocí své domény NTD a tím orientuje svou doménu CTD k vazbě na povrch RNAP. Z výsledků získaných ze studia podjednotky δ *in vitro* vyplývá, že δ zvyšuje efektivitu transkripce, uplatňuje se při tvorbě transkripční bubliny (tzv. „promoter melting“) a dále při recyklaci RNAP. Prozatím žádný z těchto výsledků nebyl potvrzen *in vivo* (Hyde *et al.*, 1986; Juang & Helmann, 1994; López de Saro *et al.*, 1995 a 1999). U kmene *B. subtilis*, kde byl inaktivován gen *rpoE* kódující protein δ byla pozorována změna morfologie kolonií a prodloužená *lag* fáze růstu (López de Saro *et al.*, 1999), ale jiné zdroje tento fenotyp prozatím nepotvrdily (Doherty *et al.*, 2010). Dále byl

zjištěn vliv inaktivace δ na sporulaci (Gao & Aronson, 2004). U *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus* byla po inaktivaci proteinu δ ovlivněna virulence (Watson *et al.*, 1998; Seepersaud *et al.*, 2006). Role podjednotky δ u *B. subtilis* je extenzivně studována také v naší laboratoři.

(ii) Omega (ω): RNAP *B. subtilis* obsahuje dvě podjednotky ω . Označujeme je jako ω_1 a ω_2 . Podjednotka ω_1 je unikátní pro RNAP gram pozitivních bakterií. V *B. subtilis* je kódována genem *yzkG*. Její sekvence se nijak nepadobá sekvenci podjednotky ω u Archaea ani u eukaryont. Experimenty ukázaly, že se neváže do stejného místa na RNAP jako ostatní podjednotky ω [(Doherty *et al.*, 2010), nepublikované výsledky]. Její role tedy prozatím zůstává neznámá. Podjednotka ω_1 *B. subtilis* je také studována v naší laboratoři.

Podjednotka ω_2 je homologní s jedinou podjednotkou ω v *E. coli* (gen *rpoZ*) a v *B. subtilis* je kódována genem *yloH*.



Obr. 4: Krystalová struktura holoenzymu RNAP s DNA u *T. thermophilus*. Obrázek znázorňuje počátek iniciace transkripce, kdy se již začíná tvořit otevřený komplex (Vassilyev *et al.*, 2002).

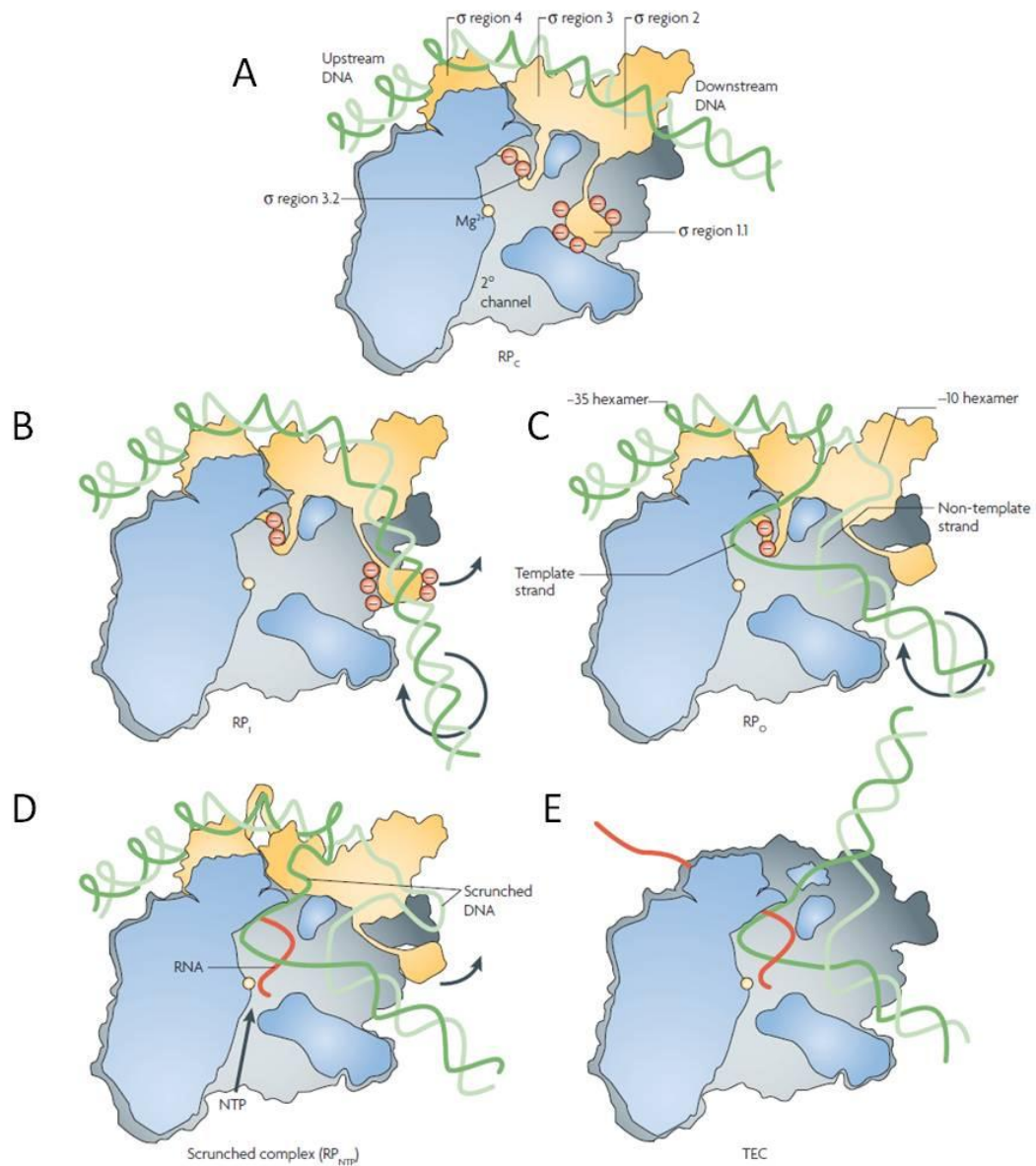
4.3 Mechanismus transkripce

Průběh transkripce v bakteriální buňce se rozděluje na tři fáze: na iniciaci, elongaci a terminaci.

Iniciace. Iniciace transkripce probíhá podle následujícího schématu:



Průběh iniciace popisuje obrázek 5 na straně 18. Nejprve dochází ke kontaktu holoenzymu RNAP s hexamery -10 a -35 v promotorové sekvenci. Hexamer -10 je rozpoznán doménou 2 podjednotky σ a hexamer -35 rozpoznává doména 4 podjednotky σ . Dalšími dvěma důležitými promotorovými elementy, které jsou rozpoznávány RNAP během iniciace jsou ještě rozšířený element -10, který rozpoznává doména 3 podjednotky σ a dále UP element, na který se u některých promotorů váže C-terminální doména podjednotky α . Na základě těchto kontaktů RNAP s promotorem vzniká uzavřený promotorový komplex (RP_C). Tento krok je následován postupným rozplétáním dvouřetězcové DNA kolem hexameru -10 (mezi nukleotidy -12 až +2). Následuje proces isomerizace (I), při kterém dochází ke konformačním změnám RNAP i DNA a vede k vytvoření otevřeného promotorového komplexu (RP_O). Ve fázi RP_O je RNAP chráněna proti navázání negativně nabitých molekul, které se mohou chovat jako kompetitory. Jednou z takových látek je polyanion heparin, který s vysokou afinitou váže volnou RNAP (jako kompetitor schopný vázat volnou RNAP může být použita i dvouřetězcová DNA), (Haugen *et al.*, 2008). Transkripce je iniciována připojením prvního nukleosid trifosfátu (NTP). V přítomnosti substrátu, kterým jsou NTP tak dochází k syntéze krátkého úseku RNA o délce 9-12 nukleotidů. 8-9 nukleotidů z tohoto krátkého úseku RNA je spárováno s komplementární sekvencí DNA a vzniká tak krátký DNA-RNA hybrid. V počátku polymerace, po napojení několika NTP se polymerace může zastavit a RNAP může sklouznout o několik pozic zpět do počáteční pozice v RP_O . Tyto krátké úseky RNA označujeme jako tzv. abortivní transkripty (RP_{ABORT}). Abortivní iniciace byla pozorována nejprve *in vitro* (Hsu *et al.*, 1995), a její existence byla posléze potvrzena také *in vivo* u *E. coli* (Goldman *et al.*, 2009). Přesná funkce takto vzniklých krátkých abortivních transkriptů zůstává nadále neznámá, nicméně bylo potvrzeno, že abortivní transkripce ovlivňuje promotorovou aktivitu (Liu *et al.*, 1994).



Obr. 5: Schéma iniciace transkripce u *E. coli* (Haugen *et al.*, 2008). Templátové nekódující vlákno je označeno tmavě zelenou barvou; netemplátové a tedy kódující vlákno je označeno světle zeleně; RNA transkript značí červená barva; katalytické ionty Mg^{2+} označují žluté kruhy; červeně jsou označeny kyselé aminokyselinové zbytky regionů 1.1 a 3.2 podjednotky σ^{70} . (A): RP_c – DNA je dvouvláknová a posouvá se do hlavního kanálu na RNAP; (B): RP_i – oblast 1.1 podjednotky σ se posouvá směrem do aktivního místa RNAP, čímž se DNA dostává do hlavního kanálu. Začíná se vytvářet transkripční bublina; (C): RP_o – vlákna DNA se od sebe oddělují, templátové vlákno se posouvá do pozice ideální pro zařazení prvního NTP; (D): syntéza RNA již začala, DNA vlákna v oblasti hexameru -10 jsou přechodně vytláčena, což je stav těsně před uvolněním RNAP z promotoru; (E): elongační komplex – podjednotka σ se uvolnila z RNAP, pokračuje syntéza RNA.

Během iniciace je RP_O v rovnováze s množstvím intermediátů, přičemž tato rovnováha závisí na mnoha faktorech. Je jimi především samotná sekvence promotoru, teplota a také koncentrace Mg^{2+} (Murakami *et al.*, 2002).

Vzhledem k výše uvedenému průběhu iniciace bakteriální transkripce promotory obecně rozlišujeme podle jejich schopnosti vázat RNAP a tvořit RP_C a RP_O a taktéž podle toho jak stabilní je jejich RP_O , neboli jak rychle se RP_O rozpadá (poločas rozpadu RP_O).

Přechod z iniciace k elongaci. V následujícím kroku transkripce přechází z fáze iniciace do fáze elongace, čehož je dosaženo uvolněním RNAP z promotoru (tzv. „promoter escape“), uvolněním podjednotky σ z RNAP a vzniku takzvaného ternárního transkripčního komplexu (také elongační komplex, RP_E). V této fázi transkripce dochází na RNAP k mnoha konformačním změnám. Nově vytvořené vlákno RNA opouští RNAP v místě, které označujeme jako tzv. RNA-exit kanál. C-terminální doména faktoru σ blokuje RNA-exit kanál, a právě proto faktor σ z RNAP disociuje, aby nedošlo ke kontaktu těchto dvou struktur. U *E. coli* bylo zjištěno, že uvolnění RNAP z promotoru napomáhají faktory GreA a GreB. Tyto dva faktory rovněž podporují produktivitu iniciace transkripce *in vitro* a také *in vivo* (Hsu *et al.*, 1995).

Byl navržen i alternativní mechanismus přechodu z iniciace transkripce k elongaci, který byl zjištěn u komplexu RNAP a σ^{70} v *E. coli*. Faktor σ zde zůstává navázaný na katalytické jádro RNAP a je součástí ternárního komplexu během elongace. Následkem konformačních změn RNAP pak faktor σ RNA-exit kanál zřejmě nadále neblokuje (Barnahum & Nudler, 2001).

Elongace. Během elongace se RNAP posouvá podél řetězce DNA a podle sekvence templátového vlákna syntetizuje nově vznikající RNA. Řetězec RNA je tak (s výjimkou thyminových bází, které jsou v RNA řetězci nahrazeny uracilem a také s výjimkou deoxyribózy) přesnou kopií kódujícího vlákna DNA. Prodlužování řetězce RNA probíhá tak, že se na volný 3' konec, který je tvořen skupinou $-OH$ připojují nukleotidy na základě komplementarity bází. Jednořetězcová RNA je následně z komplexu s DNA postupně uvolňována.

Terminace. Terminace transkripce u bakterií probíhá dvěma možnými způsoby. První variantou je terminace probíhající nezávisle na faktoru Rho. V tomto případě se transkripce zastavuje, jakmile se na RNA řetězci vytvoří vlásenková smyčka bohatá na páry guaninu a cytosinu následovaná několika uracily za sebou. RNAP po této struktuře sklouzne a uvolňuje se tak z řetězce, čímž je transkripce zastavena. V druhém případě terminace, která je na faktoru Rho závislá, se proteinový faktor Rho přímo účastní procesu terminace. Tento faktor destabilizuje elongační transkripční komplex a RNAP je tak z tohoto komplexu uvolněna a transkripce je ukončena. Tento způsob terminace vyžaduje ještě přítomnost tzv. Rho-dependentních transkripčních faktorů, kterými jsou například elongační faktory NusA, NusB a NusG, které Rho faktor váže (viz dále v textu).

U *E. coli* faktor Rho patří mezi esenciální proteiny (Das *et al.*, 1976). Byly zde popsány oba možné způsoby terminace transkripce. U *B. subtilis* faktor Rho esenciální není. Bylo zjištěno, že terminuje i svou vlastní transkripci (de Hoon *et al.*, 2005).

4.4 Regulace transkripce

Je třeba zdůraznit, že v buňce je přibližně 4 – 5 tisíc genů, které musí RNAP přepsat (příklad pro *E. coli*). Toto číslo zahrnuje také geny kódující stabilní RNA, která je potřeba pro translaci a pro tento účel je nezbytná vysoká koncentrace RNAP. Určité množství RNAP je také v buňce vázané na DNA a je neaktivní. Samotné množství RNAP v buňce je tedy pro transkripci limitující, stejně tak je limitující i množství faktoru σ , který je nutný pro efektivní iniciaci. Různé promotory tedy mezi sebou soutěží o RNAP využitelnou pro svou transkripci (Ishihama, 2000; Maeda *et al.*, 2000; Browning & Busby, 2004).

Nejvíce je transkripce regulována již během iniciace (viz následující kapitola 4.5). Regulace obecně probíhá pomocí mnoha faktorů, které účinkují prostřednictvím vazby na DNA, RNA i samotnou RNAP. Tyto faktory mohou být proteinové povahy, nebo se jedná o peptidy či malé nekódující RNA. U *E. coli* (podobně také u dalších bakteriálních druhů) je to například 6S RNA, která jako malá nekódující RNA přímo interaguje s RNAP prostřednictvím podjednotky σ^{70} a reguluje tak transkripci mnoha genů (Wassarman, 2007; Cavanagh *et al.*, 2008). Mezi další regulační faktory patří polyfosfáty, aminokyseliny, vitamíny či jiné látky. U *E. coli* je známo 285 faktorů proteinové povahy, které mají vliv na

transkripci. Většina těchto faktorů (265) je DNA vazebnými proteiny, které regulují transkripci již během iniciace. Samotná regulace obecně probíhá na základě vazby faktoru na promotor, čímž je znemožněna, nebo naopak umožněna vazba RNAP do těchto míst (Borukhov *et al.*, 2005).

Doposud není známo mnoho proteinů, které by regulovaly elongaci a terminaci transkripce. Do malé skupiny známých regulačních proteinů patří především faktory Nus (NusA, NusB, NusG a NusE), faktor RfaH, ribosomální protein S4, faktory GreA a GreB, Mfd, RapA (HepA) a Rho (Borukhov *et al.*, 2005). Tyto faktory přímo ovlivňují přechodné zastavení transkripce (tzv. „transcription pausing“), její předčasné ukončení, pohyb transkripční bubliny, správné párování při syntéze podle předlohy ale i rychlost transkripce a celkovou procesivitu RNAP.

- **NusA:** NusA je vysoce konzervovaný protein jak u Eubacteria, tak u Archaea. V transkripci se účastní především antiterminace (v komplexu s NusG, NusB a NusE). Je zodpovědný také za signály vedoucí k „pausingu“. Účastní se i terminace nezávislé na faktoru Rho (de Hoon *et al.*, 2005).
- **Mfd:** protein Mfd je taktéž velmi konzervovaný. Jeho velikost je přibližně 130000 Da. Váže se do DNA primárního kanálu na RNAP. Jeho role spočívá v obnově zastavené transkripce (restart elongace), (Roberts & Park, 2004).
- **S4:** u ribosomálního proteinu S4 byla objevena regulační funkce podobná elongačnímu faktoru NusA. Účastní se antiterminace rRNA i jiných „neribosomálních“ operonů (Torres *et al.*, 2001).
- **Gre faktory:** GreA a GreB jsou proteiny o velikosti 160 kDa dělení se na dvě strukturované domény. N-terminální doména má charakter „coiled-coil“, kdežto C-terminální doména je globulární. Tato globulární doména je zodpovědná za vazbu faktoru do sekundárního kanálu RNAP. Gre faktory stimulují nukleolytickou funkci RNAP, čímž dochází k potlačení „pausingu“ RNAP *in vitro* a taktéž *in vivo* (Borukhov *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2008). GreB je schopen zastoupit funkci jiného transkripčního faktoru DksA při regulaci rRNA transkripce *in vitro*. V buňce je ale jeho koncentrace příliš nízká a tak po jeho delecii nebyl u *E. coli* pozorován žádný vliv na fenotyp. GreA má díky své nízké afinitě k RNAP taktéž pouze minoritní vliv na regulaci rRNA operonů (Laptenko *et al.*, 2003).

4.5 Regulace iniciace transkripce

Promotorová sekvence. Genom *E. coli* obsahuje přibližně 2000 různých promotorových sekvencí (Salgado *et al.*, 2001). Je to právě různorodost promotorových sekvencí, která umožňuje velmi různorodé rozmístění molekul RNAP po transkripčních jednotkách. Je známo, že promotory fungují efektivněji, pokud jejich čtyři hlavní elementy (hexamery -10 a -35, rozšířená oblast -10 a UP element) vykazují sekvence blízké konsensu. Přitom většina promotorových sekvencí v buňce je konsensu naopak vzdálena. Právě poměr mezi sekvencně odlišnými promotory je důležitý pro dosažení takové transkripce, která je pro buňku v daných podmínkách nejvýhodnější.

Mnoho nejsilnějších bakteriálních promotorů využívá efektivní UP elementy, které, jak již bylo zmíněno v kapitole 4.1, váží RNAP prostřednictvím CTD domény podjednotky α a ve výsledku jsou schopné transkripci z daného promotoru mnohonásobně zesílit (Browning & Busby, 2004). Čtyři aminokyseliny T263, R265, G296 a K298 v doméně CTD podjednotky α byly zjištěny jako stěžejní pro vazbu na DNA. Prostřednictvím těchto aminokyselin se RNAP váže do malého žlábků sekvence DNA UP elementu. Tato oblast α CTD je u bakterií téměř absolutně konzervována (Ross *et al.*, 2001).

Příkladem takto regulovaného promotoru je ribosomální RNA promotor P1 (*rrn* P1) *E. coli*, jehož sekvence UP elementu bohatá na adenin a thymin zesiluje transkripci řízenou z tohoto promotoru 50 - 60 x. Pokud podjednotka α interaguje ještě s transkripčním faktorem Fis, je transkripce z tohoto promotoru zesílena až 300 x (Hirvonen *et al.*, 2001).

Faktory sigma. Příkladem je opět *E. coli*, kde se hlavní faktor σ^{70} účastní iniciace transkripce. Genom této bakterie obsahuje šest dalších druhů faktorů σ , které se akumulují jakožto odpověď na různé druhy stresu. Následně soutěží se σ^{70} o RNAP (podrobně o sigma faktorech pojednává kapitola 4.2.1 Podjednotky RNAP), (Browning & Busby, 2004). V mnoha případech je iniciace v přítomnosti faktoru σ pod kontrolou tzv. anti-sigma faktorů (Hughes & Mathee, 1998).

Transkripční faktory. Transkripční faktory (TF) předurčené k vazbě na promotor kóduje v *E. coli* téměř 300 genů. Tyto faktory svou vazbou stimulují či naopak potlačují transkripci. Přibližně u poloviny těchto proteinů byla jejich funkce ověřena experimentálně. Většinu z této skupiny faktorů tvoří DNA vazebné proteiny, které se váží přímo na

promotor. Některé proteiny regulují transkripci celé skupiny genů, jiné pouze jeden jediný gen. Předpokládá se, že skupina sedmi TF (CRP, IHF, Fis, ArcA, NarL, Lrp a Fnr) kontroluje transkripci asi poloviny všech regulovaných genů. Přibližně 60 faktorů řídí pouze jediný promotor. Obecně jsou bakteriální TF rozděleny do mnoha skupin podle jejich sekvenční podobnosti.

Transkripční faktor Fis je důležitým regulátorem transkripce rRNA v *E. coli*. Jedná se o heterodimerní protein, který se během exponenciálního růstu vyskytuje v buňce ve vysoké koncentraci. Stimuluje transkripci při dostatku živin, což bylo potvrzeno u několika ribosomálních ale i jiných, neribosomálních promotorů. Protein Fis se váže jak na DNA, tak na RNAP. Na RNAP se váže prostřednictvím podjednotky α , která je současně vázaná podjednotkou β' (Hirvonen *et al.*, 2001).

Regulace pomocí malých ligandů. Tento způsob regulace pomocí malých molekul umožňuje bakterii rychle reagovat na změny v prostředí.

(i) **(p)ppGpp:** jedním z takových ligandů je „guanosin penta či tetra fosfát“, neboli (p)ppGpp [přesněji guanosin-5'-(tri)difosfát-3'-difosfát], který bakterie *E. coli*, kde byl tento alarmon před více jak 40 lety objeven, syntetizuje při stringentní odpovědi. Jedná se o stav, kdy dojde v prostředí, ve kterém buňka žije k náhlému nedostatku aminokyselin a buňka na tento jev musí rychle reagovat. Následkem toho buňka indukuje expresi enzymů pro biosyntézu nových aminokyselin a zároveň začíná šetřit energií, čehož je dosaženo rychlým zastavením rRNA transkripce. K aktivaci stringentní odpovědi dochází vstupem nenabitě tRNA do A místa na ribosomu, čímž se zároveň aktivuje s ribosomem asociovaný protein RelA.

Za produkci (p)ppGpp v *E. coli* zodpovídají dva proteiny, RelA a SpoT. RelA je enzym, který ppGpp syntetizuje z GTP nebo GDP a s využitím ATP. SpoT je bifunkční enzym, který má kromě schopnosti ppGpp syntetizovat také hydrolytickou aktivitu. Zodpovídá tak za regulaci hladiny ppGpp v buňce. Reaguje zejména na nedostatek zdrojů uhlíku, mastných kyselin nebo železa.

Nedávno byl u *E. coli* popsán nový mechanismus regulace transkripce genu *relA*, který protein RelA kóduje. Bylo zjištěno, že během stacionární fáze růstu *E. coli* transkripci tohoto genu řídí malá nekódující 6S RNA, která se přímo váže na RNAP prostřednictvím

podjednotky σ^{70} . Tato regulace tak přímo ovlivňuje hladinu ppGpp v buňce (Cavanagh *et al.*, 2010).

Na rozdíl od *E. coli* je u mnoha jiných bakterií znám pouze jediný enzym zodpovědný za syntézu i regulaci ppGpp. Do nedávné doby tomu tak bylo také u *B. subtilis*. Role syntézy ppGpp u *B. subtilis* byla kromě homologního proteinu RelA (u *B. subtilis* má RelA také hydrolytickou aktivitu, která je obdobou funkce SpoT u *E. coli*) přiřazena ještě dvěma dalším bílkovinám YjbM a YwaA. Oba proteiny jsou poměrně malé a jejich sekvence odpovídá ppGpp syntetázové doméně RelA-SpoT. Geny kódující YjbM a YwaA byly nalezeny také v genomu *Streptococcus mutans*. Avšak přesný způsob fungování YjbM a YwaA prozatím zůstává neznámý (Nanamiya *et al.*, 2008; Natori *et al.*, 2009).

Alarmon ppGpp je znám jako globální regulátor, který kontroluje mnoho buněčných procesů, mezi které patří transkripce, translace, metabolismus nukleotidů i replikace DNA (Natori *et al.*, 2009). Níže uvádím dva hlavní známé mechanismy regulace transkripce pomocí ppGpp v *E. coli*.

- **Negativní regulace transkripce pomocí ppGpp.** Negativní vliv ppGpp na regulaci transkripce u *E. coli* spočívá v inhibici iniciace transkripce rRNA promotorů *in vitro* a *in vivo*. Oblast diskriminátoru rRNA promotorů, tedy místa kam se váže svou oblastí 1.2 podjednotka σ , je bohatá na guanin a cytosin. Tento typ promotorů během iniciace vytváří velmi nestabilní otevřené komplexy s RNAP. ppGpp snižuje stabilitu těchto komplexů a tím inhibuje iniciaci transkripce (Paul *et al.*, 2004).

- **Pozitivní regulace transkripce pomocí ppGpp.** ppGpp funguje jako přímý aktivátor promotorů řídících transkripci aminokyselinových operonů. Bylo také zjištěno, že ppGpp v přítomnosti purifikovaného proteinu DksA zvyšuje rychlost izomerizace RNAP během tvorby otevřeného komplexu *in vitro*. Sekvence diskriminátoru promotorů pro syntézu aminokyselin je bohatá na adenin a thymin a tyto promotory tak vytváří stabilní komplexy s RNAP, které ppGpp svou regulací podporuje (Paul *et al.*, 2004; Potrykus & Cashel, 2008).

(ii) DksA, GreA a GreB

DksA je malý protein, který u *E. coli* zastává funkci transkripčního faktoru. Skládá se ze dvou domén. První doména je tvaru „coiled-coil“ a má na svém konci dva kyselé aminokyselinové zbytky. Druhá doména je globulární. DksA je strukturně výrazně podobný transkripčním elongačním faktorům GreA a GreB. Sekvenční podobnost ale DksA k těmto

faktorům postrádá. Místo vazby na sekvenci DNA se DksA, stejně jako Gre faktory váže do sekundárního kanálu RNAP, čímž ovlivňuje senzitivitu RNAP ke koncentraci iniciačních nukleotidů. Díky přímé vazbě na RNAP má DksA potenciál ovlivňovat transkripci mnoha promotorů. Je tedy s podivem, že inaktivace genu *dksA* měla vliv pouze na expresi rRNA. Ostatních efektů (např. citlivost ke koncentraci aminokyselin) bylo dosaženo pouze nepřímo (Paul *et al.*, 2004). Nedávno byl zjištěn zásadní vliv DksA na dělení buňky. Bylo zjištěno, že DksA destabilizuje RNAP, což vede k odvázáni RNAP z řetězce DNA a uvolnění místa replikaci (Tehranchi *et al.*, 2010).

DksA reguluje iniciaci transkripce v úzké kooperaci s ppGpp. Hlavní funkcí DksA je pravděpodobně zesílení účinku ppGpp. DksA také zesiluje vliv iniciačních nukleosid trifosfátů (iNTP) během regulace iniciace transkripce [viz sekce (iii) pojednávající o regulaci iniciace transkripce pomocí iNTP].

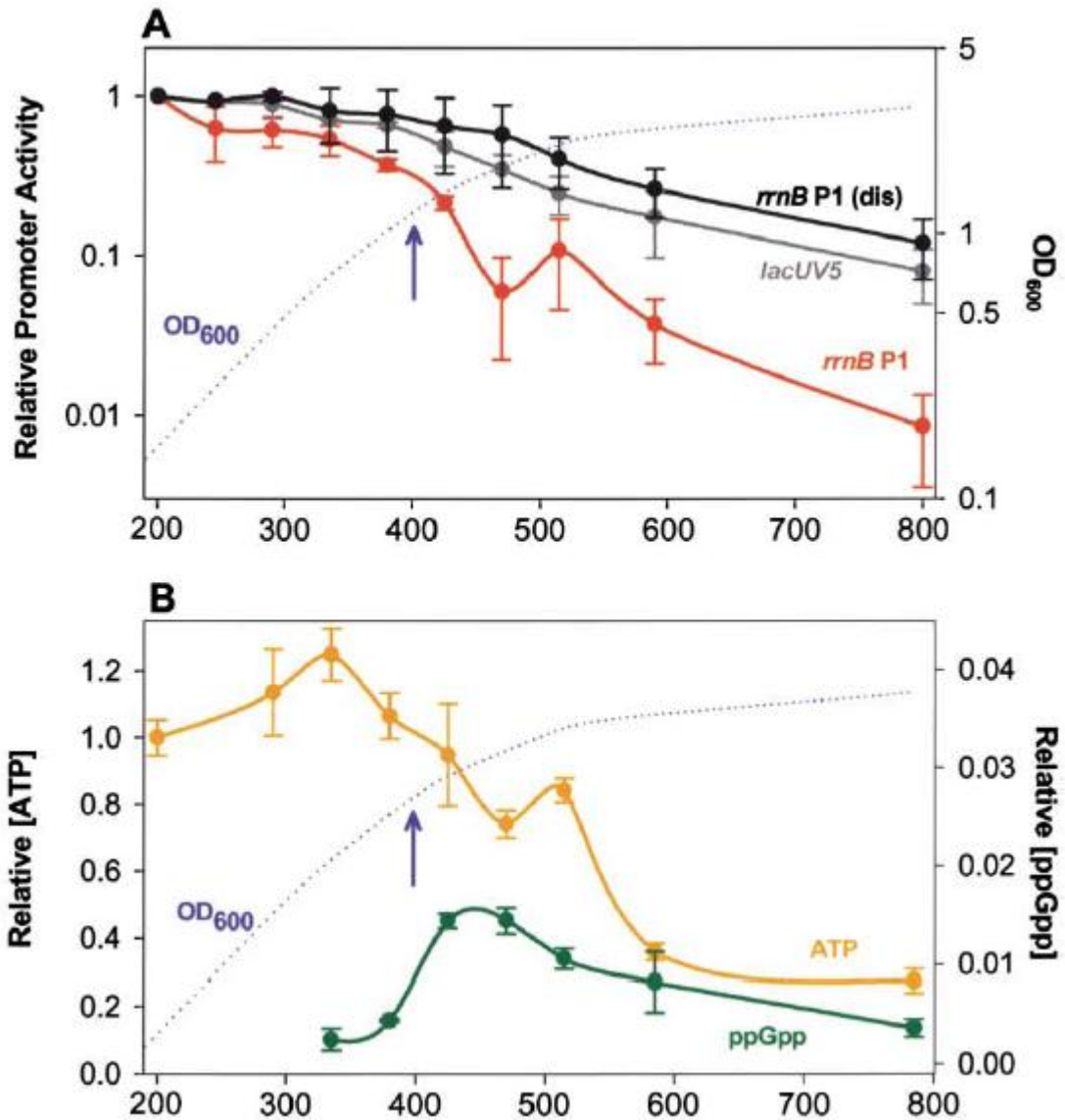
Další již výše zmíněný protein GreB má v *E. coli* podobný vliv na RNAP a transkripční iniciaci jako DksA (Potrykus *et al.*, 2006; Rutherford *et al.*, 2009). V *B. subtilis* se protein DksA nevyskytuje. Jeho tři nejbližší homologní proteiny (kódované geny *yteA*, *yocK* a *ylyA*) byly postupně inaktivovány, avšak žádný efekt na iniciaci rRNA transkripce nebyl pozorován (Krásný & Gourse, 2004).

Dalšími možnými kandidáty na malé proteiny účastníci se regulace iniciace rRNA transkripce u *B. subtilis* jsou proteiny GreA a podjednotka δ RNAP. GreA je na rozdíl od dvou *E. coli* Gre faktorů (GreA a GreB) jediným Gre faktorem v *B. subtilis* (Doherty *et al.*, 2006). Podjednotka δ byla již dříve popsána jako faktor ovlivňující komplex RNAP s promotorem (Achberger & Whiteley, 1981; López de Saro *et al.*, 1999). Naše prozatím nepublikované výsledky získané ze studia tohoto proteinu ukazují, že δ má schopnost ovlivňovat senzitivitu RNAP ke koncentraci iNTP (více v kapitole Výsledky – část I). Role proteinů δ a GreA je v naší laboratoři v současnosti extenzivně studována.

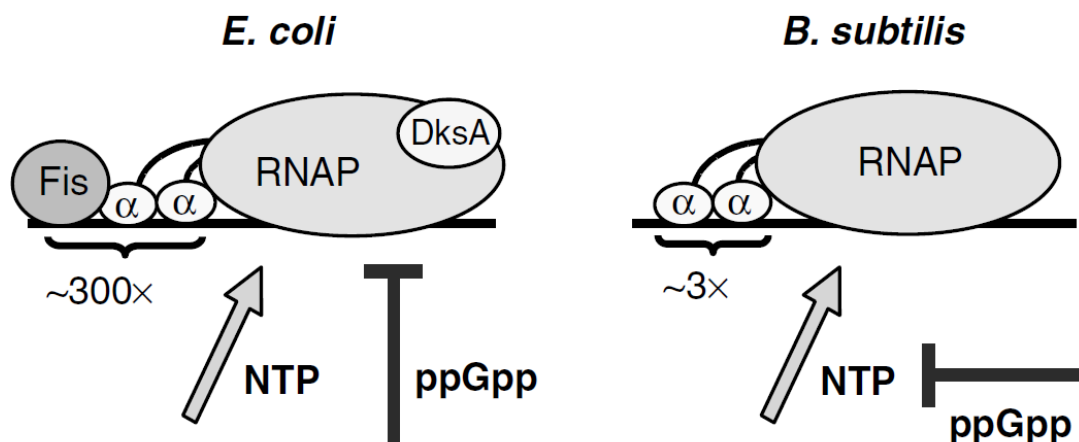
(iii) iniciační NTP (iNTP): Koncentrace iNTP a také ppGpp se v buňce mění v závislosti na fázi růstu, ve které se bakterie vyskytuje (obr. 6, str. 27). Obě tyto malé molekuly regulují transkripci mnoha promotorů. Během exponenciální fáze růstu se buňky nejvíce dělí, a proto je potřeba pro syntézu nových proteinů velmi vysoká. Z tohoto důvodu je i aktivita rRNA promotorů velmi vysoká právě během exponenciální fáze. Opačná situace nastává, když buňky dosáhnou stacionární fáze, tedy okamžiku, kdy médium začíná být chudé na živiny, a

buňky jsou nuceny začít šetřit energií. V této fázi se transkripce z rRNA promotorů silně omezuje. Tento způsob regulace probíhá pomocí ppGpp a iNTP. Z obrázku 6 (str. 27) je zřejmé, že aktivita promotoru [zde byl použit regulovaný ribosomální promotor *rrnB* P1 a dále neregulované promotory *rrnB* P1(dis) a *lacUV5*; model z *E. coli*] koreluje přímo s hladinou iniciačního NTP (ATP) jakožto pozitivního regulátoru a nepřímo s hladinou ppGpp, jakožto negativního regulátoru. Regulace takto probíhá v různých fázích růstu kultury *E. coli*. Graf ukazuje, že v počáteční exponenciální fázi růstu promotor reaguje svou aktivitou na změnu hladiny iNTP, v průběhu exponenciální fáze se řídí hladinou ppGpp a ve stacionární fázi je aktivita promotoru již řízena jak hladinou ppGpp, tak pomocí iNTP. Koncentrace těchto dvou malých molekul tedy řídí transkripci regulovaného promotoru v rámci exponenciální i stacionární fáze růstu, což je pro bakterii velmi výhodné (Murray *et al.*, 2003).

Regulace iniciace transkripce z rRNA promotorů v *B. subtilis* probíhá i v tomto ohledu odlišně od *E. coli* (obr. 7, str. 28). Alarmon ppGpp se přímo neváže na RNAP. Pro syntézu ppGpp buňka používá GTP, jehož koncentrace se na základě tvorby ppGpp snižuje. Efekt ppGpp je zde tedy nepřímý a zcela nezávislý na faktorech, které jsou homologní s DksA (protein DksA se v genomu *B. subtilis* nevyskytuje). Koncentrace ppGpp tedy nemá v *B. subtilis* na aktivitu rRNA promotorů přímý vliv ani *in vitro* ani *in vivo*. Iniciace transkripce z rRNA promotorů je u *B. subtilis* řízena stejně jako u *E. coli* pomocí iNTP, s tím rozdílem, že u *B. subtilis* se jedná o jediný přímý regulační mechanismus (více v kapitole Výsledky – část I). Ribosomální RNA promotory jsou u *B. subtilis* citlivé ke koncentraci iNTP v buňce. Regulace iniciace rRNA transkripce pomocí koncentrace iNTP je tedy u *B. subtilis* hlavním regulačním mechanismem této transkripce (Krásný & Gourse, 2004). Regulace transkripce rRNA u termofilní bakterie *Thermus thermophilus* zřejmě probíhá obdobně jako u *B. subtilis* (Kasai *et al.*, 2006).



Obr. 6: Regulace promotorové aktivity pomocí iNTP a ppGpp při vstupu bakterie *E. coli* do stacionární fáze růstu a dále v jejím průběhu (Murray *et al.*, 2003). (A): Relativní promotorová aktivita v závislosti na čase: červená barva označuje regulovaný promotor *rrnB* P1, šedá neregulovaný *LacUV5*, černá neregulovaný *rrnB* P1(dis), přerušovaná čára označuje růstovou křivku; (B): Relativní koncentrace ppGpp a ATP v závislosti na čase: zelená barva označuje hladinu ppGpp, žlutá ATP, přerušovaná čára je růstová křivka; osa x v obou grafech znázorňuje časovou škálu v minutách; šipky znázorňují počátek klesání aktivity promotoru *rrnB* P1 v součinnosti s klesající koncentrací ATP a stoupající koncentrací ppGpp.



Obrázek 7: Rozdíly v regulaci iniciace transkripce rRNA u *E. coli* a *B. subtilis*. U *B. subtilis* je role „up elementů“ pouze minoritní. Hlavní úlohu v regulaci iniciace transkripce zde mají iniciační nukleotidy (na obrázku označeny jako NTP), (Krásný & Gourse, 2004).

4.6 Ribosomální RNA promotory v *B. subtilis*

4.6.1 Struktura rRNA promotorů v *B. subtilis*

Genom *B. subtilis* obsahuje nejčastěji 10 rRNA operonů (viz kapitola 3.2). Tyto operony jsou většinou přepisovány pomocí dvou promotorů P1 a P2. Výjimku tvoří operon *rrnH* jehož transkripce probíhá ještě z promotoru P3. Operony *rrnJ-W* a *rrnI-H-G* jsou přepisovány najednou. Transkripce těchto dvou skupin operonů je řízena z promotorů P1 a P2 umístěných před operonem *rrnJ* a *rrnI*. Sekvence všech rRNA promotorů P1 a P2 u *B. subtilis* znázorňuje následující obrázek 8 (str. 29).

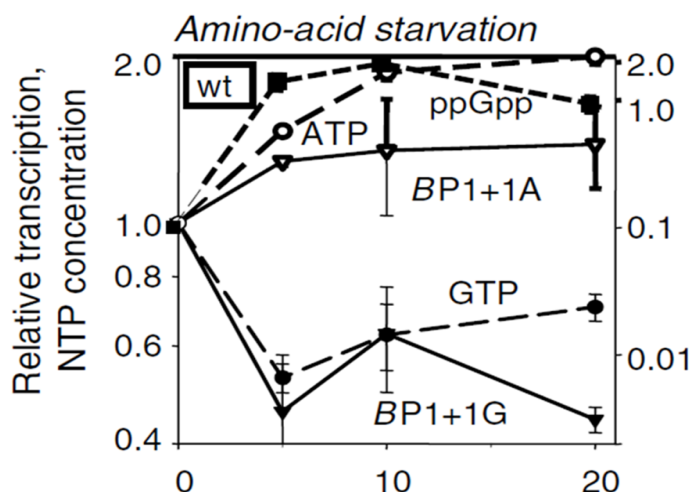
P1	-35	-10	+1
<i>rrnB</i>	ttgcaataaataaatacaggtg	tatatatt	attaaacg
<i>rrnJ</i>	ttgactattatttactaggtgg	tatatatt	attatttcg
<i>rrnA</i>	ttgacttagacaactgaaggtg	tattctaatatac	g
<i>rrnI</i>	ttgaccttttgataatatccg	gatata	tattatttcg
<i>rrnH</i>	společný s <i>rrnI</i>		
<i>rrnW</i>	společný s <i>rrnJ</i>		
<i>rrnG</i>	společný s <i>rrnI</i>		
<i>rrnO</i>	tttacagtcataaaaattatgg-	tataat	catttctg
<i>rrnE</i>	ttgaccaaataaaacagggca	tggtata	tattaaacg
<i>rrnD</i>	ttgactctgattcttgaccg	tggtata	tattaaacg
P2	-35	-10	+1
<i>rrnB</i>	ttgacaaaaaagaagctgaatg	tatatatt	agtaaag
<i>rrnJ</i>	ttgacttcactgagtcaacgag	tataata	ataaag
<i>rrnA</i>	ttgacagtagcggcggtaaatg	tatgata	ataaag
<i>rrnI</i>	ttgacttaaagaagctaaatg	tatgata	ataaag
<i>rrnH</i>	ttgactttgaagaagtgacattg	tataacta	ataaag
<i>rrnW</i>	ttgactttgaagaagtgacgttg	tataacta	ataaag
<i>rrnG</i>	ttgactttgaagaagtgacattg	tataacta	ataaag
<i>rrnO</i>	ttgacctagttaactaaaaatg	tactatta	agtag
<i>rrnE</i>	pouze promotor P1		
<i>rrnD</i>	ttgacaaaagaaagtc	aaaatg	tatattaataaag

Obr. 8: Sekvence rRNA promotorů P1 a P2 u *B. subtilis*. Oblasti hexamerů -10, -35, rozšířené oblasti -10 a iniciačního nukleotidu jsou vyznačeny tučně.

4.6.2 Rozdíly v regulaci rRNA promotorů pomocí iNTP u *E. coli* a *B. subtilis*

Všechny doposud známé výsledky studia transkripční regulace rRNA promotorů naznačují, že způsob, kterým tato regulace probíhá u gram negativní bakterie *E. coli* není zcela univerzální a platný pro všechny bakteriální druhy. Právě v případě našeho modelového organismu, gram pozitivní bakterie *B. subtilis* byl nedávno popsán odlišný systém této regulace (Krásný & Gourse, 2004). Bylo zjištěno, že všechny rRNA promotory P1 a P2 v *B. subtilis* iniciují transkripci pomocí GTP (Natori *et al.*, 2009). To je významný rozdíl od *E. coli*, kde rRNA transkripce iniciuje pomocí GTP, CTP anebo ATP. Důvod je ve fyziologii této bakterie. Například během stringentní odpovědi, kdy je bakterie nucena náhle začít šetřit energií, dochází v buňce k poklesu hladiny GTP, přičemž hladina ATP naopak stoupá. Následkem poklesu GTP *B. subtilis* zastavuje výrobu rRNA, neboť pro transkripci rRNA promotorů není dostatek iniciačního GTP. Experimenty prokázaly, že záměna GTP za

ATP v pozici +1 rRNA promotoru má během stringentní odpovědi na rRNA transkripci opačný efekt. Promotor je v tomto případě stimulován (obr. 9, str. 30). GTP je tedy jediný možný iniciační nukleotid pro rRNA promotory u *B. subtilis*, neboť CTP a UTP nejsou u *B. subtilis* uplatňovány jako efektivní iniciační nukleotidy. Tento model regulace promotorů pomocí identity +1 pozice byl potvrzen i u jiných promotorů, které startují transkripci pomocí GTP a jejich aktivita je tedy během stringentní odpovědi potlačována, anebo je v opačném případě stimulována, pokud je ATP jejich iniciačním nukleotidem (Krásný *et al.*, 2008; Tojo *et al.*, 2008 a 2010).



Obr. 9: Korelace aktivity promotoru *rrnB* P1 s hladinou iNTP během stringentní odpovědi u *B. subtilis*. Přirozený promotor *rrnB* P1+1G je senzitivní vůči klesající koncentraci GTP; mutantní *rrnB* P1+1A je senzitivní vůči rostoucí koncentraci ATP (Krásný & Gourse, 2004).

Dalším významným rozdílem je sekvence rRNA promotorů. Z hlediska studia regulace transkripce pomocí koncentrace iNTP u *E. coli* byla u této bakterie pro sekvenci senzitivních rRNA promotorů vytvořena následující shrnující pravidla:

- (i) délka mezerníku, tedy sekvence mezi hexamery -10 a -35 musí být dlouhá 16 bp
- (ii) sekvence hexameru -35 se nesmí podobat konsenzus sekvenci a rozšířená oblast -10 (TGX) se v promotoru nesmí vyskytovat vůbec
- (iii) oblast diskriminátoru, tedy sekvence mezi hexamerem -10 a pozicí +1 musí být bohatá na guanin a cytosin

- (iv) cytosin v pozici -7 netemplátového vlákna (2 bp „downstream“ od hexameru -10) hraje výraznou roli ve stabilitě otevřených komplexů *in vitro* a samotné promotorové aktivitě *in vivo* (Haugen *et al.*, 2006).

Nevykazuje-li sekvence rRNA promotoru v *E. coli* jednu z výše uvedených charakteristik, promotor ztrácí senzitivitu vůči svému iNTP (Henkin & Sonenshein, 1987; Gaal *et al.*, 1989; Hirvonen *et al.*, 2001; Haugen *et al.*, 2006 a 2008).

Sekvence rRNA promotorů u *B. subtilis*, které jsou zřejmě všechny regulovány pomocí koncentrace jejich iNTP (iGTP), se od sekvence rRNA promotorů u *E. coli* výrazně liší. Veškerá výše uvedená pravidla platná pro *E. coli* zde neplatí:

- (i) oblast mezerníku je typicky dlouhá 17 bp
- (ii) hexamery -10 a -35 se více podobají sekvenci konsenzu; promotory mají navíc také rozšířenou oblast -10 (TGX)
- (iii) oblast mezi hexamerem -10 a pozicí +1 je bohatá na adenin a thymin
- (iv) cytosin není v pozici -7.

Objasnění významu výše uvedených rozdílů v sekvenci DNA promotorových elementů mezi *E. coli* a *B. subtilis* se věnuje první část této disertační práce (kapitola Výsledky – část I).

5. Ribosomální proteiny

Ribosomální proteiny (tvoří z hlediska složení minoritní, avšak nepostradatelnou složku ribosomu) představují přibližně 35 % celkové struktury bakteriálního ribosomu. Podle toho, které z ribosomálních podjednotek jsou součástí, je dělíme na dvě skupiny. Proteiny z velké podjednotky, kterých je dnes popsáno 36, označujeme jako proteiny L1 – L36. Proteinů malé podjednotky je celkem 21 a jsou označovány jako proteiny S1 – S21. U *B. subtilis* se malá ribosomální podjednotka skládá pouze z 20 ribosomálních proteinů, protein S1 zde chybí (Roberts & Rabinowitz, 1989). Hlavní funkce ribosomálních proteinů spočívá ve strukturní stabilizaci ribosomu a především v integraci translace s ostatními buněčnými procesy. Příkladem takové integrační funkce je například role proteinu L23, který zprostředkovává kontakty mezi nascentním polypeptidem a chaperony. Esenciální elongační faktory EF-Tu a EF-G zase využívají pro kontakt s ribosomem proteinový komplex L7/L12 (Lauber *et al.*, 2009).

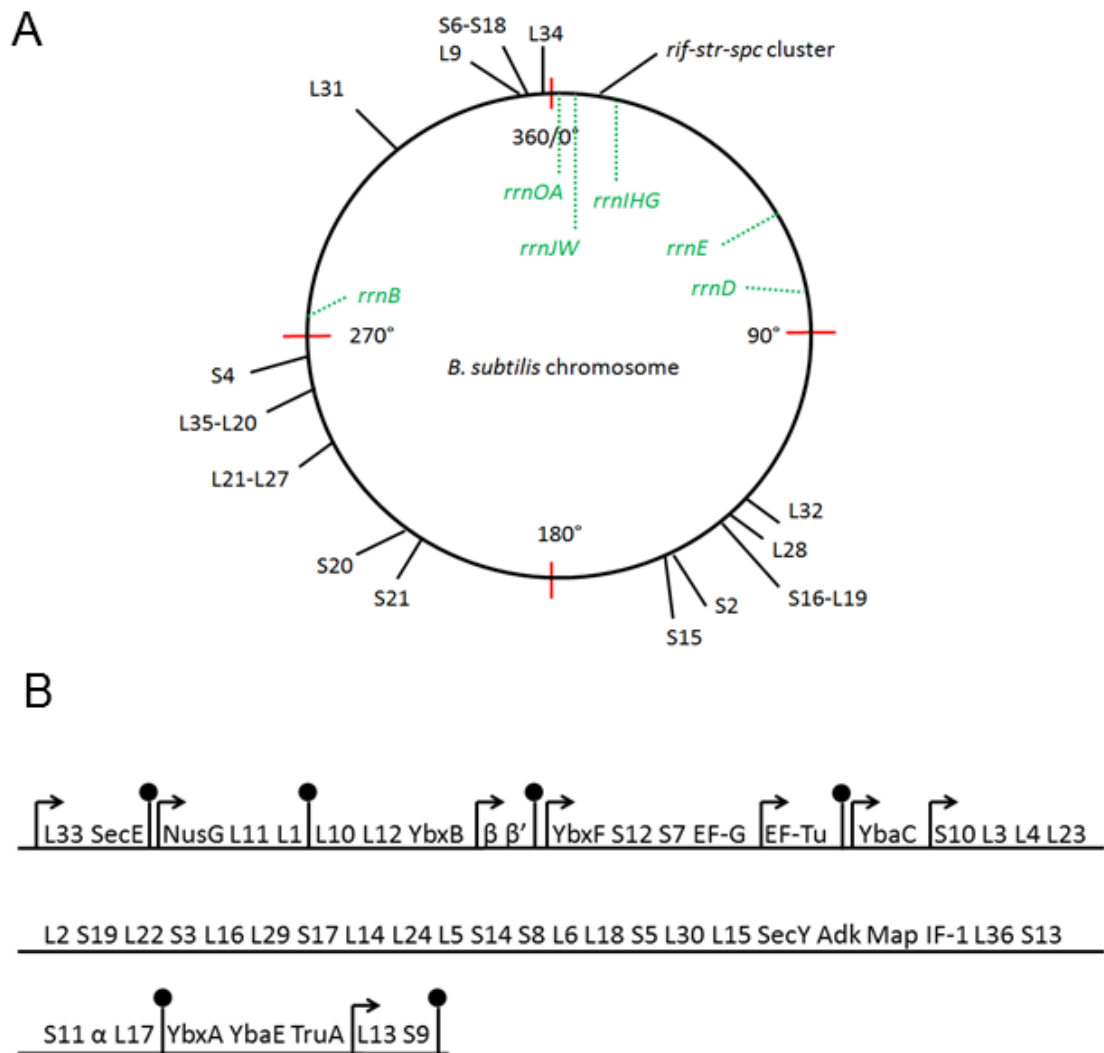
Rezistence bakterií k mnoha antibiotikům zacíleným primárně na proteosyntézu probíhá také prostřednictvím ribosomálních proteinů. Například některé mutace v genech pro ribosomální proteiny S4, S5 nebo S12 způsobují zvýšení translační procesivity a jsou tak podstatou rezistence vůči streptomycinu (Wilson & Nierhaus, 2005).

Ačkoliv je *B. subtilis* v mnoha ohledech vzorovým a hojně studovaným modelovým organismem, krystalová struktura ribosomu *B. subtilis* doposud nebyla publikována. Funkce ribosomálních proteinů *B. subtilis* proto bývá často odvozována na základě sekvenční podobnosti s ribosomálními proteiny *T. thermophilus* a *E. coli*, tedy mikroorganismů, kde již jsou krystalové struktury ribosomu k dispozici (Schuwirth *et al.*, 2005; Selmer *et al.*, 2006).

5.1 Uspořádání genů kódujících ribosomální proteiny v genomu *B. subtilis*

U *B. subtilis* je většina genů kódujících ribosomální proteiny seskupena do oblasti *rif-str-spc*, která je umístěna do blízkosti místa *ori*. Tato oblast se velmi podobá uskupení u *E. coli*, kde je většina ribosomálních genů soustředěna do oblastí *rif* a *str-spc*, které dělí 700 kb mezera. Tato místa jsou tvořena směsí genů, které se účastní transkripce a translace, což potvrzuje, že oba tyto stěžejní buněčné procesy jsou u bakterií úzce spřaženy. Všechny

další geny pro ostatní ribosomální proteiny jsou rozmístěny po menších skupinách ve zbytku genomu (obr. 10A, str. 33). Schéma uspořádání hlavní oblasti genů kódujících ribosomální proteiny u *B. subtilis* (tzv. cluster *rif-str-spc*) znázorňuje následující obrázek 10B (str. 33).



Obr. 10: Umístění genů kódujících ribosomální proteiny v genomu *B. subtilis*. (A): kruhový chromosom *B. subtilis*; geny pro ribosomální proteiny jsou označeny černě; zelenou barvou jsou znázorněny rRNA operony; (B): struktura hlavní oblasti *rif-str-spc* kódující ribosomální proteiny u *B. subtilis*; tento region začíná u genu kódujícího protein L33 a končí u genu kódujícího protein S9. Šipky znázorňují promotory, čárky s černou kulatou značkou znázorňují místa terminace transkripce (Sonenshein *et al.*, 2002; obrázek upraven pro potřeby této práce).

5.2 Streptomycinový operon *B. subtilis*

Streptomycinový operon (*str* operon) patří u prokaryont do skupiny vysoce konzervovaných operonů (Itoh *et al.*, 1999; Koonin & Galperin, 1997). Název tohoto operonu byl odvozen od rezistence ke streptomycinu, jejíž podstatou je jediná aminokyselinová záměna v genu *rpsL*, který je součástí *str* operonu. Nejvíce znalostí o tomto operonu bylo donedávna známých především ze studia *E. coli*. U této bakterie se *str* operon skládá ze čtyř genů. Jedná se o geny *rpsL* (kódující ribosomální protein S12), *rpsG* (kódující ribosomální protein S7), *fus* (kódující elongační faktor EF-G) a gen *tufA* (kódující elongační faktor EF-Tu). Transkripce *str* operonu je u *E. coli* řízena z hlavního promotoru, který se nachází na 5' konci operonu před jeho prvním genem *rpsL* a dále ze dvou dalších promotorů, které obklopují gen *fus*. Všechny zmíněné geny, které jsou součástí *str* operonu, u *E. coli* patří mezi nepostradatelné geny, jejichž produkty zastávají důležité buněčné funkce.

Ribosomální protein S12 kódovaný genem *rpsL* je strukturální součástí rozhraní malé podjednotky. Bylo zjištěno, že svou funkcí společně s proteinem S13 napomáhá EF-G v translokaci ribosomu během translace (Cukras *et al.*, 2003). Jediná aminokyselinová záměna v sekvenci S12 způsobuje rezistenci bakterie *B. subtilis* ke streptomycinu (Hosoya *et al.*, 1998).

Ribosomální protein S7 je kódován genem *rpsG*. Ve spolupráci s proteinem S4 iniciuje sestavování malé ribosomální podjednotky, jejíž je součástí. Protein S7 (podobně jako několik dalších ribosomálních proteinů) nese vazebné místo pro 16S rRNA (Nowotny & Nierhaus, 1988; Golovin *et al.*, 2006).

Elongační faktor EF-G, který kóduje gen *fus* se uplatňuje v translaci během translokace ribosomu, neboť je hlavním proteinem, který tento proces řídí.

Elongační faktor EF-Tu je kódován genem *tufA*. U *B. subtilis* se jedná o jediný gen kódující tento faktor. U *E. coli* se vyskytuje ještě kopie tohoto genu, která má stejnou funkci a nese název *tufB*. V případě dostatku živin a optimálního růstu bakteriální kultury patří EF-Tu mezi nejhojnější buněčné proteiny. Jeho koncentrace dosahuje až desetinásobku koncentrace ribosomů, což je více jak 700000 molekul EF-Tu v rámci jediné buňky (Furano, 1975). Avšak koncentrace EF-Tu v buňce je velmi proměnlivá, podobně jako koncentrace

ribosomů je silně závislá na rychlosti růstu bakteriální kultury. Hlavní úloha EF-Tu je v translaci. EF-Tu váže GTP a zodpovídá za transport molekul aminoacyl-tRNA do A místa na ribosomu při dekódování mRNA (Krab & Parmeggiani, 1998). GTP je následně hydrolyzováno na GDP a fosfát. Výměna GDP za GTP probíhá v EF-Tu již v režii jiného elongačního faktoru EF-Ts, který se v buňce vyskytuje pouze v jedné desetině koncentrace EF-Tu.

Již před mnoha lety bylo zjištěno, že protein EF-Tu je schopen tvorby filamentů *in vitro* (Beck *et al.*, 1978) a na základě několika hypotéz proto existuje představa, že by EF-Tu mohl fungovat také jako součást aparátu zodpovědného za tvorbu bakteriálního cytoskeletu. Tuto hypotézu potvrzují teprve nedávno zjištěné výsledky, které ukázaly, že EF-Tu v buňce interaguje s cytoskeletálním proteinem MreB, který má hlavní podíl v tvorbě buněčného tvaru *B. subtilis*. EF-Tu se tak zřejmě kromě hlavní úlohy v translaci také podílí na tvorbě tyčinkovitého tvaru bakterií *B. subtilis* (Defeu Soufo *et al.*, 2010).

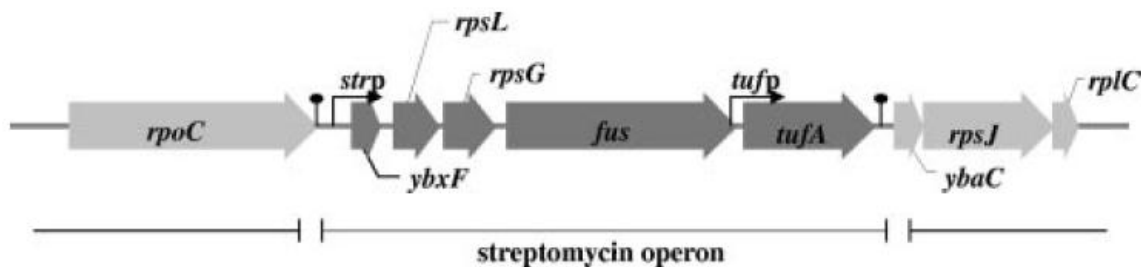
Na základě studií, které byly v naší laboratoři v minulých letech provedeny, bylo zjištěno, že *str* operon se u dvou druhů rodu *Bacillus* (*B. stearothermophilus* a *B. subtilis*) skládá z pěti genů, na rozdíl od tradičního počtu čtyř genů *str* operonu u *E. coli* (Krásný *et al.*, 1998 a 2000). Bylo zjištěno, že u těchto dvou gram pozitivních organismů je *str* operon na 5' konci prodloužen o gen *ybxF*, který předchází genu *rpsL* (obr. 11, str. 36). Jednalo se o výjimečné zjištění, neboť všechny doposud zmapované *str* operony [s výjimkou genomu archebakterie *Methanococcus vannielii*, (Lechner *et al.*, 1989)] fungovaly jako transkripční jednotky skládající se pouze ze čtyř genů (Bork *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999; Lathe III *et al.*, 2000). Následující fakta o genu *ybxF* nás vedla k podrobnější analýze tohoto genu i proteinu YbxF, který tento gen kóduje:

- (i) gen *ybxF* kóduje protein YbxF, jehož funkce nebyla doposud objasněna ani u jednoho ze dvou zmiňovaných ani žádných jiných gram pozitivních bakteriálních druhů
- (ii) dle údajů v genomových databázích neexistuje u gram negativních bakterií žádný ortholog genu *ybxF*
- (iii) transkript genu *ybxF* je součástí polycistronní mRNA odpovídající transkriptu všech genů *str* operonu, avšak byl pozorován i jako samostatná, *ybxF* specifická mRNA (Krásný *et al.*, 2000)

Sekvenci *str* operonu obou gram pozitivních bakterií předchází mezigenová oblast o délce 136 nukleotidů, která zahrnuje terminátor ukončující transkripci předcházejícího genu *rpoC*, který kóduje podjednotku β' RNAP (Yasumoto *et al.*, 1996). V oblasti za *str* operonem se nachází gen *ybaC*. Protein YbaC, který tento gen kóduje je strukturně podobný prolinové iminopeptidáze. Jeho funkce taktéž není známa.

Z celkového počtu 4100 kódujících sekvencí u *B. subtilis* byla možná funkce doposud přiřazena pouze 2300 genům a to pomocí genetických a biochemických studií a sekvenčních podobností se známými proteiny. Přesná funkce nebyla doposud určena přibližně u 1800 genů (Ogasawara, 2000; Ishii *et al.*, 2001). Do této obsáhlé skupiny neznámých genů patří i gen *ybxF*, jemuž se věnuje tato část práce.

Byl zjišťován také minimální počet genů, které jsou za daných podmínek pro *B. subtilis* nepostradatelné (Kobayashi *et al.*, 2003). Z celkového počtu 4100 genů u *B. subtilis* bylo určeno celkem 271 esenciálních genů. Avšak postavení genu *ybxF* nebylo v této obsáhlé práci diskutováno.



Obr. 11: Streptomycinový operon *B. subtilis* (Krásný *et al.*, 2000). Geny, které jsou součástí *str* operonu, jsou označeny tmavě šedou barvou; černé šipky znázorňují promotory; čárky s černou kulatou značkou znázorňují sekvence terminátoru.

5.3 Gen *ybxF*

Gen *ybxF* kóduje u *B. subtilis* protein o velikosti 82 aminokyselin, molekulové hmotnosti 8325 Da a bazickém pI 9,51. Jeho aminokyselinová sekvence je z 57 % totožná s YbxF u *B. stearothermophilus*. Gen *ybxF* je součástí genomů více jak 20 dalších mikroorganismů. Jedná se například o *Bacillus halodurans*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium acetobutylicum* či *Staphylococcus aureus* (Gupta, 1998; Takami *et al.*, 1999). Protein YbxF

vykazuje částečnou homologii s eukaryotickým ribosomálním proteinem L30. Jeho úsek dlouhý 32 aminokyselin vykazuje 41 % aminokyselinovou totožnost a 82 % aminokyselinovou podobnost s YbxF *B. subtilis*. Součástí tohoto úseku je také RNA vazebný motiv, který byl primárně objeven u kvasinkového translačního terminačního supresoru SUP1, u jeho příbuzného proteinu DOM34 a jeho pseudogenového homologu (Koonin *et al.*, 1994). Tento motiv byl později nalezen i u dalších bílkovin, které se dále rozdělují do 4 skupin. Patří sem eukaryotické a archaeální ribosomální proteiny L7ae/L7a; L30e; S17e a s ním SUP1; protein kódovaný genem *rimK*, který je zodpovědný za modifikace ribosomálního proteinu S6 u *E. coli*. U eukaryont se tyto proteiny nacházejí například u rodů *Arabidopsis*, *Saccharomyces*, *Xenopus*, *Coenorhabditis*, *Trypanosoma* a také u člověka.

Z celé této rozsáhlé skupiny proteinů byla přesná funkce určena pouze u proteinu L7ae/HMS6 archebakterie *Haloarcula marismortui*. Tento protein o velikosti 116 aminokyselin obsahuje zmiňovaný RNA vazebný motiv a jeho sekvence vykazuje 32 % totožnost s YbxF u *B. subtilis*, což je nejvyšší homologie, která byla nalezena mezi sekvencemi všech dostupných organismů. Z hlediska funkce tohoto proteinu bylo zjištěno, že je součástí velké ribosomální podjednotky jako jeden z proteinů na jejím povrchu. Jeho schopnost vázat 23S rRNA je ale velice slabá (Ban *et al.*, 2000). Avšak jeho pI = 4 je v porovnání s pI YbxF velice kyselé.

Lidský a krysí jaterní protein L30e, který je součástí výše zmíněné skupiny proteinů s motivem pro vazbu RNA se skládá ze 114 aminokyselin a vykazuje 22 % totožnost s YbxF (Boor *et al.*, 1995; Mao & Williamson, 1999). Ribosomální proteiny L30e mají bazické pI podobné proteinu YbxF. Tato fakta podporují hypotézu, že by gen *ybxF* mohl kódovat protein asociovaný s ribosomem. V seznamech dosud známých ribosomálních proteinů *B. stearothermophilus* a *B. subtilis* však nebyl nalezen žádný homolog proteinů L7ae nebo L30e.

Jiné než ribosomální využití proteinu YbxF předurčují výsledky získané z analýzy používání kodónů všech genů *str* operonu (Nitschké *et al.*, 1998). Podle této analýzy se geny *rpsL*, *rpsG*, *fus* a *tuf* v evoluci pravděpodobně vyvíjely pod stejným selekčním tlakem, zatímco gen *ybxF* se stal součástí *str* operonu zřejmě až v okamžiku, kdy produkty ostatních genů operonu již byly funkční a účastnily se bakteriální translace (Krásný *et al.*, 2000).

5.4 Transkripce *str* operonu

Str operon je u *B. subtilis* a *B. stearothermophilus* přepisován ze dvou promotorů. Prvním, hlavním promotorem je *Pstr*, který se nachází v oblasti před genem *ybxF*. Druhý, *tuf* specifický promotor *Ptuf* se nachází před genem *tuf* a řídí přímo transkripci tohoto genu (Krásný *et al.*, 1998 a 2000). Z hlavního promotoru *Pstr* vzniká dlouhý polycistronní transkript a na základě parciální transkripční terminace také krátký transkript odpovídající mRNA pouze z genu *ybxF*. Mechanismus terminace transkripce za genem *ybxF* není doposud známý. Z promotoru *Ptuf* vzniká transkript, který je specifický pro gen *tuf*.

Během studia transkripce *str* operonu byla analyzována také síla obou promotorů. Z této studie vyšla najevo přibližně 20x větší účinnost promotoru *Ptuf* oproti hlavnímu promotoru *Pstr*. Podstatou takto rozdílné síly promotorů jsou dva *cis* elementy působící z hlediska síly opačně na oba promotory. Takzvaný IR element („inhibitory region“) zeslabující účinnost hlavního promotoru *Pstr* byl objeven v mezigenové oblasti *rpoC – ybxF*. Naopak před promotorem *Ptuf* se nachází krátká oblast bohatá na páry adeninu s thyminem, která účinek tohoto promotoru mnohonásobně zesiluje (Krásný *et al.*, 2000). Tímto způsobem je pravděpodobně docíleno řádově rozdílné aktivity promotorů *Ptuf* a *Pstr*, což má fyziologický význam:

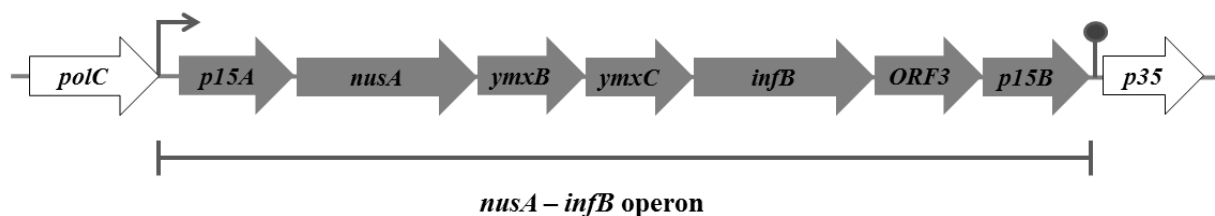
Aktivita obou promotorů koreluje s množstvím bílkovinných produktů genů v buňce. Poměr koncentrací EF-G/EF-Tu \cong 1:9 byl zjištěn v *B. stearothermophilus* (Krásný *et al.*, 2000) a v *B. subtilis* (Yasumoto *et al.*, 1996). Ještě dříve byl zjištěn podobný poměr 1:10 ve prospěch EF-Tu v *Escherichia coli* (Young & Furano, 1981).

5.5 Gen *ymxC*, paralog genu *ybxF* v *B. subtilis*

Gen *ybxF* obsahuje v genomu *B. subtilis* paralogní sekvenci. Jedná se o gen *ymxC* (alternativní název *ylxQ*), který se nachází v *nusA-infB* operonu (obr. 12, str. 39). Funkce proteinu, který tento gen kóduje, taktéž není známa (Shazand *et al.*, 1993). Operon *nusA-infB* se skládá ze sedmi genů. Jeho 5' konec sousedí s genem *polC*, který u *B. subtilis* kóduje jednu z podjednotek DNA polymerázy III (Hammond *et al.*, 1991). Prvním genem operonu

je *p15A*, jehož funkce není známa ani u jeho homologu v *E. coli*. Následujícím genem je *nusA*, který kóduje esenciální transkripční terminační faktor. Dále se v operonu nacházejí geny *ymxB* a *ymxC* (= *ylxQ*). U obou genů není známa jejich funkce. Gen *ymxC* je paralogem genu *ybxF*. Oba proteiny, které *ymxC* a *ybxF* kódují, patří do stejné skupiny proteinů se specifickým RNA vazebným motivem (Koonin *et al.*, 1994). Molekulová hmotnost proteinu YmxC je 11046 Da a skládá se ze 100 aminokyselin. U gram negativních bakterií neexistuje homolog ani jednoho z genů. Je pravděpodobné, že gen *ymxC* vznikl pouhou duplikací genu *ybxF* či naopak. Další důležitou součástí *nusA - infB* operonu je gen *infB*, který kóduje translační iniciační faktor IF2. Ten je opět jedním z esenciálních proteinů. Je nepostradatelný pro správný chod bakteriální translace (Shazand *et al.*, 1990). Z hlediska našeho studia je zajímavé, že protein IF2 vykazuje částečnou homologii s elongačními faktory EF-G a EF-Tu, které jsou umístěny ve *str* operonu za genem *ybxF*. Posledními dvěma členy *nusA - infB* operonu jsou ORF3 a gen *p15B*. Funkce obou těchto genů není známa.

Transkripce *nusA-infB* operonu probíhá podstatně jednodušším způsobem nežli transkripce *str* operonu. Je zde jediný promotor, který se nachází před genem *p15A* na samotném začátku operonu a transkripcí tak vzniká jediný polycistronní transkript, který představuje mRNA všech genů operonu. Za genem *p15B* byla identifikována sekvence zastávající funkci transkripčního terminátoru (Shazand *et al.*, 1993).



Obr. 12: Operon *NusA-infB* u *B. subtilis*. Jednotlivé geny, které jsou součástí operonu, jsou označeny tmavě šedou barvou; šipka stejné barvy označuje promotor; čárka s kruhovou značkou označuje terminátor transkripce; okolní geny jsou znázorněny bílou barvou v tmavém rámečku.

Přístroje, materiál a metody

1. Přístroje

1.1 Centrifugy

Beckman L8-80 Ultracentrifuge (USA) – vakuová chlazená centrifuga

Beckman J2-21M (USA) - rotor JA 14 (6 kyvet o objemu 250 ml s maximálním odstředivým zrychlením 30100 x g), rotor JA 20 (8 kyvet o objemu 50 ml s maximálním odstředivým zrychlením 48400 x g)

Heraeus Cryofuge 8000 (Německo) - chlazená centrifuga určená pro kyvety o objemu až 6 l s výkyvnými rotory a maximálním odstředivým zrychlením 8000 x g

Heraeus Christ Biofuge A (Německo) - nechlazená mikrocentrifuga pro 24 1,5 ml zkumavek s maximálním odstředivým zrychlením 15000 x g

Ultracentrifuga Beckman Optima L90K (USA) – rotor SW41 Ti (maximální zrychlení 288000 x g)

Universal 16 R Hettich (Německo) - chlazená mikrocentrifuga s maximálním odstředivým zrychlením 20000 x g

Roth Corp. (Německo) - stolní centrifuga na 1,5 ml zkumavky

1.2 Elektroforézy

Vertikální elektroforéza OWL P10DS (Anglie) – elektroforéza pro polyakrylamidové gely

OWL (Anglie) - horizontální agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza (ČR)

Mini-Protean III - Bio-Rad (USA) – vertikální elektroforéza proteinů

Elektroforetické zdroje (USA) - BIO-RAD model 500/200 a model PAC 3000

1.3 Inkubátory a třepačky

Biological Termostat BT 120 (ČR) - inkubace buněčných kultur na agarových médiích v Petriho miskách

Elpan Water Bath Shaker type 357 (Polsko) - inkubace buněčných kultur při izolačních metodách

Eppendorf Termostat 5320 (Německo) - pro inkubace roztoků (např. při štěpení RE)

IKA HS 250 Basic (Německo) – stolní třepačka

Incubator Shaker Model G 25, New Brunswick Scientific (USA) - inkubace buněčných kultur v tekutých médiích

Multishaker PSU 20 Biosan (Litva) – přenosná stolní třepačka

Termoblok SBH 130D Stuart (Anglie) – bloková lázeň s nastavitelnou teplotou

1.4 Další přístroje

Analytické váhy Kern ABJ a přesné váhy Kern EG (Německo)

Denzitometr - Bio-Rad Molecular Imager FX (USA) a kazeta s expoziční fólií BAS-MS2040 Fuji (Japonsko)

Geigerův-Müllerův počítač – mini monitor Series 900 (Anglie)

Nanodrop – Thermo Scientific (USA)

Spektrofotometr – Shimadzu UV 1601 (Japonsko)

PCR cyclery – MJ Research PTC 100 a PTC 200 (USA)

qPCR cycler – Eppendorf Realplex⁴ (USA)

Sonikační zařízení – UP200S (Německo)

Sušička gelů Biometra D 62 – Schoeller (Německo)

Transiluminátor UVT-20M Herolab, 312 nm (Německo)

Vakuová pumpa - KNFLAB Laboport (Německo/USA)

2. Materiál

[α - ^{32}P] UTP (MGP Zlín)

[^{32}P]- H_3PO_4 Phosporus 32 (MGP Zlín)

2-merkapt ethanol (Serva, USA)

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Promega, USA)

Adenin (Lachema, ČR)

Agar pro pevné půdy (Lachema, ČR)

Agaróza pro molekulární biologii (Sigma, Německo; Lachema, ČR)

Aqua pro injectione biotika (Biotika, SR)

Akrylamid (Serva, USA)

Aminokyseliny (AppliChem, Německo)

Amoniumpersulfát (Serva, USA)

Ampicilin (Biotika, SR)

Bromphenol blue (Serva, USA)

Casamino acids (Difco, USA)

Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, USA)

Decoyinine (Biomol, USA)

dNTP (NTP) – ATP, CTP, GTP, UTP, TTP (Roche, USA)

EDTA (chelaton III, Lachema, ČR)

Erythromycin (Sigma, Německo)

Glycin (Serva, USA)

Chloramphenicol (Sigma, Německo)

Izopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) (Sigma, Německo)

Lincomycin (Sigma, Německo)

Lysozym (Serva, USA)

N, N, N', N' - tetramethylethyldiamine (TEMED) (LKB, Švédsko)

N, N' - methylenbisacrylamid (Serva, USA)

PCR enzymy - Expand High Fidelity PCR System (Roche, USA), Pfx DNA polymerase (Invitrogene, USA), Tth polymerase (Biotools, Kanada), Taq polymerase (Invitrogene, USA)

Restrikční endonukleázy (RE) – *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Not*I, *Sal*I, *Xho*I
(TaKaRa, Japonsko)

Reverzní transkriptáza – M-MLV (Promega, USA)

RNA polymeráza - holoenzym pocházející z *E. coli* (Epicentre Biotechnologies, USA)

RNáza A (Serva, USA)

SDS (Serva, USA)

Spectinomycin (Sigma, Německo)

Streptomycin (Grünenthal, Německo)

Tris (Serva, USA)

Trypton (Oxoid, Anglie)

Yeast extract (Oxoid, Anglie)

3. Metody

3.1 Bakteriální kmeny a plazmidové konstrukty

Kmeny *B. subtilis* použité v této práci jsou uvedeny v tabulce 1 (str. 44). Příprava plazmidových konstruktů probíhala v *E. coli* v kmeni DH5a. Seznam plazmidových konstruktů je uveden v tabulce 2 (str. 45).

Bakteriální kmen	Genotyp	Původ
<i>B. subtilis</i>		
MH5636	<i>rpoC</i> -His10	Qi & Hulett, 1998
MO1099	<i>trpC2 pheA1 amyE::MLS</i>	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1996
RLG6943	MO1099 <i>amyE::CmrrnO P2 (-77/+50)-lacZ</i>	Krásný & Gourse, 2004
RLG7553	MO1099 <i>amyE::CmrrnB P2 (-38/+1)-lacZ</i>	Krásný & Gourse, 2004
RLG7554	MO1099 <i>amyE::CmrrnB P1 (-39/+1)-lacZ</i>	Krásný & Gourse, 2004
RLG7555	MO1099 <i>amyE::CmPveg (-38/-1, +1G)-lacZ</i>	Krásný & Gourse, 2004
LK606	MO1099 <i>amyE::CmPveg-10DBP1-lacZ</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2011
LK607	MO1099 <i>amyE::CmrrnB P1-10Dveg-lacZ</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2011
168	prototrofní parentální kmen	laboratorní kmen
168 <i>trp</i>	<i>trpC2</i>	Alison Hunt
ALMT	<i>purB6 leuA8 metB5 thr-5</i>	Fučík <i>et al.</i> , 1982
ALMT <i>str</i>	<i>purB6 leuA8 metB5 thr-5 strA1</i>	Fučík <i>et al.</i> , 1982
168 Δ <i>ybxF cat</i>	Δ <i>ybxF Cm^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
168 Δ <i>ybxF cat str</i>	Δ <i>ybxF Cm^R Str^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
ALMT Δ <i>ybxF cat</i>	<i>purB6 leuA8 metB5 thr-5 ΔybxF Cm^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
ALMT Δ <i>ybxF cat str</i>	<i>purB6 leuA8 metB5 thr-5 ΔybxF Cm^R Str^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
Co1	<i>amyE::cat Cm^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
Co2	<i>purB6 leuA8 metB5 thr-5 amyE::cat Cm^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
Co3	<i>purB6 leuA8 metB5 thr-5 strA1 amyE::cat Cm^R Str^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
168 Δ <i>ymxC spc</i>	Δ <i>ymxC Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
168 Δ <i>ybxF cat ΔymxC spc</i>	Δ <i>ybxF Cm^R ΔymxC Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
I (<i>ybxF⁺, ybxF-gfp</i>)	<i>trpC2 ybxF⁺ amyE::ybxF-gfp Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
II (Δ <i>ybxF, ybxF-gfp</i>)	<i>trpC2 ΔybxF Cm^R amyE::ybxF-gfp Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
III (<i>ybxF⁺, gfp</i>)	<i>trpC2 ybxF⁺ amyE::gfp Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
IV (Δ <i>ybxF, gfp</i>)	<i>trpC2 ΔybxF Cm^R amyE::gfp Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
V (Δ <i>ybxF, ybxF K17A-gfp</i>)	<i>trpC2 ΔybxF Cm^R amyE::ybxF K17A-gfp Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
VI (Δ <i>ybxF, ybxF K21A-gfp</i>)	<i>trpC2 ΔybxF Cm^R amyE::ybxF K21A-gfp Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
VII (Δ <i>ybxF, ybxF K24A-gfp</i>)	<i>trpC2 ΔybxF Cm^R amyE::ybxF K24A-gfp Spc^R</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i>		
LK22	pCD2 (<i>B. subtilis sigA</i>)	Juang & Helmann, 1994
RLG6924	pDG3661	Krásný & Gourse, 2004

Tab.1: Seznam kmenů *B. subtilis* a *E. coli*.

Plazmidy	Charakteristika	Původ
pRLG770	Vektor pro testy promotorů	Ross <i>et al.</i> , 1990
pRLG6555	pRLG770 s <i>Eco-rnB</i> P1(-66/+9)	Barker & Gourse 2001
pLK1	pRLG770 s <i>Pveg</i> (-38/-1, +1G), promotorový konstrukt #1	Krásný & Gourse 2004
pLK2	pRLG770 s <i>Pveg</i> +1=8, promotorový konstrukt #2	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK3	pRLG770 s <i>PvegDiscBP1</i> , promotorový konstrukt #3	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK4	pRLG770 s <i>Pveg-10DBP1</i> , promotorový konstrukt #4	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK5	pRLG770 s <i>PveghexDBP1</i> , promotorový konstrukt #5	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK6	pRLG770 s <i>PvegSp-10DBP1</i> , promotorový konstrukt #6	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK7	pRLG770 s <i>rnB</i> P1 (-39/+1), promotorový konstrukt #7	Krásný & Gourse 2004
pLK8	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-39to-2+1G=7, promotorový konstrukt #8	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK9	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-10Dveg, promotorový konstrukt #9	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK10	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-5TtoA, promotorový konstrukt #10	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK11	pRLG770 s <i>Pveg-4AtoT</i> , promotorový konstrukt #11	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK12	pRLG770 s <i>Pveg-10BP1+1=8G-5AtoT</i> , promotorový konstr. #12	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK13	pRLG770 s <i>Pveg-10BP1</i> , promotorový konstrukt #13	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK14	pRLG770 s <i>rnA</i> P1 (-39/+1), promotorový konstrukt #14	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK15	pRLG770 s <i>Pveg-10DAP1</i> , promotorový konstrukt #15	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK16	pRLG770 s <i>rnA</i> P1-10Dveg, promotorový konstrukt #16	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK17	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-10DAP1, promotorový konstrukt #17	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK18	pRLG770 s <i>rnJ</i> P1 (-39/+1), promotorový konstrukt #18	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK19	pRLG770 s <i>Pveg-10DJP1</i> , promotorový konstrukt #19	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK20	pRLG770 s <i>rnJ</i> P1-10Dveg, promotorový konstrukt #20	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK21	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-10DJP1, promotorový konstrukt #21	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK22	pRLG770 s <i>Pilv</i> (-39/+1, +1G), promotorový konstrukt #22	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK23	pRLG770 s <i>Pveg-10Dilv</i> , promoter construct #23	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK24	pRLG770 s <i>Pilv-10Dveg</i> , promotorový konstrukt #24	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK25	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-10Dilv, promotorový konstrukt #25	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK26	pRLG770 s <i>PgcaD</i> (-39/+1), promotorový konstrukt #26	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK27	pRLG770 s <i>Pveg-10DgcaD</i> , promotorový konstrukt #27	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK28	pRLG770 s <i>PgcaD-10Dveg</i> , promotorový konstrukt #28	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK29	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-10DgcaD, promotorový konstrukt #29	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK30	pRLG770 s <i>PinfC</i> (-39/+1), promotorový konstrukt #30	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK31	pRLG770 s <i>Pveg-10DinfC</i> , promotorový konstrukt #31	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK32	pRLG770 s <i>PinfC-10Dveg</i> , promotorový konstrukt #32	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK33	pRLG770 s <i>rnB</i> P1-10DinfC, promotorový konstrukt #33	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK34	pRLG770 s <i>rnA</i> P1 long (-150/+50), promotorový konstrukt #34	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK37	pRLG770 s <i>rnJ</i> P1 long (-150/+50), promotorový konstrukt #37	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK541	pDG3661 s <i>rnB</i> P1-10Dveg	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pLK564	pDG3661 s <i>Pveg-10DBP1</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2011
pUC18	vektor pro přípravu konstruktů k inaktivaci v <i>B. subtilis</i> (2686 bp)	komerční zdroj
pDG1728	vektor pro přípravu genu <i>spc</i> pomocí PCR (10776 bp)	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1996
pCPP-31	vektor pro přípravu konstruktů k inaktivaci v <i>B. subtilis</i> (5620 bp)	Krásný <i>et al.</i> , 2000
pGEX-5X3	vektor pro přípravu konstruktů k inaktivaci v <i>B. subtilis</i> (4974 bp)	komerční zdroj
pDG1662	integrační vektor s kazetou CAT (6982 bp)	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1996
pYBXFK	pUC18 s konstr. pro inaktivaci <i>ybxF</i> (5485 bp)	Sojka <i>et al.</i> , 2007
pYBXFKs	pUC18 s konstr. pro inaktivaci <i>ybxF</i> – <i>rpsL</i> s mut <i>strA1</i> (5485 bp)	Sojka <i>et al.</i> , 2007
pYMXCK	pGEX-5X3 s konstruktem pro inaktivaci <i>ymxC</i> (7759 bp)	Sojka <i>et al.</i> , 2007
pSG1154	vektor pro fúze genů s GFP (7600 bp)	Lewis & Marston, 1999
pSG1154F11	pSG1154 s genem <i>ybxF</i> fúzovaným na <i>gfp</i>	Sojka <i>et al.</i> , 2007
pSG1154F11_K17A	pSG1154 s mutovaným genem <i>ybxF</i> fúzovaným s <i>gfp</i> (7843 bp)	Sojka <i>et al.</i> , 2007
pSG1154F11_K21A	pSG1154 s mutovaným genem <i>ybxF</i> fúzovaným s <i>gfp</i> (7843 bp)	Sojka <i>et al.</i> , 2007
pSG1154F11_K24A	pSG1154 s mutovaným genem <i>ybxF</i> fúzovaným s <i>gfp</i> (7843 bp)	Sojka <i>et al.</i> , 2007

Tab. 2: Seznam plazmidových konstruktů.

Promotorové konstrukty pro transkripci in vitro. Veškeré promotorové konstrukty testované v transkripci *in vitro* byly připraveny na základě promotorového vektoru pRLG770 (Ross *et al.*, 1990). Transkripty ze všech testovaných promotorů měly identickou délku (145 nt) a končily v místě definovaného terminátoru. Promotorové konstrukty byly vytvořeny pomocí komplementárních jednovláknových oligonukleotidů s přesahujícími konci. Sekvence na koncích dvou na sebe navázaných komplementárních oligonukleotidů tak již přímo odpovídala sekvenci vzniklé štěpením RE *EcoRI* a *HindIII*. Inzerty tak mohly být přímo ligovány (bez předešlého štěpení) do předem připraveného plazmidu pRLG770 štěpeného pomocí RE *EcoRI* a *HindIII*. Všechny konstrukty byly ověřeny sekvenací.

Promotorové konstrukty pro měření aktivity promotorů in vivo. Integrační plazmid pRLG3661 (Krásný & Gourse, 2004) byl využit pro přípravu fúzí promotorových sekvencí s genem *lacZ* za účelem testování promotorové aktivity *in vivo*. Promotorové fragmenty byly do vektoru vloženy pomocí RE *EcoRI* a *HindIII* (byl použit identický postup jako během přípravy plazmidových konstruktů pro transkripci *in vitro*). Za sekvencí každého z promotorů následovala vždy sekvence TCT, čímž byla vyloučena možnost výskytu adeninu v blízkosti pozice +1 (vyloučení možnosti iniciace transkripce pomocí ATP). Za sekvencí TCT následovalo cílové místo pro RE *HindIII* a sekvence genu *lacZ* (Krásný & Gourse, 2004). Všechny konstrukty byly ověřeny sekvenací. Promotorové konstrukty byly integrovány pomocí dvojitého „crossing over“ do místa *amyE* v chromozomu *B. subtilis*. Rekombinantní klony byly selektovány na rezistenci k chloramfenikolu (5 µg/ml) a senzitivitu k MLS (erytromycin 1 µg/ml a lincomycin 25 µg/ml), (Guérout-Fleury *et al.*, 1996).

Konstrukty pro inaktivaci genu *ybxF*. Fragment obklopující sekvenci genu *ybxF* (1081 bp z každé strany *ybxF*) byl připraven v PCR reakci pomocí oligonukleotidů s přesahujícími konci (*K01E*, *K02*, *K16* a *K04E*; tabulka 3, strana 47) a templátové DNA izolované z *B. subtilis*. Gen *cat* byl amplifikován pomocí oligonukleotidů *K05* a *K09* (tab. 3, str. 47) a templátové DNA tvořené plazmidem pCPP31. Každý z oligonukleotidů obsahoval na svém 5' konci přesahující sekvenci o délce 20 nukleotidů, čímž došlo během následné PCR reakce (při tzv. „annealing“) ke spojení všech fragmentů do jednoho celku. Použitím

koncových oligonukleotidů *K01E* a *K04E* byl celkový fragment (2772 bp) amplifikován v další PCR reakci a pomocí RE *EcoRI* byl vložen do plazmidu pUC18. Takto připravené plazmidové konstrukty pYBXFK a pYBXFKs (tab. 2, str. 45) byly použity jako donorová DNA pro transformaci kmenů *B. subtilis* 168 a *B. subtilis* ALMT za vzniku mutantů s vyřazeným genem *ybxF* (168 $\Delta ybxF$ *cat*; 168 $\Delta ybxF$ *cat str*; ALMT $\Delta ybxF$ *cat*; ALMT $\Delta ybxF$ *cat str*; tab. 1, str. 44). Rekombinantní klony *B. subtilis* s vyřazeným genem *ybxF* byly selektovány na rezistenci k chloramfenikolu (5 μ g/ml) anebo na kombinaci rezistence k chloramfenikolu (5 μ g/ml) a streptomycinu (1 mg/ml). Správná integrace konstruktů a samotná inaktivace *ybxF* byla ověřena sekvenací.

Oligonukleotid	sekvence DNA 5' - 3'	RE
<i>30F</i>	CCA CCT GAC GTC TAA GAA ACC	
<i>1620R</i>	GCG CTA CGG CGT TTC ACT TC	
<i>Bilbo</i>	CTT CCA CAG TAG TTC ACC AC	
<i>Frodo</i>	AAGGGTAACTATTGCCGATG	
<i>#103</i>	TCT AAG CTT CTA GGA TCC CC	
<i>#104</i>	GTC GCT TTG AGA GAA GCA CA	
<i>βgalR</i>	CAG TAA CTT CCA CAG TAG TTC ACC AC	
<i>K01E</i>	<u>GGA ATT CCC</u> TCA TGG TGT ATG TAA ACG	<i>EcoRI</i>
<i>K02</i>	TTT GAT ATG CCT CCG AAT TAA CAG GTT TAT TTC GAG CA	
<i>K05</i>	CTC GAA ATA AAC CTG TTA ATT CGG AGG CAT ATC AAA TG	
<i>K09</i>	GAC GCA AAA ACA AAA GTA TAT TAT AAA AGC CAG TCA TTA G	
<i>K16</i>	GAC TGG CTT TTA TAA TAT ACT TTT GTT TTT GCG TCA G	
<i>K04E</i>	<u>GGA ATT CCC</u> TTC CTT ATT AGG AAA TTG	<i>EcoRI</i>
<i>ybxFGFP for</i>	GGG GTA CCT CTT ATG ATA AAG TAT CAC AG	<i>KpnI</i>
<i>ybxFGFP rev</i>	GGG AAT TCT AAA ATA ATG GCA ACA GCG GC	<i>EcoRI</i>
<i>Adaggio</i>	CGG GAT CCG CAC AGA TGA TCC TGA CG	<i>BamHI</i>
<i>Moderato</i>	CCC AAG CTT GAA ACC ATT CCA TTC CAG AC	<i>HindIII</i>
<i>Largo</i>	CCG CTC GAG GAA TAA GCT GAT CAG CTT GC	<i>XhoI</i>
<i>Cappricio</i>	ATA AGA ATG CGG CCG CCT TCA TTA TCA GGC TCT TCG	<i>NotI</i>
<i>Spc for</i>	GTC AGT AAC TTC CAC AGT AGT TC	
<i>Spc rev</i>	<u>GGA TAT CGT</u> GTT TCC ACC ATT TTT TC	<i>EcoRV</i>
<i>lys17 for</i>	ATT ATT GGT ACG GCG CAA ACA GTG	
<i>lys17 rev</i>	CAC TGT TTG CGC CGT ACC AAT AAT	
<i>lys21 for</i>	CAA ACA GTG GCA GCT CTA AAG CG	
<i>lys21 rev</i>	CGC TTT AGA GCT GCC ACT GTT TG	
<i>lys24 for</i>	GTG AAA GCT CTA GCG CGA GGT TCA G	
<i>lys24 rev</i>	CTG AAC CTC GCG CTA GAG CTT TCA C	

Tabulka 3: Sekvence DNA použitých oligonukleotidů (RE označuje restriční endonukleázu; cílová místa pro RE jsou v sekvenci znázorněna podtržením)

Konstrukty pro inaktivaci genu *ymxC*. Gen *spc* včetně oblasti zahrnující polylinker, která mu předchází, byl amplifikován v PCR reakci pomocí oligonukleotidů *Spc for* a *rev* (tab. 3, str. 47). Pomocí RE *Bam*HI a *Eco*RV byl vložen do plazmidu pGEX-5X3 za vzniku konstruktů pGEX-5X3-SPC-1. Oblast předcházející genu *ymxC* (717 bp) byla amplifikována v PCR (oligonukleotidy *Adaggio* a *Moderato*; tab. 3, str. 47) a následně vložena pomocí RE *Bam*HI a *Hind*III do plazmidu pGEX-5X3-SPC-1 za vzniku pGEX-5X3-SPC-2. Oblast za genem *ymxC* (684 bp) byla amplifikována pomocí oligonukleotidů *Largo* a *Cappricio* (tab. 3, str. 47) a vložena pomocí RE *Xho*I a *Not*I do pGEX-5X3-SPC-2 za vzniku finálního konstruktů pYMXCK určeného pro inaktivaci genu *ymxC*. Plazmidem pYMXCK byly transformovány kmeny *B. subtilis* 168 a *B. subtilis* 168 $\Delta ybxF$ *cat* za vzniku kmenů *B. subtilis* 168 $\Delta ymxC$ *spc* a *B. subtilis* 168 $\Delta ybxF$ *cat* $\Delta ymxC$ *spc* (tab. 1, str. 44). Samotné plazmidové konstrukty a stejně tak úspěšná inaktivace genu *ymxC* byla ověřena pomocí PCR a sekvenováním dané oblasti.

Konstrukty pro přípravu fúze *ybxF* s *gfp*. Gen *ybxF* byl amplifikován v PCR reakci pomocí oligonukleotidů *ybxFGFP for* a *rev* (tab. 3, str. 47) a templátové genomové DNA izolované z *B. subtilis* 168. Pomocí RE *Kpn*I a *Eco*RI byl gen vložen do plazmidu pSG1154 za vzniku plazmidového konstruktů pSG1154F11 (fúze 3' konce genu *ybxF* s 5' koncem *gfp*). Konstrukt byl ověřen sekvenací. Takto připraveným konstruktem byl transformován kmen *B. subtilis* 168 a kmeny s inaktivovaným genem *ybxF*. Získané rekombinantní kmeny *B. subtilis* (s konstruktem integrovaným do místa *amyE* v chromozomu) byly selektovány na rezistenci ke spectinomycinu (100 mg/ml); (kmen číslo I; *ybxF*⁺ *ybxF-gfp*), anebo kombinovanou rezistenci k chloramfenikolu (5 μ g/ml) a spektinomycinu (100 mg/ml); (kmen číslo II; $\Delta ybxF$ *ybxF-gfp*). Úspěšná integrace byla ověřena standardním způsobem (Lewis & Marston, 1999) a sekvenací.

Samotný integrační plazmid pSG1154 byl použit pro přípravu kmenů *B. subtilis* číslo III (*ybxF*⁺ *gfp*) a IV ($\Delta ybxF$ *gfp*), které vznikly transformací parentálního kmene *B. subtilis* 168 a kmene *B. subtilis* 168 $\Delta ybxF$ *cat*.

3.2 Média a kultivační podmínky

Kompetentní buňky *E. coli* byly připraveny a následné transformační experimenty byly provedeny metodou teplotního šoku (obojí dle Hanahan, 1983). Kompetentní buňky *B. subtilis* byly připraveny a následné transformační experimenty byly provedeny tak, jak je popsáno v práci Anagnostopoulos & Spizizen, 1961. Selektce transformantů byla prováděna na agarových miskách s médiem LB a specifickými antibiotiky.

Bakteriální kmeny byly kultivovány v médiu LB nebo v definovaném médiu MOPS (50mM MOPS (pH 7.0): 1mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 50 μM MnCl₂, 5 μM FeCl₃, AK [50 μg/ml]; 20 AK – médium označeno jako MOPS 20, a 0.4 % glukóza). Kultivace *B. subtilis* byla prováděna při standardní teplotě 37°C. Pro měření promotorové aktivity během rozrůstání ze stacionární fáze (experiment „outgrowth”) byla bakteriální kultura kultivována v médiu MOPS 20 po celou dobu exponenciální fáze a ještě následně 3 hodiny během stacionární fáze. V časovém bodě 0 byla kultura 10x naředěna do stejného předehřátého média. Pro experimenty, kde byl použit decoyinine byla buněčná kultura kultivována v médiu MOPS 20 do časně exponenciální fáze (OD₆₀₀ ~ 0,3). V bodě 0, po prvním odběru buněčné kultury byl do média přidán decoyinine o finální koncentraci 0,5 mg/ml (Mitani *et al.*, 1977). Zásobní roztok decoyininu (100 mg/ml) byl připraven rozpuštěním v 1 M KOH. V rámci kontrolního experimentu byly buňky vystaveny účinku samotného 1 M KOH, přičemž změna hladiny GTP v buňce nebyla v tomto případě pozorována (data nepublikována).

Funkční analýza mutantů s inaktivovaným genem *ybxF*. Pro funkční analýzu mutantů *B. subtilis* s inaktivovanými geny *ybxF* bylo použito Spizizenovo minimální médium [složení 1 litru média: 2 g (NH₄)₂SO₄, 18,3 g K₂HPO₄ · 3H₂O, 6 g K₂HPO₄, 1 g Na citrát · 2H₂O, 0,2 g MgSO₄ · 7H₂O; pro auxotrofní kmeny byl do média přidán tryptofan (50 μg/ml) a zdroj uhlíku dle potřeby] a Spizizenovo bohaté médium (složení 1 litru média: 25 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt a minimální Spizizenovo médium).

Byla porovnáována růstová rychlost kmenů *B. subtilis* s inaktivovaným genem *ybxF* a kontrolních kmenů *B. subtilis* (Co1 – Co3, tab. 1, str. 44). Růstová rychlost těchto kmenů byla měřena během kultivace v minimálním i bohatém Spizizenově tekutém médiu a na

agarových plotnách, obojí ve 20°C, 37°C a ve 45°C. Dle popsaného protokolu (Schumann *et al.*, 2001) byly provedeny také testy schopnosti sporulace. Senzitivita k inhibitorům byla testována na agarových plotnách v přítomnosti ethanolu (8 – 16 %), nebo 1M NaCl, nebo SDS (0,007 – 0,1 %). Pro testované kmeny byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace streptomycinu (1 mg pro senzitivní kmeny a 3 mg pro rezistentní kmeny). Mezi mutanty a kontrolními kmeny nebyl v žádném z testů zjištěn rozdíl.

3.3 Metody izolace DNA

Genomová DNA *B. subtilis* byla izolována standardním postupem dle Marmur, 1961.

Plazmidová DNA pro účely sekvenování byla izolována pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) dle standardního postupu uvedeného výrobcem. Zdrojem DNA byla noční kultura *E. coli* inkubovaná v 10 ml média LB se specifickým antibiotikem.

Plazmidová DNA pro ostatní účely byla izolována pomocí QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen). Zdrojem DNA byla noční kultura *E. coli* inkubovaná ve 100 ml média LB se specifickým antibiotikem. Izolace byla provedena dle standardního protokolu uváděného výrobcem.

Plazmidy pro použití v transkripční reakci *in vitro* byly navíc purifikovány směsí fenolu a chloroformu. Tento krok je nutný zejména z důvodů odstranění proteinů a především nežádoucích RNáz. V prvním kroku byl k plazmidové DNA přidán jeden objem fenolu (ekvilibrovaný fenol s 0,1 M Tris pH 8, 0,1 % 8-hydroxychinolin, 0,2 % 2-merkptoethanol). Po důkladném promíchání a krátké 5 minutové centrifugaci byla odebrána vodná fáze obsahující plazmidovou DNA a purifikace byla opakována stejným způsobem přidáním jednoho objemu směsi fenolu s chloroformem (1:1) a po centrifugaci a odebrání vodné fáze následně jedním objemem již samotného chloroformu. Vodná fáze byla odebrána a přesrážena standardním postupem pomocí 2,2 objemu 96 % ethanolu v prostředí kyselého 3 M octanu sodného, pH 5,2 (1/10 objemu vzorku). Po centrifugaci (17000 x g, 20 minut, 4°C) a omytí 70 % ethanolem byl pelet usušen a rozpuštěn v 30 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,9. Koncentrace plazmidu byla změřena na spektrofotometru.

3.4 Sekvence DNA

Veškeré konstrukty byly ověřeny sekvenováním. K přípravě sekvenačních produktů byl použit BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Templátem byla zpravidla plazmidová DNA izolovaná pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Každá reakce o objemu 10 μl obsahovala: 7 μl templátové DNA, 2 μl BigDye Terminator a 1 μl specifického sekvenačního oligonukleotidu o koncentraci 10 pmol/ μl . Pro sekvenování promotorových konstruktů vložených do plazmidu pRLG770 byly použity oligonukleotidy *30F* a *1620R* (tab. 3, str. 47). Pro sekvenování promotorových konstruktů vložených do plazmidu pRLG3661 byly použity oligonukleotidy *Bilbo* a *Frodo* (tab. 3, str. 47). Pro sekvenaci ostatních konstruktů byly použity vždy oligonukleotidy specifické pro daný konstrukt (tab. 3, str. 47). Vzorky obsahující sekvenační mix byly následně vloženy do PCR cycleru, kde byl pro amplifikaci použit následující program: 96°C 10 vteřin, 45°C 5 vteřin a 60°C 4 minuty (35 cyklů). Produkty byly následně precipitovány ethanolem v prostředí kyselého octanu sodného dle následujícího postupu:

- ke vzorku bylo přidáno 10 μl 3 M octanu sodného pH 5,2 a 80 μl H₂O
- vzorek byl přenesen do 1,5 ml zkumavky
- ke vzorku byl přidán glykogen (5 μg) a vzorek byl řádně promíchán
- ke vzorku bylo přidáno 300 μl 96 % ethanolu a následovala centrifugace (17000 x g, 20 minut, 4°C)
- pelet byl opláchnut 70 % ethanolem a usušen ve vakuu

Takto připravené sekvenační reakce byly předány do laboratoře sekvenačního servisu (Středisko sekvenování, MBÚ AV ČR). Získané sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas a ClustalX. Každý z vybraných klonů byl uchován ve formě glycerinových konzerv (směs 850 μl buněčné kultury a 150 μl glycerolu) v hlubokomrazícím boxu (-80°C).

3.5 Izolace RNAP z *B. subtilis*

RNAP s navázanou histidinovou značkou byla izolována z kmene *B. subtilis* MH5636 dle protokolu popsaného v Qi & Hulett, 1998. Podjednotka σ^A byla nadprodukována z plazmidu pCD2 (Chang & Doi, 1990) a její izolace byla provedena dle

daného protokolu (Juang & Helmann, 1994). Koncentrace vyizolovaného proteinu byla měřena standardní metodou dle Bradfordové (Bradford, 1976) a protein byl následně analyzován pomocí vertikální SDS polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE; Laemmli, 1970).

Po izolaci RNAP jsme provedli rekonstituci s podjednotkou σ^A . Rekonstituce probíhala v uchovávacím pufru (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 3 mM 2-merkapt ethanol, 50 % glycerol) po dobu 30 minut při teplotě 30°C. Pro každý izolát RNAP jsme nejprve provedli titrační experiment, ve kterém byl stanoven vhodný poměr koncentrací RNAP a podjednotky σ^A , tak aby použitá koncentrace podjednotky σ^A byla pro funkci RNAP saturující.

RNAP z *E. coli* (Holo RNAP) byla zakoupena od firmy Epicentre Biotechnologies®.

3.6 Transkripce *in vitro*

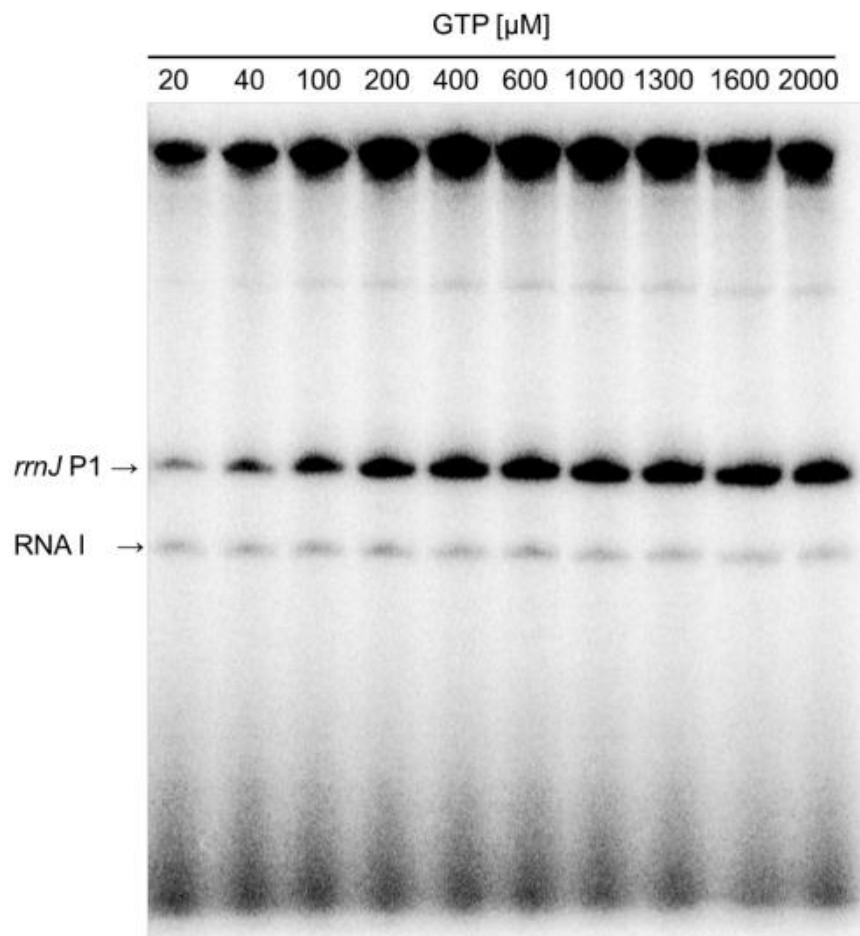
Všechny promotorové sekvence, které byly vloženy do transkripčního plazmidu pRLG770 a následně testovány pomocí transkripce *in vitro* jsou uvedeny v tabulce 2 (str. 45). Každý plazmidový konstrukt jsme před samotným testováním v transkripci *in vitro* analyzovali elektroforeticky, abychom se přesvědčili, že více jak 90 % plazmidu zůstalo v *ccc* formě. Transkripční reakce byly prováděny v objemu o 10 μ l a následujících koncentracích jednotlivých komponentů:

- 30 nM RNAP
- 1 nM plazmidový promotorový konstrukt v *ccc* formě
- 40 mM Tris-HCl pH 8,0
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM DTT
- 0,1 μ g/ml BSA
- 150 mM KCl
- 200 μ M ATP, CTP a GTP (každý)

Pokud byla testována senzitivita promotorů ke koncentraci ATP nebo GTP, rozsah koncentrací uvedených NTP byl 20 – 2000 μ M. Ředící řada GTP (případně ATP) byla předem připravena v 10 zkumavkách o koncentracích 20, 40, 100, 200, 400, 600, 1000, 1300, 1600 a 2000 μ M. UTP byl v každé reakci použit v neznačené (10 μ M) a radioaktivně

značené ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$, 2 μM) formě, kde je α fosfát UTP značený pomocí ^{32}P ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$, 9,25 mBq, dodáváno MGP Zlín).

Takto připravený vzorek byl inkubován 5 minut ve 30°C. Transkripce byla iniciována přidáním 1 μl 300 mM RNAP (finální koncentrace 30 mM). Reakce byla zastavena po 15 minutách inkubace ve 30°C přidáním 10 μl formamidového pufru (95 % formamid, 20 mM EDTA pH 8,0, 0,05 % bromfenolová modř, 0,05 % xylene cyanol) a důkladným promícháním (vortex). 10 μl vzorku bylo analyzováno pomocí elektroforézy v 1 x koncentrovaném pufru TBE (10 x pufr TBE: 0,9 M Tris.HCl, 0,02 M EDTA pH 8,0, 0,9 M kyselina boritá) na akrylamidovém (AA) 7 % gelu (7 % roztok AA v 7 M močovíně a pufru TBE; před nalitím směsi do elektroforézy přidán 10 % APS a TEMED). AA gel byl posléze usušen na sušičce gelů (Biometra D 62) napojené na vakuovou pumpu (KNFLab Laboport). Usušený gel byl vložen do expoziční kazety (Fuji) a byl překryt expoziční fólií absorbující radioaktivní záření pocházející ze vzniklých transkriptů. Po 12 – 15 hodinové expozici byly produkty analyzovány pomocí přístroje Molecular Imager[®] FX (BIO-RAD). Množství transkriptu (univerzální délka 145 nt) produkovaného z testovaného promotoru bylo měřeno pomocí programu ImageQuant (Molecular Dynamics). Obrázek S1 (str. 54) zobrazuje expozici reprezentativního gelu, která byla získána testováním senzitivity promotoru *rrnJ* P1 z *B. subtilis*. Vyhodnocení výsledků bylo prováděno pomocí programu Sigmaplot (Jandel Scientific). Hodnota K_{NTP} byla pro každý promotor stanovena pomocí rovnice: $f = a \times [1 - \exp(-b \times x)]$, kde f = relativní transkripce, x = čas, a , b = konstanty. Hodnota K_{NTP} je silně závislá na použité koncentraci soli a stejně tak na teplotě, při které reakce probíhá. Porovnatelnost hodnot K_{NTP} testovaných promotorů je proto podmíněna přesným dodržáním výše uvedených podmínek transkripční reakce.



Obr. S1: Reprezentativní AA gel zobrazující produkty transkripce *in vitro* řízené z promotoru *rrnJ* P1 (Sojka *et al.*, 2011). Dva hlavní produkty transkripční reakce jsou znázorněny: (i) transkript odpovídající produktu iniciovaného z promotoru *rrnJ* P1 (145 nt) a (ii) transkript iniciovaný z promotoru RNA I (104 nt), který je přirozenou součástí plazmidu pRLG770 a reguluje tak počet kopií plazmidu v buňce (transkripci iniciuje pomocí ATP, ke [GTP] tedy není senzitivní).

3.7 Stabilita otevřených komplexů

Stabilita otevřených transkripčních komplexů byla měřena v transkripční reakci po přidání kompetitoru dle Barker & Gourse, 2001. Použitým kompetitorem byl polyanionický sacharid heparin. Ten se váže na volnou RNAP a je schopen disociovat RNAP z uzavřeného komplexu s promotorem. RNAP ve stavu otevřeného komplexu s promotorem je k heparinu rezistentní. Stabilitu jsme měřili u otevřených komplexů vytvořených mezi RNAP a plazmidovým promotorovým konstruktem v reakci s transkripčním pufrem (stejně složení

jako v klasické transkripci *in vitro*) a 30 mM KCl, po dobu 15 minut při teplotě 30°C. Heparin o koncentraci 0,5 µg/ml byl přidán v čase 0. V časových bodech byly odebrány alikvoty, ke kterým byly přidány všechny čtyři NTP, čímž byla iniciována transkripční reakce. Po 15 minutách byla reakce zastavena přidáním formamidového pufru (složení uvedeno v odstavci popisující transkripci *in vitro*). Produkty byly analyzovány elektroforeticky na 7 % akrylamidovém denaturačním gelu v přítomnosti močoviny (stejným způsobem jako výše popsána analýza produktů transkripce *in vitro*). Množství vzniklých transkriptů, které přesně odpovídá množství vytvořených otevřených komplexů, bylo kvantifikováno v závislosti na čase a vyneseno do grafu pomocí programu SigmaPlot (Jandel Scientific). Poločas rozpadu otevřených komplexů ($t_{1/2}$) byl definován pomocí následující rovnice $f = a \times \exp(-b \times x)$, kde f = relativní transkripce, x = čas, a , b = konstanty.

3.8 Extrakce RNA a reverzní transkripce

Původně bylo měření promotorové aktivity *in vivo* v naší laboratoři prováděno pomocí β galaktozidových assay. Poločas rozpadu mRNA, jejíž syntéza je řízena promotory testovanými v této práci, však odpovídá přibližně 4 minutám. Metoda β galaktozidových assay je tedy pro tyto účely zcela nevhodná. Pro testování promotorové aktivity *in vivo* byl použit identický plazmid pRLG3661, kde byl testovaný promotor fúzován ke genu *lacZ*. Náš další postup byl ale odlišný. Promotorovou aktivitu jsme analyzovali metodou „primer extension“ a navazující RT-qPCR (Krásný & Gourse, 2004). Nejprve jsme izolovali celkovou RNA z exponenciálně rostoucí (nebo stacionární) kultury *B. subtilis*. Specifická část mRNA odpovídající *lacZ* mRNA, jejíž syntéza byla řízena testovaným promotorem byla přepsána v reverzní transkripci do cDNA (pro reverzní transkripci byl použit oligonukleotid *β galR*; tab. 3, str. 47). cDNA byla poté použita jako templát v RT-qPCR reakci. Vzniklé množství RNA (přepsané do cDNA) tedy přímo korelovalo s aktivitou testovaného promotoru.

Před samotným testováním promotorů byla nejprve izolována RNA odpovídající tzv. „recovery marker“ (RM RNA). Jednalo se o specifickou část RNA, jejíž dané množství bylo přidáno ke každému testovanému vzorku před extrakcí RNA, abychom mohli monitorovat případnou degradaci izolované RNA. RM RNA byla izolována z kmene RLG6943 (Krásný

& Gourse, 2004), zde v tab. 1, str. 44. Tato RNA nese sekvenci pro vazbu oligonukleotidu, která je identická se sekvencí oligonukleotidu vázajícího se na sekvenci testované mRNA (oligonukleotid *βgalR*, tab. 3, str. 47). Druhý z oligonukleotidů je ale odlišný a zcela specifický pro RM RNA (oligonukleotid #104, tab. 3, str. 47) a stejně tak produkt amplifikovaný pomocí oligonukleotidů #104 a *βgalR* je delší než testovaná mRNA, tak aby tyto produkty byly od sebe odlišitelné pomocí elektroforézy na polyAA gelu (Josaitis *et al.*, 1995).

Náš postup izolace mRNA nezahrnoval žádné centrifugační kroky, čímž jsme předešli ovlivnění získaných dat způsobené předpokládanou rychlou degradací izolované RNA. 2 ml buněčné kultury byly odebrány v časových bodech a přímo přidány k připravené směsi 3 ml fenolu, 3 ml chloroformu a 500 μl lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM LiCl, 50 mM EDTA pH 8,0 a 5 % SDS). Po okamžitém promíchání (vortex) a přidání RM RNA (25 μl ~ 0,5 μg) byla buněčná suspenze sonikována 1 minutu a přidáním 5 ml H₂O byl navýšen celkový objem vzorku. Následovala centrifugace při 3100 RPM (centrifuga Haereus Cryofuge 8000, rotor 6610), 10 minut, 4°C a odběr vodné fáze do nové směsi fenolu a chloroformu (zde již bez lyzačního pufru). Fenol/chloroformová extrakce byla ještě jednou opakována. Ke 4 ml vodné fáze bylo přidáno 5 μg glykogenu, 0,4 ml 3 M octanu sodného pH 5,2 a 9,68 ml 96 % ethanolu. Po důkladném promíchání byl vzorek uchován v -20°C do druhého dne. Následovala centrifugace při 3100 RPM (centrifuga Haereus Cryofuge 8000, rotor 6610), 30 minut, 4°C. Pelet byl sušen 2 – 3 minuty na vzduchu otočením zkumavek dnem vzhůru a posléze byl rozpuštěn ve 400 μl H₂O. Vzorek byl přenesen do 1,5 ml zkumavek a následovala druhá precipitace ethanolem (40 μl octanu sodného pH 5,2 a 968 μl 96 % ethanolu). Po centrifugaci (17000 x g, 20 minut, 4°C) byl vzorek opláchnut 70 % ethanolem, usušen ve vakuu a rozpuštěn v 50 μl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Následovalo odstranění nežádoucí DNA pomocí „Turbo DNase kit“ (Ambion). Jedna reakce o objemu 20 μl obsahovala 2 μl RNA, 2 μl 10x koncentrovaný pufr, 0,5 μl Turbo DNase a 15,5 μl H₂O. Po 30 minutách inkubace reakčního mixu ve 30°C bylo ke vzorku přidáno 2,2 μl inaktivačního roztoku (součást kitu) a vzorek byl inkubován 2 minuty v pokojové teplotě. Po centrifugaci při 17000 x g, 2 minuty při pokojové teplotě bylo odebráno 15 μl vzorku a uloženo v -20°C pro další použití.

Takto přečištěná RNA byla použita jako templát v reverzní transkripci řízené reverzní transkriptázou M-MLV. Každá reakce o objemu 10 μ l se skládala z 3 μ l přečištěné RNA, 0,5 μ l oligonukleotidu *β galR* (10 pmol/ μ l), 2 μ l 5x koncentrovaného pufru M-MLV a 4,5 μ l H₂O. Vzorky s reakčním mixem byly následně vloženy do PCR cycleru, kde byl použit program PEH („primer extension hybridisation“; 80°C 5 minut, -38°C ~ úbytek o 1°C za 1 minutu). Po ukončení programu PEH bylo ke vzorku přidáno 15 μ l reakčního mixu (6 μ l dNTP, 3 μ l 5x koncentrovaný pufr M-MLV, 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l M-MLV reverzní transkriptáza a 3 μ l H₂O) a následoval program PE („primer extension“; 42°C 30 minut). Výsledná cDNA byla uložena v -20°C a následně byla kvantifikována pomocí RT-qPCR.

V experimentu kdy byla hladina GTP v buňce snižována účinkem decoyininu, byly 2 ml buněčné kultury určené pro izolaci RNA odebrány v časových bodech 0, 3, 6 a 12 minut od přidání decoyininu (finální koncentrace 0,5 mg/ml). Následovala extrakce RNA podle postupu popsaného výše.

3.9 „Real time“ qPCR (RT-qPCR)

cDNA byla použita jako templát v RT-qPCR reakci, která byla řízena polymerázou Taq (Promega). Samotná reakce probíhala v osmimístných stripech (BIO-RAD) v cycleru Realplex⁴ (Eppendorf). Reakční mix o objemu 25 μ l byl připraven z:

- 3 μ l cDNA
- 1 U polymerázy Taq
- 0,2 μ l SYBR green (Molecular Probes)
- 1 x pufr Taq DNA
- 250 μ M dNTP (každý)
- 3 mM MgCl₂
- 0,4 mM oligonukleotidů (každý)

Pro RT-qPCR byly použity dvě kombinace oligonukleotidů: (i) oligonukleotid specifický pro testovanou RNA (#103) v kombinaci s univerzálním reverzním oligonukleotidem *β galR* a (ii) oligonukleotid specifický pro RM RNA (#104) v kombinaci s univerzálním reverzním oligonukleotidem *β galR* (tab. 3, str. 47). Takto připravená reakce byla v cycleru amplifikována ve 40 opakováních pomocí programu: 95°C 15 vteřin, 65°C 20 vteřin, 72°C 30 vteřin. Pro každý vzorek jsme provedli analýzu teploty tání („melting curve

analysis“), abychom potvrdili identitu PCR produktů. V rámci negativních kontrolních reakcí jsme jako templát použili izolovanou RNA (DNázovaná) a zároveň jsme prováděli kontrolní reakce bez templátu (cDNA). Pro kvantifikaci cDNA byla použita metoda ΔC_t (Pfaffl, 2001). Výsledná hodnota byla normalizována k hodnotě získané amplifikací cDNA odpovídající RM RNA a k optické denzitě kultury, z níž byla testovaná RNA izolována.

3.10 Stanovení hladiny GTP u *B. subtilis*

Pro účely izolace GTP z *B. subtilis* jsme inkubovali buněčnou kulturu v médiu MOPS 20 s glukózou (0,4 %) a radioaktivně značenou kyselinou fosforečnou [^{32}P]- H_3PO_4 Phosphorus³², 20 $\mu\text{Ci/ml}$ (MGP Zlín) do časně exponenciální fáze ($\text{OD}_{600} \sim 0,3$). 30 μl buněčné kultury bylo v časových bodech přidáno ke stejnému objemu 13 M kyseliny mravenčí. Směs byla důkladně promíchána a uložena přes noc v -20°C .

V experimentu, kde byla hladina GTP v buňce snižována účinkem decoyininu, byla buněčná kultura určená pro izolaci GTP odebrána v časových bodech 0, 3, 6 a 12 minut od přidání decoyininu (finální koncentrace 0,5 mg/ml). Ihned po odebrání byla kultura přidána ke stejnému objemu 13 M kyseliny mravenčí.

Hladina GTP byla určena metodou vertikální chromatografie na tenké vrstvě. Polyethyleniminové (PEI) desky určené pro chromatografii na tenké vrstvě (TLC plates Polygram[®] CEL 300 PEI od Macherey-Nagel) byly nejdříve promyty vodou (ve vertikální poloze byly umístěny do 1 cm hluboké vodní lázně a voda byla ponechána samovolně vzlínat od spodní ponořené hrany směrem vzhůru) a 15 minut byly sušeny v digestoři. 4 μl radioaktivně značené buněčné kultury byly poté naneseny do předem vyznačeného startovního bodu ve spodní části PEI desky. Po 15 minutách sušení v digestoři byly desky ve vertikální poloze ponořeny svým spodním okrajem asi 0,5 cm hluboko do lázně s 0,85 M KH_2PO_4 , kde byly ponechány až do doby, kdy čelo vzlínajícího 0,85 M KH_2PO_4 dorazilo k horní hraně PEI desky. Po usušení v digestoři byly desky vloženy do expozičních kazet ,a byly exponovány přes noc. Expozice NTP byly analyzovány na přístroji Molecular Imager[®] FX (BIO-RAD) a jejich kvantifikace byla provedena pomocí programu ImageQuant (Molecular Dynamics). Pozice GTP na PEI desce byla určena pomocí komerčně získaného GTP, jehož odpovídající množství bylo na PEI desky naneseno paralelně s buněčnými

izoláty. Tato forma „studeného“ GTP byla detekována pomocí UV světla na transiluminátoru (Schneider *et al.*, 2003).

3.11 Porovnání sekvencí DNA promotorů *rrn* P1 pocházejících z vybraných bakteriálních druhů

Sekvence promotorů uvedených pro porovnání v tab. 5 (str. 84) byly získány z dostupné literatury nebo byly určeny na základě vizuální kontroly sekvence dané oblasti rRNA operonu a daného bakteriálního druhu. Tyto sekvence byly získány z internetové databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Od každého organismu jsme vybrali mezi třemi až pěti promotory *rrn* P1. U některých organismů to nebylo možné, neboť se takový počet promotorů u některých bakterií nevyskytuje. Následně byl jeden typický zástupce promotoru *rrn* P1 (z dostupného počtu pro daný organismus) vybrán do porovnání, které je uvedeno v tabulce 5 (str. 84). V níže uvedené tabulce 4 (str. 59) je pro každý vybraný promotor uveden zdroj, odkud byla sekvence získána (kód NCBI případně reference na literaturu).

Kód	Bakteriální druh	Jméno/NCBI	Reference nebo pozice v genomu
Bsu	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>rrnB</i> P1	Krásný & Gourse, 2004
Ban*	<i>Bacillus anthracis</i>	NC_012659.1	82100-82137
	<i>Bacillus cereus</i>	NC_011969.1	82020-82056
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	NC_008600.1	9085-9123
Bpu	<i>Bacillus pumilus</i>	NC_009848.1	9341-9374
Lmo	<i>Listeria monocytogenes</i>	NC_012488.1	233724-233760
Pae	<i>Paenibacillus sp.</i>	NC_012914	11265-11302
Sau	<i>Staphylococcus aureus</i>	NC_002951.2	2115415-2115452
Lac	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NC_006814	58867-58902
Spn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NC_012468	16392-16427
Cdi	<i>Clostridium difficile</i>	NC_009089.1	10649-10685
Cpe	<i>Clostridium perfringens</i>	NC_008261.1	10030-10065
Tte	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	NC_003869	83637-83673
Mag	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	NC_009497	614890-614927
Upa	<i>Ureaplasma parvum</i>	NC_002162	145150-145186
Msm	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>rrn</i> P1	Gonzalez-y-Merchand <i>et al.</i> , 1996
Sno	<i>Streptomyces nodosus</i>	<i>rrnD</i> P1	Yap & Wang, 1999
Eco	<i>Escherichia coli</i>	<i>rrnB</i> P1	Schneider <i>et al.</i> , 2002
Vch	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>rrnA</i> P1	Aiyar <i>et al.</i> , 2002
Sen	<i>Salmonella enteritica</i>	NC_006905	284848-284884

Tab. 4: Sekvence promotorů pro rRNA vybraných bakteriálních druhů – zdroje získaných promotorových sekvencí uvedených v tab. 5 (str. 84).

3.12 Molekulární modelování *in silico*

Pro přípravu *in silico* modelu RNAP z *B. subtilis* se sekvencí DNA ve stavu otevřeného komplexu byl jako templát použit již dříve známý homologní model RNAP pocházející z *B. subtilis* (Johnston *et al.*, 2009). K tomuto modelu byla připojena sekvence DNA na základě dostupné struktury RNAP z *E. coli* v komplexu s duplexem DNA:DNA ve stavu otevřené transkripční bubliny (PDB id 3iyd; Hudson *et al.*, 2009). Porovnávání struktur dostupných modelů bylo prováděno pomocí programu ICM Browser (Molsoft L.L.C.). Na základě porovnání dostupných struktur jsme umístili řetězec DNA do odpovídající pozice na zde uváděném modelu RNAP z *B. subtilis*.

Pro přípravu *in silico* modelu proteinu YbxF z *B. subtilis* byly využity modely homologních proteinů dostupné v proteinové databance (kód PDB 1NMU chain D, kvasinkový protein L30e; kód PDB 1YSH chain C, protein L30e pocházející z klíčků pšenice a kód PDB 1PXW chain A, protein L7ae z *Pyrococcus abyssi*). Porovnávání struktur těchto modelů bylo prováděno pomocí modulu „align2D“ z programového balíčku „Modeler software“. Software stejného výrobce byl použit také na samotnou přípravu homologních modelů YbxF.

3.13 Izolace ribosomů z *B. subtilis*

Bakteriální kultura (1000 ml) byla inkubována v médiu LB s 1 % xylózou až do $OD_{600} \sim 1,0$ (exponenciálně rostoucí bakterie). V okamžiku dosažení této optické denzity byla polovina kultury odebrána a druhá polovina byla dále inkubována přes noc (stacionární bakteriální kultura; cca 10 hodin od okamžiku odběru exponenciální kultury).

Buněčná kultura byla centrifugována 1 hodinu při 3100 RPM (centrifuga Haereus Cryofuge 8000, rotor 6610) a 4°C. Médium bylo odstraněno a pelet byl promyt 10 ml pufru S (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 60 mM NH₄Cl, 0,5 mM EDTA, 5 mM 2-merkapt ethanol, 10 % glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluorid). Po centrifugaci při 3100 RPM (centrifuga Haereus Cryofuge 8000, rotor 6610), 20 minut při 4°C byly vzorky ihned zamrazeny v -20°C. Veškeré následující kroky byly prováděny při teplotě 4°C. Zamražená kultura (~ 1 g) byla resuspendována v 7-8 ml pufru S a sonikována 5 x 1 minutu na ledu (s 15 vteřinovými přestávkami). Zbytky pevného buněčného materiálu byly ze

sonikátu odstraněny 30 minutovou centrifugací při 30000 x g. Supernatant byl posléze centrifugován 120 minut při 285000 x g (ultracentrifuga Beckman Optima L90K). Sediment byl suspendován v pufru S a po odstranění pigmentovaných částic nízkootáčkovou centrifugací při 20000 x g, 20 minut (pouze v případě stacionární kultury) byly 2 ml alikvoty nanášeny na hladinu pufru S s 30 % sacharózou (8 ml) v 10 ml kyvetách. Následovala vysokootáčková centrifugace přes noc při 190000 x g. Sediment izolovaných ribosomů byl rozpuštěn v pufru S s 1 M NH₄Cl. Nahromaděné nerozpustné částice byly odstraněny krátkou centrifugací při nízkých otáčkách (20000 x g, 20 minut) a supernatant byl centrifugován opět při vysokých otáčkách 285000 x g po dobu 3 hodin. Sediment ribosomů byl resuspendován v pufru S a zbytek nahromaděných částic byl odstraněn nízkootáčkovou centrifugací při 20000 x g, 20 minut. Supernatant (cca 2 ml) odpovídající purifikovaným ribosomům byl rozdělen na alikvoty po 300 μl a byl zamražen v hlubokomrazícím boxu (-80°C).

3.14 Disociace ribosomů 70S na podjednotky 50S a 30S

Exponenciálně rostoucí buněčná kultura *B. subtilis* byla připravena stejným způsobem, jak je uvedeno výše v sekci 3.13 (izolace ribosomů). Kultura byla po první centrifugaci resuspendována v pufru S, sonikována a následně znovu centrifugována 20 minut při 30000 x g z důvodů odstranění nerozpustných zbytků buněčného materiálu. 200 μl supernatantu bylo po té nanášeno na hladinu předem připraveného gradientu sacharózy (10 – 25 %). Použitá koncentrace iontů Mg²⁺ byla 0,3 mM. Následovala vysokootáčková centrifugace (248000 x g, 210 minut, rotor SW41 Ti v ultracentrifuze Beckman Optima L90K). Po centrifugaci byl gradient rozdělen pomocí sběrače (Foxy Jr.) do 15 frakcí. Na základě hodnoty absorbance (260 nm) bylo určeno rozložení ribosomálních podjednotek 30S a 50S do jednotlivých frakcí, které bylo následně graficky znázorněno.

3.15 Detekce fúzního proteinu YbxF-GFP

Fúzní protein YbxF-GFP byl detekován v izolovaných ribosomech fluorescencí a ve frakcích odpovídajících jednotlivým ribosomálním podjednotkám technikou Western

blotting pomocí protilátky proti GFP. Před samotnou detekcí fúzního proteinu YbxF-GFP ve frakcích ze sacharózového gradientu (ev. v samotných ribosomech) byly jednotlivé frakce (ribosomy) precipitovány pomocí kyseliny trichloroctové (TCA) podle následujícího postupu:

- TCA byla přidána do finální 5 % koncentrace
- vzorek byl 1 hodinu inkubován v -20°C a následně centrifugován 20 minut při 15000 x g a 4°C
- supernatant (TCA) byl odpipetován a pelet byl 2 x opláchnut 96 % ethanolem a usušen ve vakuu
- vzorek byl resuspendován v pufru A (1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml glycerol; 1,6 ml 10 % SDS; 0,2 ml 0,05 % bromphenol blue, 1,2 ml 2-merkptoethanol, 3,2 ml dH₂O)
- vzorek byl separován na 12 % gelu SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Vzorky byly následně přeneseny pomocí blotovací sestavy (400 mA, 2 hodiny) a pufru B (1 litr zásobního roztoku: 15,15 g Tris-HCl, 72 g glycinu) na nitro-celulózovou membránu (Schleicher a Schuell). Následovala samotná detekce fúzního proteinu YbxF-GFP protilátkou proti GFP („horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit“; Santa Cruz Biotechnology). Množství detekovaného proteinu bylo analyzováno standardní metodou pomocí chemiluminiscenčního kitu (Pierce).

3.16 Mikroskopie

Fluorescence ribosomů (150 µl roztoku purifikovaných ribosomů identické koncentrace) byla měřena pomocí fluorescenční mikroskopie na 96 jamkových mikrotitračních destičkách (Sigma). Sestava na měření fluorescence GFP se skládala z mikroskopu Leica Fluo III a fotoaparátu Olympus C5050 s filtrem GFP. Hodnoty relativní fluorescence byly kvantifikovány pomocí programu ImageJ 1.34s.

Fluorescenční mikroskopie buněk *B. subtilis* byla prováděna pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81 Cell-R a digitální kamery Hamamatsu Orca-ER.

3.17 Bodová mutagenese

Bodová mutagenese sekvence DNA genu *ybxF* byla provedena pomocí kitu „QuickChange“ (Stratagene) v mutagenní PCR reakci dle postupu uváděného výrobcem. Jako templát pro PCR reakci byl použit plazmid pSG1154F11. Sekvence použitých oligonukleotidů (*lys17for* a *rev*, *lys21for* a *rev* a *lys24for* a *rev*), které nesly adekvátní záměny v sekvenci DNA genu *ybxF*, jsou uvedeny v tabulce 3 (str. 47). Po amplifikaci celé sekvence plazmidu pSG1154F11 v PCR reakci byla templátová DNA štěpena RE *DpnI*, který štěpí pouze metylovanou sekvenci DNA. Takto připravený štěpený reakční mix byl použit jako donorová DNA pro transformaci *E. coli*. Následovala izolace plazmidové DNA a sekvenace. Ověřenou plazmidovou DNA byl transformován vhodný kmen *B. subtilis*, čímž došlo k integraci části plazmidové sekvence do místa *amyE* na chromozomu *B. subtilis*. Úspěšná integrace byla ověřena standardní metodou (Lewis & Marston, 1999) a sekvenací.

Cíle disertační práce

- definovat promotorové elementy DNA zodpovědné za regulaci iniciace transkripce pomocí iNTP u *B. subtilis*
- ověřit vlastnosti definovaných promotorových elementů DNA pomocí *in vitro* a *in vivo* přístupů na sadě vybraných promotorů
- zjistit případnou esencialitu genu *ybxF* a jeho buněčného paralogu, genu *ymxC* v *B. subtilis*
- objasnit funkci a lokalizovat protein YbxF v *B. subtilis*

Výsledky – část I

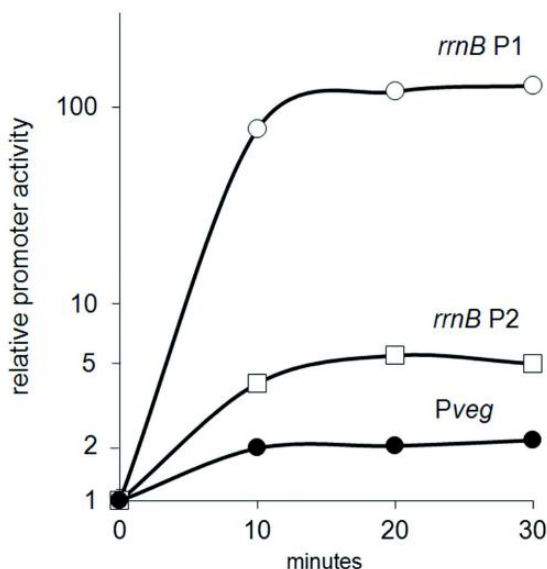
1. Výběr základních promotorů

Transkripce všech rRNA operonů u *E. coli* i *B. subtilis* je typicky řízena ze dvou promotorů označovaných jako *rrn* P1 a *rrn* P2. Jejich aktivita je závislá na koncentraci iNTP, tedy na rychlosti růstu bakteriální kultury. Čím vyšší je rychlost růstu, tím vyšší je produkce iNTP a aktivita rRNA promotorů. Podle dostupných údajů jsou promotory *rrn* P1 citlivější na tyto změny než promotory *rrn* P2 a to jak u *E. coli* (Paul *et al.*, 2004), tak u *B. subtilis* (Krásný & Gourse, 2004).

Tato pozorování jsme potvrdili i v našich experimentech. Testovali jsme chování promotorů *rrnB* P1 a *rrnB* P2 v závislosti na fázi růstu *B. subtilis*. Pro tento účel byly vytvořeny promotorové konstrukty, kde byl každý z testovaných promotorů fúzován s markerovým genem. Konstrukty byly následně integrovány v jediné kopii do chromozomu *B. subtilis*. Buněčná kultura z takto připravených kmenů *B. subtilis* byla kultivována po dobu 3 hodin v bohatém médiu MOPS, které obsahovalo všech dvacet aminokyselin, až do stacionární fáze růstu. Po té byla kultura 10x naraděna do čerstvého média, dále kultivována a vždy v 10 minutových intervalech byla izolována celková RNA. Reverzní transkripce byla specifická část RNA definovaná oligonukleotidem *βgalR* (tab. 3, str. 47) přepsána do cDNA. Promotorová aktivita byla měřena množstvím cDNA (odpovídá množství nasyntetizované specifické mRNA) pomocí RT-qPCR (viz. Přístroje, materiál a metody). Promotorová aktivita v bodě 0 min. byla stanovena jako 1. Z výsledků je patrné, že účinkem bohatého média promotor *rrnB* P1 zvýšil svou aktivitu přibližně 100 x, avšak promotor *rrnB* P2 pouze 5 x (obr. 13, str. 65). Podobné výsledky jsme pozorovali také u promotorů *rrnO* P1 a *rrnO* P2. Promotor *rrnB* P1 reagoval svou aktivitou na bohaté médium nejsilněji, proto byl vybrán pro další experimenty k identifikaci úseků, které jsou v těchto promotorech za reakci na koncentraci iNTP zodpovědné.

Ribosomální promotor *rrnB* P1 je u *B. subtilis* z hlediska své sekvence typickým zástupcem ribosomálních promotorů P1. Sekvence jeho mezerníku dosahuje délky 17 bp, což je délka odpovídající i mezerníkům dalších pěti ze všech sedmi promotorů *rrn* P1 (délka mezerníků u *rrnO* P1 a *rrnI* P1 je 16 a 18 bp). Oblast mezi hexamerem -10 a pozicí +1 je

bohatá na adenin a thymin a dosahuje délky 8 bp (promotory *rrn* P2 mají tuto oblast složenou pouze ze 7 bp). Iniciačním nukleotidem je guanin, stejně jako u všech ostatních promotorů *rrn* P1 *B. subtilis*. V pozici -7 promotorové sekvence *rrnB* P1 je u *E. coli* cytosin, ale u *B. subtilis* je jiný nukleotid.

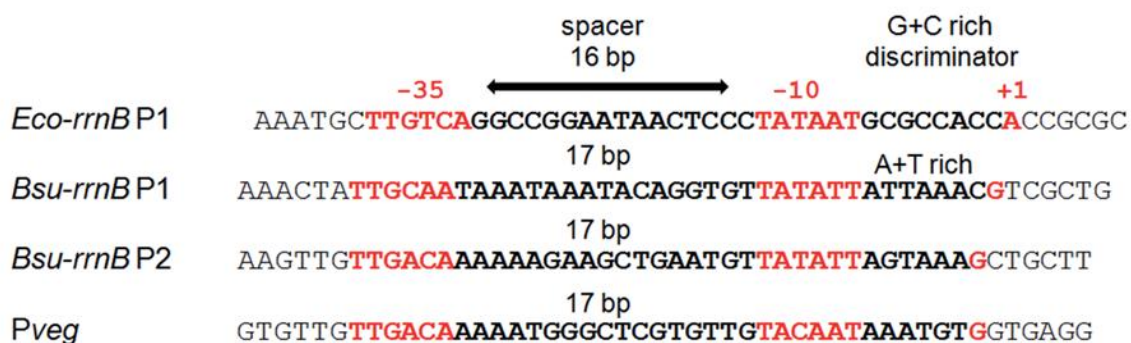


Obr. 13: Aktivita vybraných promotorů během kultivace bakteriální kultury po naředění do čerstvého média bohatého na živiny („outgrowth“ ze stacionární fáze), (Sojka *et al.*, 2011). Kmeny *B. subtilis* testované v experimentu: RLG7554 (*rrnB* P1, bílá kolečka); RLG7553 (*rrnB* P2, bílé čtverce); RLG7555 (*Pveg*, černá kolečka).

Přirozený promotor *Pveg* byl zvolen jako hlavní kontrolní promotor. *Pveg* není regulován koncentrací iNTP a exprese z tohoto promotoru probíhá konstitutivně. Jedná se o silný promotor, který řídí transkripci jediného genu *veg*, jehož funkce doposud nebyla u *B. subtilis* objasněna. Avšak promotor *Pveg* patří mezi velmi dobře prostudované promotory (Le Grice *et al.*, 1986; Krásný & Gourse, 2004) a iniciuje transkripci pomocí ATP. Z důvodu jednodušší interpretace výsledků jsme pro naše experimenty zvolili upravený promotor *Pveg*, který transkripci iniciuje pomocí GTP. Tato úprava v pozici +1 nemá prokazatelně žádný jiný vliv na vlastnosti tohoto promotoru, které zůstávají stejné jako u ATP varianty (Krásný & Gourse, 2004).

Porovnání sekvencí promotorů *rrnB* P1, *rrnB* P2, *Pveg* a *E. coli rrnB* P1 je znázorněno na obrázku 14 (str. 66). Shodou okolností promotor *rrnB* P1 je pojmenován

stejně u *E. coli* i *B. subtilis*. Oba promotory jsou ale sekvenčně zcela odlišné. Pro řádné rozlišení obou promotorů v textu této práce je ribosomální promotor *rrnB* P1 z *B. subtilis* označen jako *Bsu-rrnB* P1 a *rrnB* P1 z *E. coli* jako *Eco-rrnB* P1. Je-li v textu uvedeno pouze označení *rrnB* P1, je jím vždy míněn promotor *rrnB* P1 z *B. subtilis*.



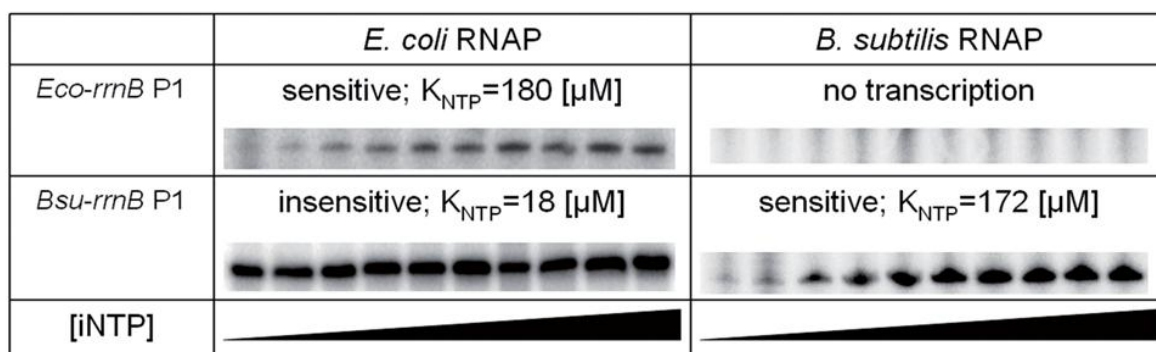
Obr. 14: Porovnání sekvencí vybraných promotorů pocházejících z *E. coli* a *B. subtilis* (Sojka *et al.*, 2011). Hexamery -35, -10 a pozice +1 jsou znázorněny červeně. Několik bází, které vybrané promotory přirozeně obklopují, jsou znázorněny šedou barvou.

2. Závislost aktivity promotorů na koncentraci iNTP *in vitro*

2.1 RNAP z *E. coli* a *B. subtilis* – měření senzitivity promotorů *in vitro*

U promotorů jsme testovali jejich senzitivitu ke koncentraci iNTP (dále jen [iNTP]). Citlivost promotorů ke koncentraci iNTP *in vitro* může být stanovena na základě určení konstanty K_{iNTP} , která představuje takovou koncentraci iNTP, která zajišťuje 50 % maximální promotorové aktivity. Promotory, které jsou tzv. senzitivní vůči [iNTP] mají relativně vysoké hodnoty K_{iNTP} . Jejich aktivita úměrně stoupá se stoupající koncentrací iNTP. Naopak K_{iNTP} promotorů tzv. nesenzitivních k [iNTP] dosahuje relativně nízkých hodnot. Pro jejich plnou aktivitu stačí již velmi nízká koncentrace iNTP a další zvyšování [iNTP] aktivitu těchto promotorů již neovlivní. Pro všechny promotory, které byly testovány v transkripci *in vitro*, jsme stanovili hodnotu jejich K_{iNTP} .

V níže popsaných experimentech jsme porovnávali chování vybraných promotorů v transkripci *in vitro*, za použití RNAP izolované z *E. coli* anebo z *B. subtilis*. Vybrané promotory (obr. 14, str. 66) jsme porovnávali z hlediska jejich senzitivity vůči [iNTP] a použití dvou různých RNAP. Pro všechny promotory jsme stanovili jejich K_{iNTP} . Nejdříve jsme změřili hodnotu K_{iNTP} u promotoru *Eco-rrnB* P1 s jeho přirozenou RNAP z *E. coli*. Hodnota K_{iNTP} tohoto promotoru je relativně vysoká ($K_{iNTP} = 180 \mu\text{M}$), aktivita promotoru stoupá se zvyšující se koncentrací iATP a promotor je tedy tzv. senzitivní vůči [iNTP] (obr. 15, str. 67). Podobně je tomu i v případě promotoru *Bsu-rrnB* P1 s RNAP z *B. subtilis*. Je též silně senzitivní vůči [iNTP], jeho K_{iNTP} činí $172 \mu\text{M}$ a pro svou maximální aktivitu vyžaduje až $1000 \mu\text{M}$ GTP. Naopak zcela jiné vlastnosti vykazuje tento promotor tehdy, je-li transkripce řízena RNAP z *E. coli*. Pro dosažení své poloviční aktivity mu stačí pouze nízká koncentrace iGTP ($18 \mu\text{M}$) a jeví se tedy jako tzv. nesenzitivní vůči [iNTP]. Promotor *Eco-rrnB* P1 pak není RNAP z *B. subtilis* rozeznáván jako efektivní promotor vůbec, neboť v tomto experimentu nebyly žádné transkripty detekovány (obr. 15, str. 67). Promotor *Pveg* je RNAP z obou organismů rozeznáván jako nesenzitivní promotor (RNAP z *E. coli* - výsledky nezobrazeny; RNAP z *B. subtilis* – obr. 17, str. 69).



Obr. 15: Závislost aktivity ribosomálních promotorů *Eco-rrnB* P1 a *Bsu-rrnB* P1 na koncentraci iNTP a na původu RNAP (Sojka *et al.*, 2011). Senzitivita byla stanovena jako funkce koncentrace iNTP a použité RNAP izolované z *B. subtilis* nebo *E. coli*. Experiment *in vitro*; hodnoty K_{NTP} a vzrůstající koncentrace iNTP (20 - 2000 μM , viz kapitola 3.6, str. 52) jsou znázorněny uvnitř obrázku.

Z této sady transkripčních experimentů *in vitro* tedy vyplývá, že RNAP izolovaná z *E. coli* nerozpoznává promotor *Bsu-rrnB* P1 jako senzitivní promotor. Na druhou stranu

tento promotor je RNAP z *B. subtilis* jako senzitivní jasně rozpoznáván. Promotor *Pveg* je RNAP z *B. subtilis* a stejně tak RNAP z *E. coli* rozeznáván jako nesenzitivní.

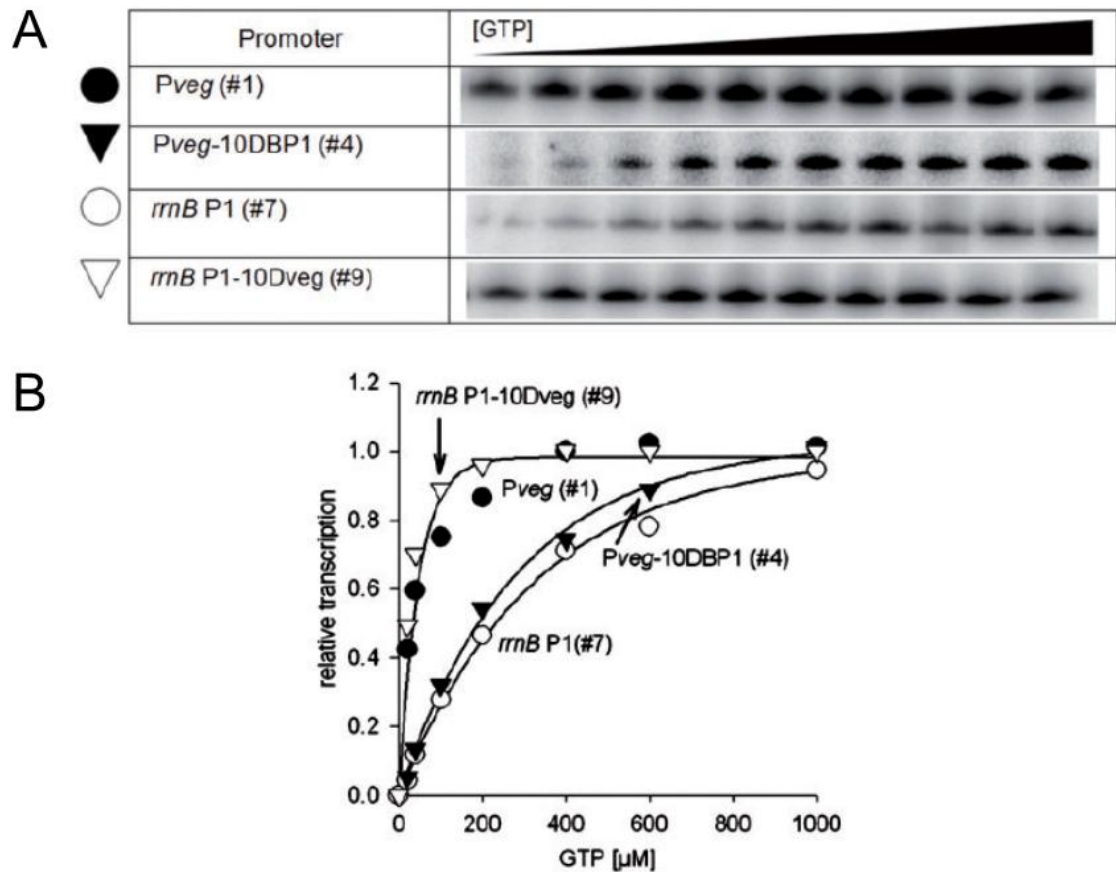
2.2 Identifikace promotorového elementu DNA zodpovědného za senzitivitu promotorů k [iNTP] u *B. subtilis*

V této experimentální části jsme se snažili identifikovat oblast promotoru *Bsu-rrnB* P1, která odlišuje tento promotor od promotoru *Pveg* z hlediska sensitivity k [iNTP]. Připravili jsme první sadu chimérních promotorových konstruktů ve které byla sekvence promotoru *Pveg* (promotorový konstrukt #1) postupně systematicky měněna až do podoby sekvence promotoru *rrnB* P1 (obr. 16, str. 68; tuto sadu promotorových konstruktů připravil Mgr. T. Kouba v rámci své diplomové práce).

#	promoter	
1	<i>Pveg</i>	TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAATAAATGT.G
2	<i>Pveg+1=8</i>	TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAATAAATGTG
3	<i>PvegDiscBP1</i>	TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGACAATATTAAACG
4	<i>Pveg-10DBP1</i>	TATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTGATATATTATTAAACG
5	<i>PveghexDBP1</i>	TATTTGCAAAAAATGGGCTCGTGTGTGATATATTATTAAACG
6	<i>PvegSp-10DBP1</i>	TATTTGACATAAAATAAATACAGGTGTATATATTATTAAACG
7	<i>rrnB P1</i>	CTATTTGCAATAAAATAAATACAGGTGTATATATTATTAAA.G
8	<i>rrnB P1-39to-2+1G=7</i>	CTATTTGCAATAAAATAAATACAGGTGTATATATTATTAAA.G
9	<i>rrnB P1-10Dveg</i>	CTATTTGCAATAAAATAAATACAGGTGTACAATAAATGT.G

Obr. 16: Porovnání sekvencí DNA výchozích promotorů *Pveg* a *rrnB* P1 a jejich chimérních forem (Sojka *et al.*, 2011). Sekvence promotoru *Pveg* je znázorněna světle šedou barvou; sekvence promotoru *rrnB* P1 je znázorněna tmavě šedou barvou; hexamery -35, -10 a pozice +1 jsou znázorněny červeně; # znázorňuje číslo promotorového konstruktů.

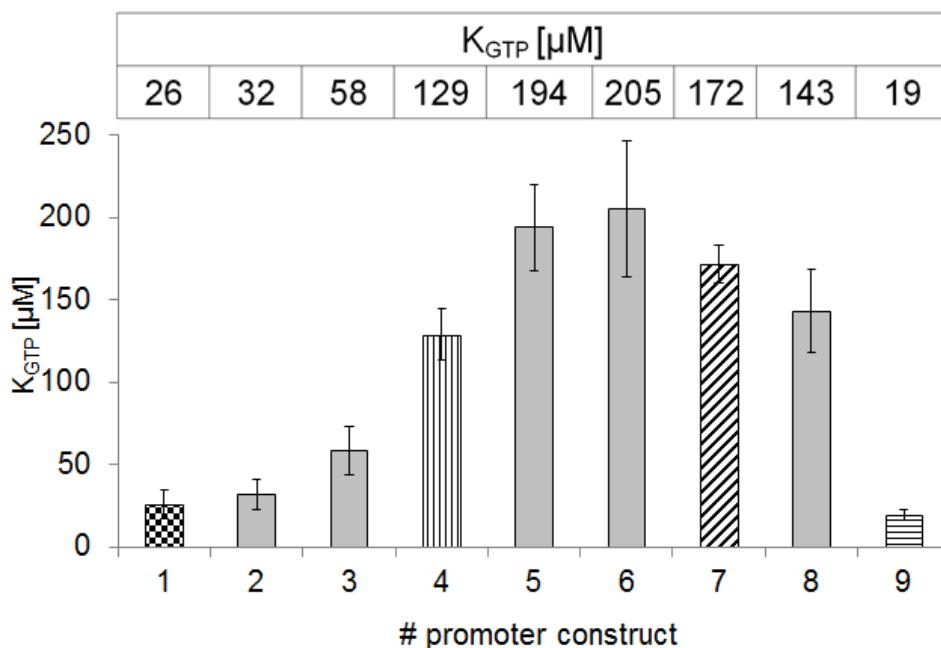
Všechny chimérní promotorové konstrukty jsme testovali v transkripci *in vitro*, která probíhala pomocí RNAP z *B. subtilis*. Obrázek 17 (str. 69) ukazuje typické primární výsledky (17A) a jejich kvantifikaci (17B) pro promotory *Pveg*, *rrnB* P1 a další dva promotorové konstrukty.



Obr. 17: Závislost aktivity promotorů *in vitro* na koncentraci iNTP (iGTP) v přítomnosti RNAP z *B. subtilis* (Sojka *et al.*, 2011). (A): primární výsledky transkripčních experimentů; koncentrace GTP v rozmezí 20 μM – 2000 μM . (B): kvantifikace transkripčních produktů; výsledky jsou uvedeny pouze do 1000 μM koncentrace GTP.

Na následujícím obrázku 18 (str. 70) jsou pak uvedeny hodnoty K_{GTP} zjištěné pro všechny připravené promotorové konstrukty #1 až #9. Výsledky poskytly informaci o významu jednotlivých částí promotoru *rrnB* P1 z *B. subtilis*, při jeho využívání vlastní RNAP, pro udržení schopnosti reagovat na zvyšující se koncentraci iGTP (senzitivita k [iGTP]). Z výsledků vyplývá, že zkrácením vzdálenosti mezi hexamerem -10 a pozicí +1 v sekvenci promotoru *rrnB* P1 (konstrukt #8), případně rozšířením této oblasti u promotoru *Pveg* (konstrukt #2) ovlivnilo pouze minimálně senzitivitu těchto promotorů k [iNTP]. Podobný efekt přinesla výměna diskriminátoru z *Pveg* za diskriminátor z promotoru *rrnB* P1 (konstrukt #3). Výrazný vliv na promotorovou senzitivitu byl pozorován až u chimérického

konstruktů #4. Zde byla promotorová sekvence od hexameru -10 až po pozici +1 pocházející z promotoru *rrnB* P1 připojena ke 5' oblasti promotoru *Pveg*. Hodnota K_{GTP} tohoto promotorového konstruktů #4 až zde výrazně stoupla a značně se přiblížila hodnotě K_{GTP} promotorového konstruktů #7 *rrnB* P1, tj. nativního promotoru *B. subtilis*.



Obr. 18: Grafické znázornění hodnot K_{GTP} testovaných promotorových konstruktů (Sojka *et al.*, 2011). Hodnoty K_{GTP} jsou uvedeny nad grafem. Chybové úsečky znázorňují rozptýlení hodnot dle směrodatné odchylky získané ze tří experimentů pro každý z promotorů. Sloupce znázorňující hodnoty K_{GTP} pro čtyři nejdůležitější konstrukty (#1 a #7 patří výchozím promotorům *Pveg* a *rrnB* P1) jsou pro lepší orientaci znázorněny odlišnou texturou.

U zbývajících chimérních promotorů jsme pozorovali už pouze mírný vliv dalších modifikací či výměn elementů na senzitivitu k [iNTP]. Připojením hexameru -35 (konstrukt #5) či mezerníku *rrnB* P1 (konstrukt #6) k *Pveg* přineslo pouze mírné zvýšení hodnot K_{GTP} v porovnání s hodnotou K_{GTP} odpovídající konstruktů #4. Hodnoty K_{GTP} konstruktů #5 a #6 však byly překvapivě o něco vyšší než K_{GTP} samotného *rrnB* P1. Zvýšená hodnota K_{GTP} u konstruktů #5 je pravděpodobně důsledkem vnesení hexameru -35 z *rrnB* P1. Nicméně sekvence hexameru -35 v konstruktů #6 změněna nebyla. Sekvence hexameru -35 u tohoto konstruktů odpovídá konsenzu (TTGACA) a v mezerníku je navíc zřejmá přítomnost rozšířeného motivu -10 (TGX). Přesto je naměřená hodnota K_{GTP} tohoto konstruktů v porovnání s konstruktů #5 o něco vyšší. Je však zřejmé, že na rozdíl od *E. coli*,

specifický promotor *B. subtilis* může obsahovat hexamer -35 se sekvencí odpovídající konsenzu, stejně tak i rozšířený motiv oblasti -10 a tento promotor nadále může vykazovat vlastnosti promotoru senzitivního k [iNTP]. Vše míněno v transkripci *in vitro* provedené pomocí RNAP z *B. subtilis*.

Z důvodů ověření důležitosti promotorové 3' oblasti pro senzitivitu promotoru k [iNTP] jsme vytvořili reciproký promotorový konstrukt #9, jehož 3'oblast pocházela z promotoru *Pveg* a naopak 5' oblast byla z promotoru *rrnB* P1. Hodnota K_{GTP} tohoto konstruktu byla srovnatelná s hodnotou K_{GTP} promotoru *Pveg* (obr. 18, str. 70). Tento výsledek tedy znovu potvrdil rozhodující podíl promotorové 3' oblasti *rrnB* P1 na zachování vysoké senzitivity promotoru k [iNTP].

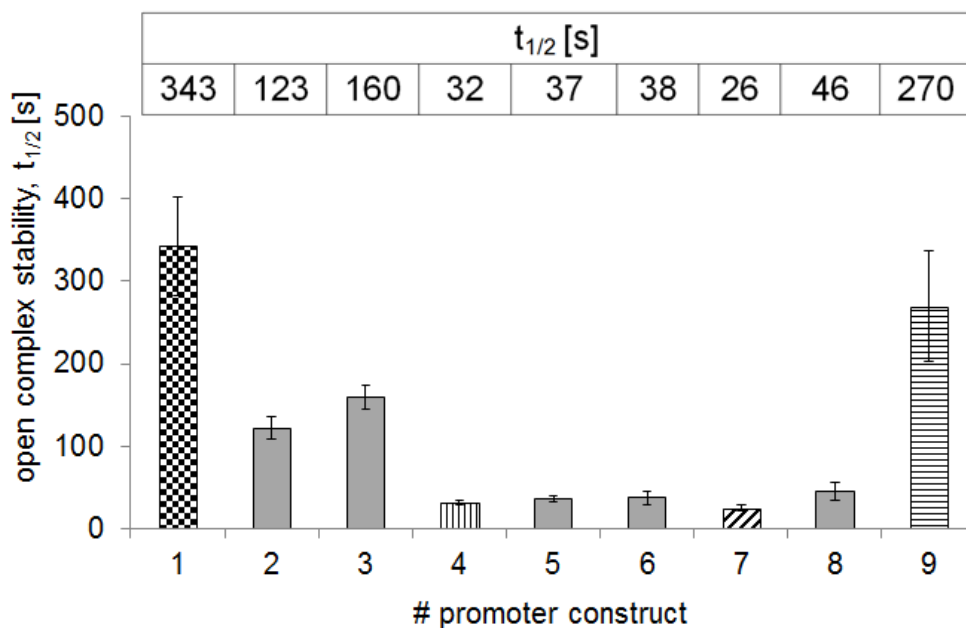
Hlavním elementem, který určuje buď „senzitivitu“ anebo „nesenzitivitu“ je sama 3' promotorová oblast. Jak je patrné, pochází-li z promotoru *rrnB* P1 uděluje promotoru senzitivitu i když zbylá část promotoru je nesenzitivního původu (konstrukt #4). Naopak a ještě účinněji, pochází-li 3' promotorová oblast z *Pveg*, není promotor k [iNTP] senzitivní, ačkoliv jeho zbytek je zcela senzitivního původu (konstrukt #9).

3. Stabilita otevřených promotorových komplexů

3.1 Identifikace promotorové sekvence DNA zodpovědné za stabilitu otevřených promotorových komplexů

Tamas Gaal a jeho kolegové z Univerzity ve Wisconsinu již v roce 1997 publikovali výsledky, které dokazují, že senzitivita promotoru k [iNTP] negativně koreluje se stabilitou jeho otevřeného promotorového komplexu (Gaal *et al.*, 1997). V našich experimentech s promotorovými konstrukty jsme proto také změřili stabilitu jejich otevřených komplexů a to měřeními poločasu jejich rozpadu. Kromě vlivu promotorové 3' oblasti na senzitivitu k [iNTP] (viz výše) jsme prokázali vliv této oblasti i na stabilitu otevřených komplexů našich chimérických promotorů (obr. 19, str. 72; tento experiment provedl Mgr. Tomáš Kouba). Promotory s nižší hodnotou K_{GTP} (např. konstrukty #1 a #9) utvářejí výrazně stabilnější otevřené komplexy na rozdíl od promotorů s vyšší hodnotou K_{GTP} (např. konstrukty #4 a #7), které utvářejí méně stabilní otevřené komplexy.

Tato část experimentů *in vitro* tedy dále potvrzuje klíčový podíl sekvence 3' oblasti (od hexameru -10 včetně, až po pozici +1) promotoru *rrnB* P1 na mechanice řízení iniciace transkripce. Všechny konstrukty s 3' oblastí promotoru z *rrnB* P1 (#4 - #8) mají nejnižší $t_{1/2}$.



Obr. 19: Stabilita otevřených komplexů promotorových konstruktů #1 – #9 (Sojka *et al.*, 2011). Hodnoty poločasu rozpadu ($t_{1/2}$) otevřených komplexů jsou uvedeny nad grafem.

4. Úloha báze -5T v senzitivě promotorů k [iNTP]

4.1 Bodová mutagenese v sekvenci DNA promotoru *rrnB* P1

Provedli jsme analýzu sekvence DNA všech sedmi rRNA promotorů P1 u *B. subtilis*. V 3' oblasti těchto promotorů se vyskytují celkem čtyři sekvenční varianty (obr. 20, str. 73). V rámci těchto čtyř variant sekvencí DNA se nachází pouze jediná 100 % konzervovaná báze. Jedná se o thymin v pozici -5 (3 bp od hexameru -10 směrem k pozici +1).

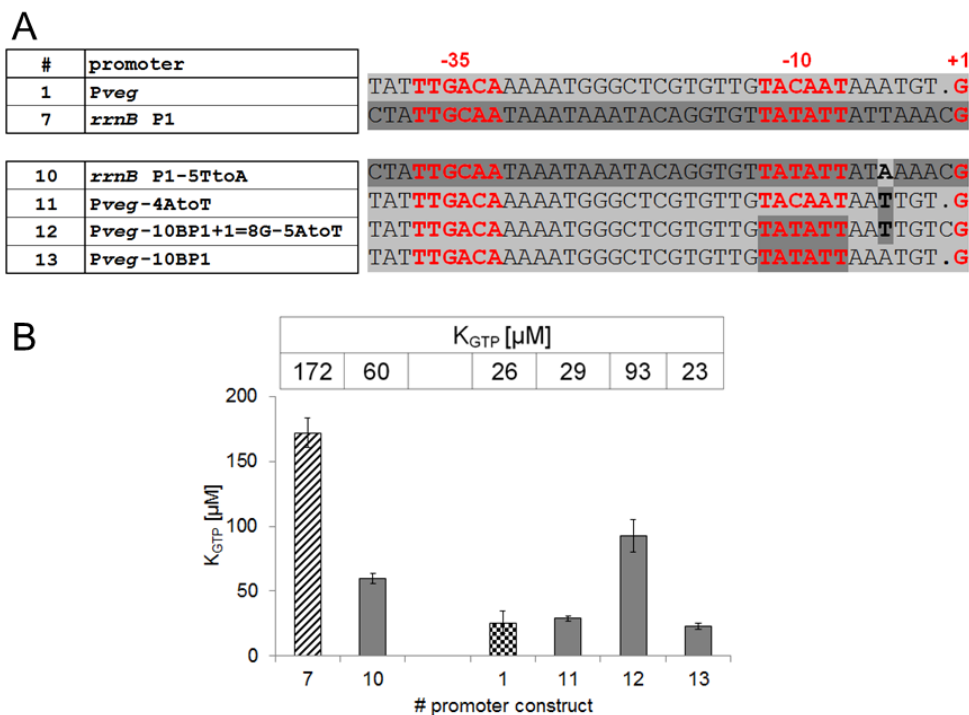
	-10	+1
<i>rrnA</i>	TAA TATACG	
<i>rrnB, D, E</i>	TAT TAAACG	
<i>rrnI, J</i>	TAT TATTCG	
<i>rrnO</i>	TCA TTCTG	

Obr. 20: Porovnání sekvencí DNA promotorových 3' oblastí sedmi rRNA promotorů P1 u *B. subtilis* (Sojka *et al.*, 2011). Počátek sekvence hexameru -10 a pozice +1 je znázorněn tučně. Thymin v pozici -5 je znázorněn červeně.

Připravili jsme promotorový konstrukt, jehož základem je sekvence promotoru *rrnB* P1. Vzniklý promotorový konstrukt #10 se od sekvence *rrnB* P1 liší pouze v pozici -5, kde jsme thymin nahradili adeninem, což je báze, která se nachází v analogické pozici u promotoru *Pveg*. Sekvence DNA a naměřená hodnota K_{GTP} konstrukt #10 jsou uvedeny na obrázku 21 (str. 74). Jak je patrné z panelu B v obrázku 21, už pouhá výměna thyminu za adenin v pozici -5 (konstrukt #7) způsobila u promotoru *rrnB* P1 silný pokles hodnoty jeho K_{GTP} , tj. posun k hodnotě K_{GTP} promotoru *Pveg* (snížení senzitivity). Současně jsme připravili analogický konstrukt, jehož sekvence je odvozena od promotoru *Pveg*. Adenin v pozici -4 (báze analogická pozici -5 u *rrnB* P1, která se nachází 3 bp od pozice +1 ve směru „downstream“) byl zaměněn za thymin. V tomto reciprokém případě však žádný výrazný nárůst hodnoty K_{GTP} v porovnání s promotorem *Pveg* nebyl pozorován (konstrukt #11; obrázek 21 A, B; str. 74). Výraznější nárůst hodnoty K_{GTP} byl zjištěn až u následujícího konstrukt, kde byl efekt mutace v pozici -5 zdůrazněn současně provedenou záměnou celého hexameru -10 a prodloužením oblasti diskriminátoru ze 7 bp na 8 bp (konstrukt #12; obr. 21 A, B; str. 74). Rozdíl v hodnotách K_{GTP} mezi konstrukty #11 a #12 je přibližně trojnásobný. Zároveň je třeba zdůraznit, že samotné prodloužení diskriminátoru (konstrukt #2; obr. 16, str. 68) či samostatně provedená záměna hexameru -10 (konstrukt #13, obr. 21, str. 74) žádné výrazné zvýšení hodnoty K_{GTP} nepřineslo.

Thymin v pozici -5 tedy hraje výraznou roli v senzitivitě promotoru *rrnB* P1 k [iNTP] při transkripci katalyzované RNAP z *B. subtilis*. Je však zřejmé, že tato báze není

jediným regulačním prvkem v senzitivitě tohoto promotoru k [iNTP]. Srovnej např. K_{GTP} také konstruktů #2 a #3 (obr. 18, str. 70).

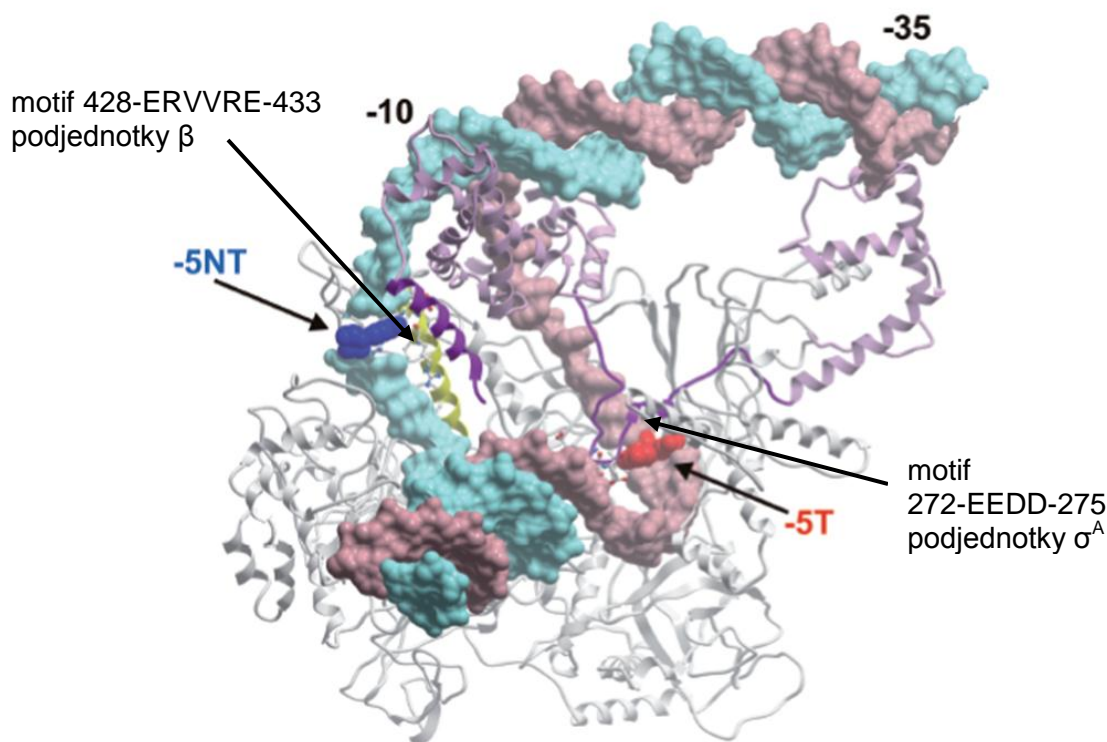


Obr. 21: Úloha báze -5T v senzitivitě promotoru *rrnB* P1 k [iNTP] (Sojka *et al.*, 2011). (A): Sekvence promotorových konstruktů #1 a #7 a nových konstruktů #10 – #13. Hexamery -35, -10 a pozice +1 jsou znázorněny červeně; pozice bodové mutace konstruktů #10, #11 a #12 je znázorněna tučně. (B): Grafické znázornění hodnot K_{GTP} testovaných promotorových konstruktů. Hodnoty K_{GTP} jsou uvedeny nad grafem. Chybové úsečky znázorňují rozptyl hodnot dle směrodatné odchylky získané ze tří experimentů pro každý z promotorů. Sloupce znázorňující hodnoty K_{GTP} pro výchozí konstrukty #1 (Pveg) a #7 (*rrnB* P1) jsou pro lepší orientaci znázorněny odlišnou texturou.

4.2 Interakce báze -5T s RNA polymerázou z *B. subtilis*

Z výsledků získaných z transkripce *in vitro* je zřejmé, že důležitým faktorem senzitivity promotoru *rrnB* P1 u *B. subtilis* je také thymin v pozici -5. Ve spolupráci s Ivanem Barvíkem z Matematicko-fyzikální fakulty UK v Praze jsme proto vytvořili *in silico* molekulární 3D model struktury tohoto promotoru ve stavu otevřeného komplexu s RNAP z *B. subtilis*. Thyminová báze v pozici -5 je zřejmě obdobou pozice -7

u ribosomálních promotorů *E. coli*. Nejedná se ale o přímou homologii, neboť -5T *B. subtilis* se nachází v porovnání s promotory *E. coli* o 1 bp dále od hexameru -10, přičemž u *E. coli* se navíc jedná o odlišnou bázi - cytosin v pozici -7. Z molekulárního modelu vyplývá, že báze v pozici -5 netemplátového vlákna by mohla utvářet kontakty s motivem 428-ERVVRE-433 podjednotky β RNAP (obr. 22, str. 76). Kontakty mezi sekvencí DNA netemplátového vlákna v oblasti transkripční bubliny s podjednotkou β byly popsány již dříve (Naryshkin *et al.*, 2000). Dalším možným kontaktním místem báze -5T je region 1.2 podjednotky σ^A . Tento typ interakce je v souladu s již popsanými kontakty báze -7C s podjednotkou σ^{70} u *E. coli*. Nicméně vzhledem k našemu modelu RNAP z *B. subtilis* je zde ve fázi otevřeného komplexu tento kontakt méně pravděpodobný. Větší potenciál vazby báze -5T na sekvenci σ^A může tato pozice mít až ve stavu izomerizace, kdy se region 1.2 podjednotky σ^A nachází v přímé blízkosti báze -5T. Báze v pozici -5T může v tomto stavu kontaktovat motif 272-EEDD-275 podjednotky σ^A . Na základě identity báze v pozici -5T templátového či netemplátového vlákna sekvence DNA lze usuzovat, že námi popsané interakce by mohly mít vliv na stabilitu otevřeného transkripčního komplexu a tedy i na senzitivitu daných promotorů k [iNTP]. Je třeba zdůraznit, že popsané interakce mají spekulativní charakter. K detailnímu pochopení úlohy báze -5T v senzitivitě promotorů k [iNTP] bude nutné provést další experimenty.



Obr. 22: Model možných interakcí mezi bází v promotorové pozici -5 templátového či netemplátového vlákna promotoru *rrnB* P1 s RNAP u *B. subtilis* vytvořený *in silico* (Sojka *et al.*, 2011). Podjednotka β' byla z modelu odstraněna, neboť její struktura bránila v zobrazení námi popisované oblasti. Podjednotka β , světle šedá barva; podjednotka σ^A , světle fialová barva; templátové vlákno DNA, světle růžová barva; netemplátové vlákno DNA, světle modrá barva. Oblasti podjednotky β a σ^A vytvářející možné interakce s -5NT a s -5T jsou znázorněny žlutou nebo fialovou barvou. Pozice -5T netemplátového vlákna je znázorněna modře a je označena jako -5NT. Pozice -5T templátového vlákna je znázorněna červeně a je označena jako -5T. Hexamery -10 a -35 jsou znázorněny tučně.

5. Závislost aktivity promotorů na koncentraci iNTP *in vivo*

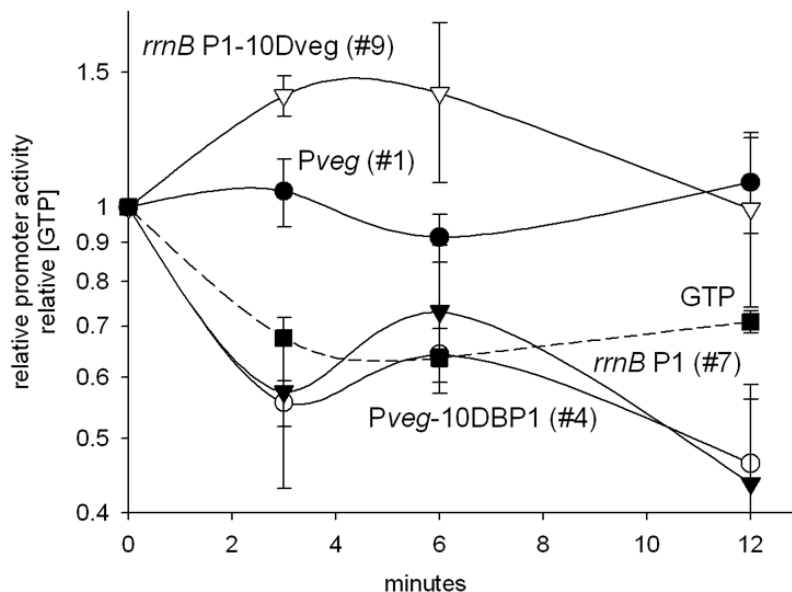
5.1 Vliv promotorové 3' oblasti na senzitivitu promotorů k [iNTP] u *B. subtilis* *in vivo*.

Na základě *in vitro* výsledků o vlivu promotorové 3' oblasti na senzitivitu promotorů k [iNTP] jsme vybrali nejcharakterističtější promotorové konstrukty #4 (*Pveg*-10DBP1) a #9 (*rrnB* P1-10D*veg*) pro testování tohoto efektu *in vivo*. Pro tento účel byly oba promotorové konstrukty a promotory *Pveg* a *rrnB* P1 každý zvlášť integrovány v jediné kopii do

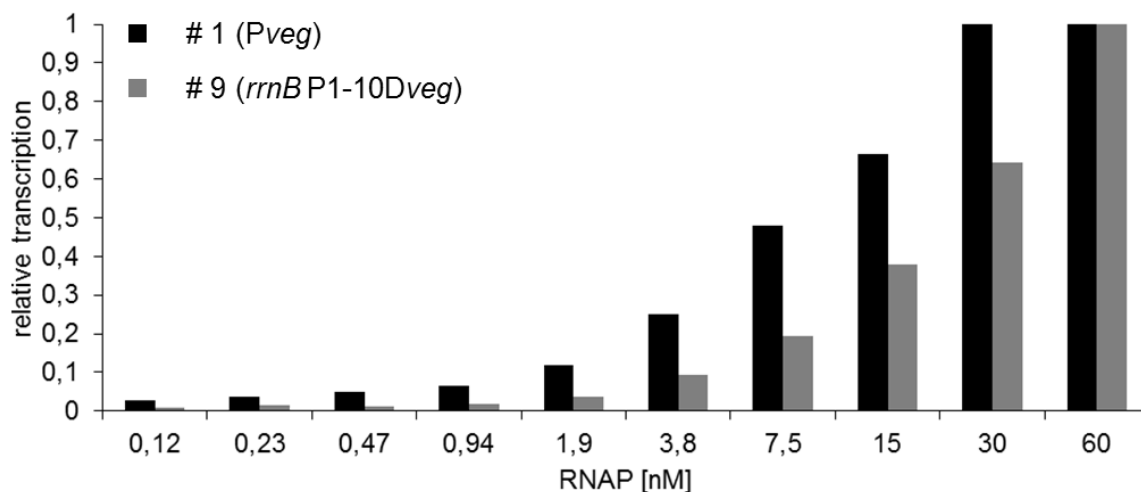
chromozomu *B. subtilis*. Bakteriální kultury takto připravených kmenů byly kultivovány až do časné exponenciální fáze ($OD_{600} \sim 0,3$) a následně vystaveny účinku látky decoyinine. To vedlo k výraznému poklesu hladiny GTP v buňce, neboť decoyinine inhibuje GMP syntázu, tedy enzym, který zajišťuje cestu vedoucí k syntéze GTP v buňce. Po té byla v časových bodech provedena izolace celkové RNA a její specifická část (oligonukleotid *βgalR*, tab. 3, str. 47) byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Promotorová aktivita byla měřena pomocí RT-qPCR na základě množství cDNA, které odpovídalo množství vzniklé mRNA. Hladina GTP v buňce byla měřena metodou chromatografie na tenké vrstvě. Podrobný popis přípravy těchto kmenů a postup v testování aktivity integrovaných promotorů je popsán v kapitole Přístroje, materiál a metody.

Ověřili jsme, že poklesem hladiny GTP účinkem decoyininu, který překvapivě nastal velmi rychle, prudce a silně poklesla také aktivita promotoru *rrnB* P1. Naopak aktivita promotoru *Pveg* zůstala podle očekávání beze změny (obr. 23, str. 78). Aktivita promotorového konstruktů #4, který nese jen 3' oblast z *rrnB* P1 poklesla přibližně stejně rychle a silně jako aktivita promotoru *rrnB* P1. Vzhledem k tomu, že poločas rozpadu testované mRNA dosahuje přibližně 4 minut, je zřejmé, že aktivita obou promotorů (*rrnB* P1 a promotorového konstruktů #4) poklesla téměř na nulovou úroveň mezi prvními dvěma časovými body (časový blok od bodu 0 po bod 3 minut od přidání decoyininu). V aktivitě reciprokého promotorového konstruktů #9, který nese jen 3' oblast z *Pveg* nebyl pozorován žádný pokles. Naopak byl zjištěn mírný nárůst aktivity tohoto promotoru. Tento nárůst může být vysvětlen menší afinitou promotorového konstruktů #9 k RNAP v porovnání s afinitou promotoru *Pveg* k RNAP (obr. 24, str. 78). K tomuto zjištění jsme došli na základě experimentu *in vitro*, ve kterém jsme testovali senzitivitu promotorových konstruktů #1 (*Pveg*) a #9 (*rrnB* P1-10*Dveg*) ke zvyšující se koncentraci RNAP z *B. subtilis* (titrace RNAP od koncentrace 0,12 nM až po 60 nM). Zatímco aktivita promotoru *Pveg* byla saturována již mezi 15 nM a 30 nM koncentrací RNAP, promotorový konstrukt #9 vyžadoval pro svou maximální aktivitu 50 až 60 nM koncentraci RNAP.

3' oblast promotoru *rrnB* P1 je tedy zodpovědná za senzitivitu tohoto promotoru k [iNTP] také *in vivo*. Je-li tato promotorová oblast fúzována s promotorovou 5' oblastí nesenzitivního promotoru *Pveg*, vznikne chimérický promotor, který reaguje svou aktivitou na klesající koncentraci GTP (je senzitivní k [iNTP]) obdobně jako promotor *rrnB* P1.



Obr. 23: Změna aktivity promotorů jako následek poklesu hladiny GTP v buňce (účinek decoyinu), (Sojka *et al.*, 2011). Promotorová aktivita a koncentrace GTP v bodě 0 byly normalizovány k hodnotě 1. Čísla promotorových konstruktů odpovídají těm, které byly testovány také v transkripci *in vitro*. Bílý trojúhelník znázorňuje promotorový konstrukt #9 (kmen LK607), bílé kolečko označuje konstrukt #4 (kmen LK606), černé kolečko znázorňuje promotor *Pveg* (kmen RLG7555) a černý trojúhelník značí promotor *rrnB P1* (kmen RLG7554). Hladina GTP je znázorněna přerušovanou černou linkou. Hodnoty odpovídají průměrným hodnotám naměřeným v rámci čtyř nezávisle provedených experimentů.



Obr. 24: Vliv koncentrace RNAP na aktivitu promotorových konstruktů *in vitro*. Promotorová aktivita obou promotorů byla normalizována k maximální hodnotě 1 (saturovaná transkripce). Aktivitu promotoru *Pveg* znázorňují černé sloupce; aktivitu promotorového konstruktu #9 znázorňují šedé sloupce.

6. Závislost aktivity dalších promotorů na koncentraci iNTP *in vitro*

6.1 Vliv promotorové 3' oblasti na senzitivitu dalších promotorů k [iNTP] *in vitro*

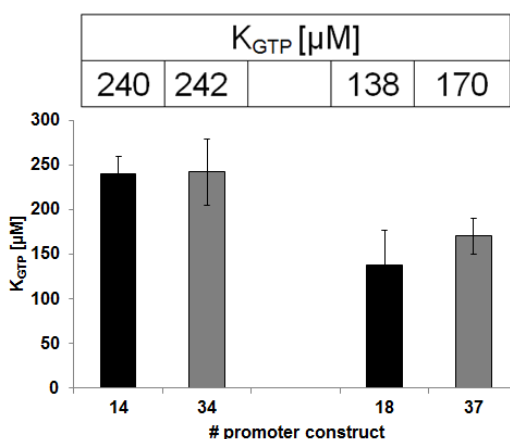
V této sadě experimentů jsme se snažili určit, zdali je možné aplikovat efekt 3' oblasti promotoru *rrnB* P1 na senzitivitu k [iNTP] také na jiné ribosomální *rrn* P1 i neribosomální promotory. Pro tento účel jsme vybrali další dva promotory *rrn* P1 (*rrnA* P1 a *rrnJ* P1) a také tři neribosomální promotory (*Pilv*, *PgcaD* a *PinfC*).

Promotor *Pilv* řídí transkripci genů, které se účastní biosyntézy isoleucinu, leucinu a valinu (Ward & Zahler, 1973). Transkripci iniciuje pomocí ATP a je vůči tomuto iNTP silně senzitivní. Senzitivita promotoru *Pilv* k ATP se v buňce uplatňuje během hladovění po aminokyselinách (tzv. stringentní odpověď), kdy se koncentrace GTP a ATP pohybují opačným směrem. Hladina GTP klesá, zatímco hladina ATP stoupá. Toho buňka využívá mimo jiné i ke stimulaci transkripce řízené promotorem *Pilv* vedoucí k syntéze nových aminokyselin, které jsou pro bakterii nacházející se v tomto fyziologicky nepříznivém stavu potřebné (Eymann *et al.*, 2002; Krásný *et al.*, 2008; Tojo *et al.*, 2008). Pro potřeby našich experimentů jsme (podobně jako u promotoru *Pveg*) použili upravenou variantu promotoru *Pilv*, kde byl adenin v pozici +1 nahrazen guaninem. Tento upravený promotor je tak senzitivní vůči GTP, což usnadňuje interpretaci naměřených dat. Podobně jako u promotoru *Pveg*, kromě výše popsaného efektu tato záměna nemá žádný další vliv na vlastnosti tohoto promotoru (Krásný *et al.*, 2008).

Další dva promotory, které nepatří do skupiny ribosomálních promotorů, jsme hledali mezi promotory, které řídí geny, jejichž aktivita se během stringentní odpovědi snižuje. Hledali jsme tedy promotory s touto vlastností, které transkripci iniciují pomocí GTP. Do takové skupiny patří promotory *PinfC* a *PgcaD* (Tojo *et al.*, 2008), a proto jsme u obou těchto promotorů předpokládali, že budou senzitivní k [iNTP]. Promotor *PinfC* řídí transkripci obsáhlého operonu *infC-rpmL-rpkT-ysdA*, který kóduje geny pro translační iniciační faktor IF3 a geny pro ribosomální proteiny L35 a L20 (Wipat *et al.*, 1996). Gen *ysdA* kóduje protein, jehož funkce doposud nebyla objasněna. Je známo, že operon *infC-rpmL-rpkT-ysdA* je auto regulován pomocí atenuace (Choonee *et al.*, 2007). Poslední

vybraný promotor *PgcaD* řídí transkripci genu, který u *B. subtilis* kóduje enzym uridylyltransferáza (Hove-Jensen, 1992).

Pro všechny výše uvedené promotory jsme stanovili hodnoty jejich K_{GTP} . V prvním experimentu jsme potvrdili úlohu sekvence DNA promotorového jádra (oblasti od pozice -39 až po pozici +1), která je podstatou mechanismu senzitivity těchto promotorů k [iNTP]. Pro tento experiment jsme vybrali ribosomální promotory *rrnA* P1 a *rrnJ* P1. Pro oba promotory jsme vytvořili dvě varianty konstruktů. První varianta konstruktů zahrnovala pouze sekvenci promotorového jádra, přičemž v druhé variantě konstruktů byla jeho součástí také oblast širšího okolí promotoru (-150 až +50). Sekvence promotorových konstruktů *rrnA* P1 (konstrukt #14) a *rrnJ* P1 (konstrukt #18) jsou uvedeny na obrázku 26 (str. 81). Sekvence prodloužených konstruktů odvozených od promotorů *rrnA* P1 a *rrnJ* P1 (promotorové konstrukty #34 a 37) na obrázku 26 (str. 81) z prostorových důvodů neuvádím, neboť se jedná, vzhledem k sekvencím promotorových jader obou výše zmíněných konstruktů o totožné sekvence, které jsou prodloužené na 5' konci promotoru o 150 bp a na 3' konci promotoru o 50 bp. V transkripci *in vitro* jsme porovnávali hodnoty K_{GTP} všech čtyř promotorových variant. Ukázalo se, že tyto hodnoty jsou srovnatelné u obou variant pro každý promotor (obr. 25, str. 80). Naše výsledky jsou tedy v souladu s již dříve zjištěnými daty (Krásný & Gourse, 2004) a potvrzují, že je to především sekvence promotorového jádra, která je zodpovědná za senzitivitu těchto promotorů k [iNTP]. V dalších experimentech jsme se proto soustředili na sekvenci promotorového jádra.



Obr. 25: Porovnání hodnot K_{GTP} u promotorů *rrnA* P1, *rrnJ* P1 jednak ve formě promotorových jader a jednak ve formě jejich prodloužených variant („long“). Čísla pod osou x grafu znázorňují promotorové konstrukty #14 (*rrnA* P1), #34 (*rrnA* P1 long), #18 (*rrnJ* P1) a #37 (*rrnJ* P1 long). Hodnoty K_{GTP} jsou uvedeny nad grafem.

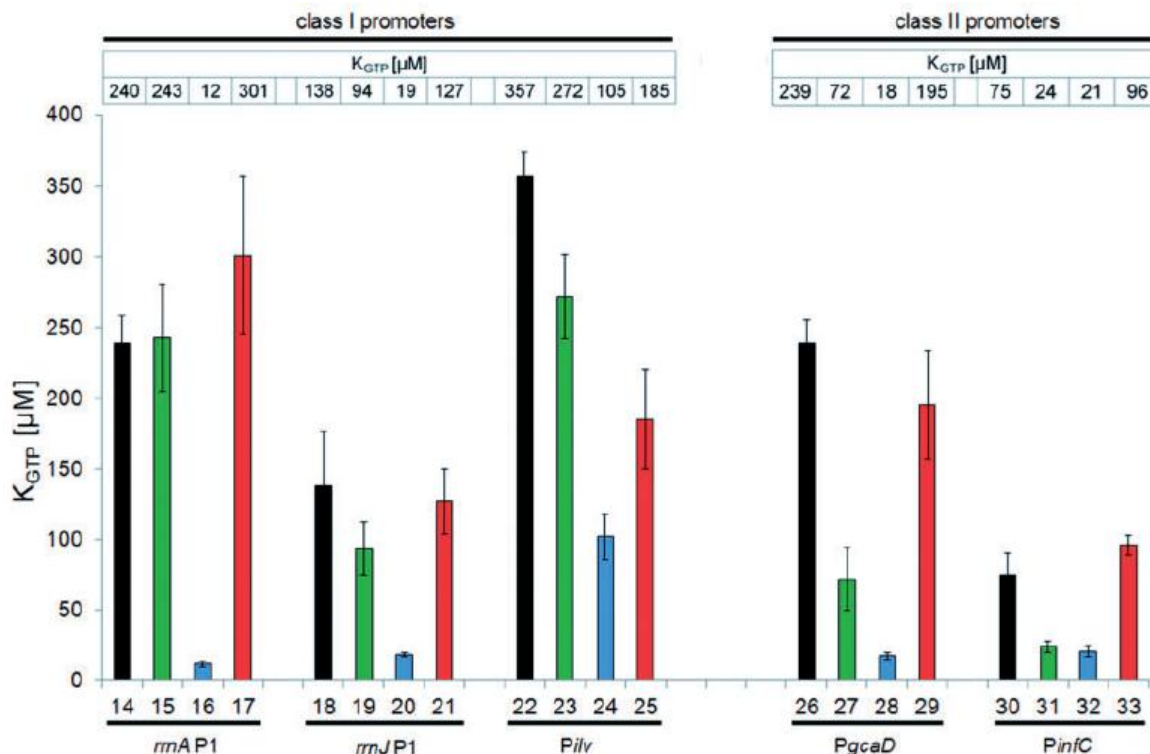
Pro testování výše zmíněných pěti vybraných promotorů (*rrnA* P1, *rrnJ* P1, *Pilv*, *PinfC* a *PgcaD*) jsme od každého z nich připravili čtyři varianty konstruktů: (i) promotorové jádro; (ii) chiméřní promotor, kde jsme promotorovou 5' oblast z promotoru *Pveg* (sekvence od 3 bp před hexamerem -35 až po hexamer -10 včetně) fúzovali s 3' oblastí (od hexameru -10 včetně až po pozici +1) testovaného promotoru (analogicky k promotorovému konstruktů #4 na obr. 16, str. 68); (iii) chiméřní promotor složený ze sekvence 5' oblasti testovaného promotoru a 3' oblasti promotoru *Pveg* (analogicky k promotorovému konstruktů #9 na obr. 16, str. 68) a (iv) chiméřní promotor složený z 5' oblasti promotoru *rrnB* P1 a 3' oblasti testovaného promotoru. Sekvence všech těchto chiméřních konstruktů jsou uvedeny na obrázku 26 (str. 81).

		#	class I promoters	-35	-10	+1
<i>rrnA</i> P1	14	<i>rrnA</i> P1	GTA TTGACT TAGACA ACTGAAGGTGT TAT TCCT AA TATACG			
	15	<i>Pveg</i> -10D <i>P1</i>	TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGT TG TAT TCCT AA TATACG			
	16	<i>rrnA</i> P1-10D <i>veg</i>	GTA TTGACT TAGACA ACTGAAGGTGT TACA ATAA ATGT . G			
	17	<i>rrnB</i> P1-10D <i>P1</i>	CTAT TGCA A TAAATAA ATACAGGTGT TATTCCT AA TATACG			
<i>rrnJ</i> P1	18	<i>rrnJ</i> P1	CTA TTGACT TATTATTTACTAGGTGG TATAT ATTATTC G			
	19	<i>Pveg</i> -10D <i>JP1</i>	TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGT TG TAT AT ATTATTC G			
	20	<i>rrnJ</i> P1-10D <i>veg</i>	CTA TTGACT TATTATTTACTAGGTGG TACA ATAA ATGT . G			
	21	<i>rrnB</i> P1-10D <i>JP1</i>	CTAT TGCA A TAAATAA ATACAGGTGT TATAT ATTATTC G			
<i>Pilv</i>	22	<i>Pilv</i>	CTG TTGACT TCGGTCCAAAGCGGCG TAATAT GAGTTC GG			
	23	<i>Pveg</i> -10D <i>Pilv</i>	TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGT TG TA ATAT GAGTTC GG			
	24	<i>Pilv</i> -10D <i>veg</i>	CTG TTGACT TCGGTCCAAAGCGGCG TACA ATAA ATGT . G			
	25	<i>rrnB</i> P1-10D <i>Pilv</i>	CTAT TGCA A TAAATAA ATACAGGTGT TAATAT GAGTTC GG			
<i>PgcaD</i>	#	class II promoters				
	26	<i>PgcaD</i>	TCC TTGAA ATCAGAAGATATTTAGGA TATAT TTTCTAT G			
	27	<i>Pveg</i> -10D <i>gcaD</i>	TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGT TG TAT AT TTTCTAT G			
	28	<i>PgcaD</i> -10D <i>veg</i>	TCC TTGAA ATCAGAAGATATTTAGGA TACA ATAA ATGT . G			
29	<i>rrnB</i> P1-10D <i>gcaD</i>	CTAT TGCA A TAAATAA ATACAGGTGT TATAT TTTCTAT G				
<i>PinfC</i>	30	<i>PinfC</i>	TCC TTGACT TAAAGATCCGGTATTGTG TAGAA AGTTATT G			
	31	<i>Pveg</i> -10D <i>infC</i>	TAT TTGACA AAAAATGGGCTCGTGT TG TAG AA AGTTATT G			
	32	<i>PinfC</i> -10D <i>veg</i>	TCC TTGAA TAAAGATCCGGTATTGTG TACA ATAA ATGT . G			
	33	<i>rrnB</i> P1-10D <i>infC</i>	CTAT TGCA A TAAATAA ATACAGGTGT TAGAA AGTTATT G			

Obr. 26: Porovnání sekvencí DNA promotorových konstruktů odvozených od *rrnA* P1, *rrnJ* P1, *Pilv*, *PinfC* a *PgcaD* (konstrukty #14 až #33), (Sojka *et al.*, 2011). Hexamery -35, -10 a pozice +1 jsou v sekvenci zdůrazněny červeně. Promotor *Pilv* transkripci iniciuje ze dvou možných transkripčních startů. Preferována je pozice +1 vzdálená 7 bp od hexameru -10.

U všech výše uvedených promotorových konstruktů jsme porovnávali hodnoty jejich K_{GTP} , které uvádím na obrázku 27 (str. 83). Oba promotory pro rRNA *rrnA* P1 a *rrnJ* P1 vykazují charakteristiky podobné promotoru *rrnB* P1. Do této kategorie promotorů jsme zařadili i promotor *Pilv*, i když hodnoty jeho K_{GTP} jsou ve všech případech v porovnání s ostatními vždy o něco vyšší, což je nepochybně dáno silnou senzitivitou samotného promotorového jádra *Pilv* k [iNTP]. 3' oblast promotorů *rrnA* P1, *rrnJ* P1 a *Pilv* má obdobně jako u promotoru *rrnB* P1 dominantní vliv na senzitivitu zmiňovaných promotorů k [iNTP]. Tato vlastnost byla hlavním kritériem rozdělení testovaných promotorů do dvou tříd. Promotory *rrnA* P1, *rrnJ* P1 a *Pilv* jsme přiřadili do hypotetické I. třídy senzitivních promotorů. U promotorů *PgcaD* a *PinfC* jsme nepozorovali efekt promotorové 3' oblasti na senzitivitu k [iNTP]. Naopak obě promotorové oblasti (oblasti 3' i 5') jsou u těchto dvou promotorů vyžadovány pro jejich senzitivitu k [iNTP]. Promotory *PgcaD* a *PinfC* jsme proto zařadili do hypotetické II. třídy senzitivních promotorů. U obou těchto promotorů jsme pozorovali zajímavou vlastnost z hlediska jejich senzitivity k [iNTP]. I přes fúzi 5' oblasti promotoru *rrnB* P1 k 3' oblasti testovaných promotorů II. třídy si oba chimérické promotory zachovaly vlastnosti promotorů senzitivních k [iNTP] (konstrukty #29 a #33; obrázek 27, str. 83).

Dle našich výsledků je tedy zřejmé, že z hlediska senzitivity promotorů k [iNTP] u *B. subtilis* existují dvě třídy promotorů. U promotorů I. třídy je to 3' oblast promotoru (oblast včetně hexameru -10 až po pozici +1), která zastává hlavní roli v senzitivě těchto promotorů k [iNTP]. Promotory *B. subtilis* pro rRNA jsou typickými zástupci promotorů této třídy. U promotorů II. třídy samotná 3' oblast promotoru tuto roli v senzitivě k [iNTP] neplní a provedení dalších studií bude nutné pro určení elementů DNA zodpovědných za regulaci těchto promotorů pomocí koncentrace iNTP. Do II. třídy senzitivních promotorů jsme na základě námi získaných výsledků zařadili promotory *PgcaD* a *PinfC*.



Obr. 27: Porovnání hodnot K_{GTP} promotorů I. a II. třídy (Sojka *et al.*, 2011). Promotorové konstrukty #14 až #33. Barevné kódování bylo zvoleno pro snadnější orientaci v obrázku a odpovídá kódování na předešlém obrázku 26, kde jsou uvedeny sekvence DNA všech zobrazených promotorů. Hodnoty K_{GTP} jsou uvedeny v tabulce nad obrázkem.

7. Vlastnosti promotorové sekvence DNA zodpovědné za senzitivitu promotorů dalších bakteriálních druhů k [iNTP]

Zajímalo nás, zdali promotory jiných bakteriálních druhů vykazují sekvenční vlastnosti promotorů *B. subtilis* senzitivních k [iNTP]. V tabulce 5 (str. 84) je uvedeno porovnání sekvencí vybraných promotorů získaných z internetové databáze osekvenovaných bakteriálních genomů. V rámci skupiny gram pozitivních bakterií jsme promotorové sekvence hledali u dvou bakteriálních kmenů. Prvním z nich byl kmen Firmicutes. Jedná se o rozsáhlou skupinu bakterií s nízkým obsahem párů G + C. Patří sem rody *Bacilli*, *Clostridia* a *Mollicutes*. Některé fylogenetické zdroje řadí rod *Mollicutes* do samostatného kmene Tenericutes (Wolf, 2004). Druhým kmenem byla skupina Actinobacteria. Jedná se o menší skupinu bakteriálních rodů s vysokým obsahem párů G + C (Ventura *et al.*, 2007).

Do porovnání v tabulce 5 jsme zařadili také sekvence promotorů *rrn* P1 vybraných z genomů tří gram negativních bakterií. Strategie výběru promotorových sekvencí uvedených v tabulce 5, stejně tak pozice promotorových sekvencí v genomech uvedených bakteriálních druhů jsou popsány v kapitole Přístroje, materiál a metody.

				-35	-10	+1
G+	F	Bacilli	Bsu	CTATTGCAATAAATAAATACAGGTGTTATATTATTAACG		
			Ban*	CTATTGCATTTTAATAATCAAACGGTATATTATATTTCG		
			Bpu	CTATTGCAAGGAAAGAATCAAGATGGTATATTATATTTCG		
			Lmo	TGCTTGCAATCCCTATAAAAACATGATATATTATTAACG		
			Pae	TACTTGCAATCCATTAGGCGTTCATGGTATATTATCTCTTG		
			Sau	CTATTGAAATTCGAACAAATACATAATAAAATAATATTTG		
			Lac	GATTGCCAAAAGGAAGAAAATAAGGTAAATTAATAAAG		
			Spn	TAGTTGACAAAGTTTGAAAAGACTGTATAATAGTAAGAG		
			Clostridia	Cdi	GTATTGACCTACTGTTTTAAAGATGGTATAGTATTACTTG	
		Cpe		ATGTTGACAAAGTTCGAAAGTGATGTTAAACTAAAGAAG		
		Tte		AGATTGAACATAGGCTAAAAAGATGGTATATTAATAACG		
		Mollicutes	Mag	GTTTGGATCTATATATCGAAAACGGATAATTATTTTCGG		
			Upa	ATCTTGACATTTTCTACACTTTTTTAATATAATCTTCTAG		
	A	Msm	GATTGACTCCCAGTTTCCAAGGACGTAACCTATCCAGG			
Sno		AAGTTGACACCCCCCTACCCGATCCGTAGTGTCTCCGAG				
				-35	-10	+1
G-			Eco	TGCTTGTGTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCA		
			Vch	TACTTGACAATATAACTAGGTTCTCTATAATCCGCCCTCA		
			Sen	CGCTTGTCTTCTGAAACCGACTCCCTATAATGCGCCTCCA		

Tab. 5: Porovnání sekvencí promotorů *rrn* P1 vybraných bakteriálních druhů (Sojka *et al.*, 2011). Význam zkratk: G+, gram pozitivní bakterie; G-, gram negativní bakterie; F, Firmicutes; A, Actinobacteria. Bsu, *Bacillus subtilis*; Ban*, *Bacillus anthracis*, *identickou promotorovou sekvencí jsme našli také u *Bacillus cereus* a *Bacillus thuringiensis*; Bpu, *Bacillus pumilus*; Lmo, *Listeria monocytogenes*; Pae, *Paenibacillus sp.*; Sau, *Staphylococcus aureus*; Lac, *Lactobacillus acidophilus*; Spn, *Streptomyces pneumoniae*; Cdi, *Clostridium difficile*; Cpe, *Clostridium perfringens*; Tte, *Thermoanaerobacter tencongensis*; Mag, *Mycoplasma agalactiae*; Upa, *Ureaplasma parvum*; Msm, *Mycobacterium smegmatis*; Sno, *Streptomyces nodosus*; Eco, *Escherichia coli*; Vch, *Vibrio cholerae*, a Sen, *Salmonella enteritica*. Hexamery -35, -10 a pozice +1 jsou znázorněny tučně. Thymin v pozici -5 (resp. T v pozici 3 bp od hexameru -10 ve směru k pozici +1) je znázorněn tučně a podtrženě.

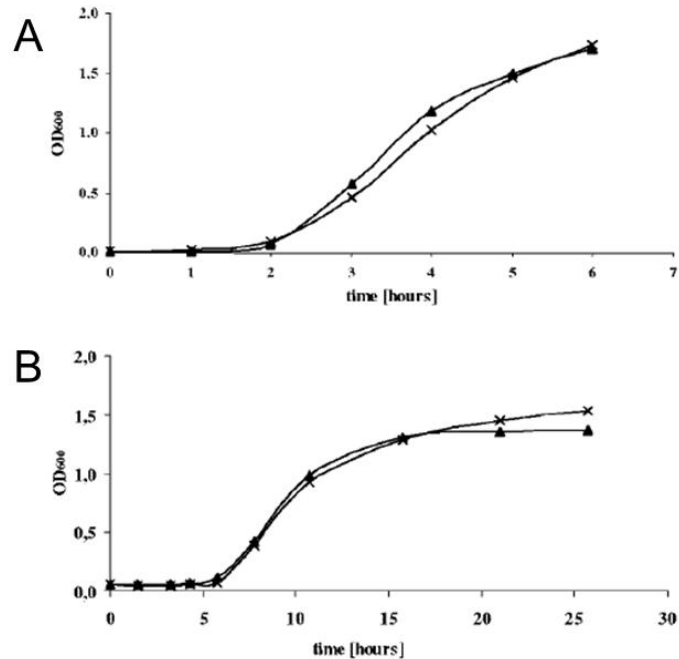
Promotorové sekvence většiny zástupců kmene Firmicutes vykazují sekvenční vlastnosti podobné těm, které jsme popsali u promotorů *rrn* P1 *B. subtilis*. Všechny promotory uvedené v horní části tabulky 5 pro *Bacilli*, *Clostridia* a *Mollicutes* (str. 84)

transkripci pravděpodobně iniciují pomocí GTP (transkripční start nebyl experimentálně ověřován, úsudek vyplývá z vizuální kontroly promotorové sekvence). Podobně byl u většiny promotorů identifikován thymin v pozici -5. Tato zjištění nás vedou k hypotéze, že výsledky objasňující senzitivitu promotorů k [iNTP] u *B. subtilis* by mohly být aplikovatelné i na bakteriální druhy z rozsáhlého kmene Firmicutes. Promotorové sekvence bakteriálních druhů kmene Actinobacteria se z hlediska své sekvence více podobají zástupcům gram negativních bakterií. Sekvence jejich diskriminátoru (oblast mezi hexamerem -10 a pozicí +1) je bohatá na guanin a cytosin, což je typická vlastnost rRNA promotorů gram negativních bakterií (Gonzalez-y-Merchand *et al.*, 1996; Yap & Wang, 1999). Je však třeba zmínit, že i u těchto promotorů jsme identifikovali thymin v pozici -5.

Výsledky – část II

1. Inaktivace genu *ybxF* v genomu *B. subtilis*

Prvotním přístupem pro objasnění funkce proteinu YbxF u *B. subtilis* byla delece genu *ybxF*, který tento protein kóduje, za účelem zjištění případné esenciality tohoto genu. Pro inaktivaci genu *ybxF* byly zvoleny dva kmeny, prototrofní kmen *B. subtilis* (168) a čtyřnásobný auxotrofní mutant ALMT (ALMT). Tento kmen byl zvolen z důvodů jeho růstové závislosti na adeninu, leucinu, methioninu a threoninu, která zjednodušila identifikaci rekombinantů. Genotyp obou výchozích kmenů *B. subtilis* je uveden v tabulce 1 (str. 44) v kapitole Přístroje, materiál a metody. Samotný konstrukt pro inaktivaci *ybxF* byl připraven postupnou metodou pomocí PCR za použití templátu izolovaného z kmene 168 a z kmene nesoucího rezistenci ke streptomycinu (mutace v genu *rpsL*, který sousedí s genem *ybxF* ve *str* operonu). Pomocí obou variant konstruktů a obou parentálních kmenů *B. subtilis* tak vznikly celkem čtyři mutantní kmeny *B. subtilis* s inaktivovaným genem *ybxF* (168 $\Delta ybxF$ *cat*; 168 $\Delta ybxF$ *cat str*; ALMT $\Delta ybxF$ *cat*; ALMT $\Delta ybxF$ *cat str*). Genotyp všech kmenů je uveden v tabulce 1 (str. 44) a strategie přípravy konstruktů pro inaktivaci *ybxF* je popsána v kapitole Přístroje, materiál a metody. Důvodem inaktivace genu *ybxF* současně i ve kmenu *B. subtilis* rezistentním ke streptomycinu byla možnost otestování případného vlivu delece *ybxF* na senzitivitu vůči tomuto antibiotiku. Obrázek 28 (str. 87) znázorňuje typické růstové křivky jednoho z mutantních kmenů *B. subtilis* s inaktivovaným genem *ybxF* ($\Delta ybxF$) a rodičovského kmene (wt) v médiu bohatém (28A) a chudém (28B) na živiny (str. 87). Z obrázku je zřejmé, že se růstové křivky obou kmenů od sebe nijak nelišily. Všechny mutantní kmeny s inaktivovaným genem *ybxF* byly následně podrobeny rozsáhlé funkční analýze. Kromě prvotního určení generační doby mutantů jsme testovali schopnost sporulace, vliv teploty na růst a senzitivitu k inhibitorům (8 % ethanol, 1 M NaCl, 0,0007 % SDS). V žádném z testů však nebyl případný efekt delece *ybxF* pozorován. Podobně nebyl zjištěn ani vliv inaktivace *ybxF* na rezistenci mutantních kmenů k antibiotiku streptomycin.



Obr. 28: Růstové křivky mutantního kmene *B. subtilis* s inaktivovaným genem *ybxF* ($\Delta ybxF$) a parentálního kmene (168), (Sojka *et al.*, 2007). (A) kultivace v bohatém Spizizenově médiu; (B) kultivace ve Spizizenově minimálním médiu. Černé křížky označují růstovou křivku kmene $\Delta ybxF$; černé trojúhelníky označují růstovou křivku parentálního kmene (168).

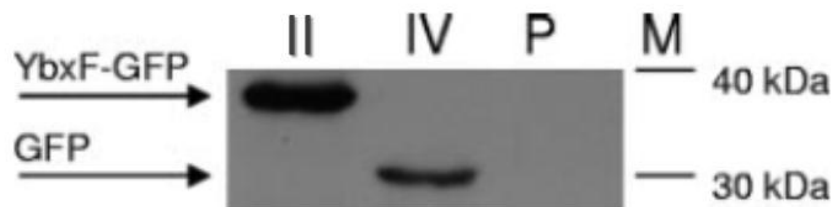
2. Inaktivace paralogního genu *ymxC* v genomu *B. subtilis*

Vzhledem k tomu, že efekt inaktivace *ybxF* u *B. subtilis* nebyl pozorován, rozhodli jsme se přistoupit k inaktivaci genu *ymxC*, který je v genomu *B. subtilis* paralogním genem *ybxF*. Tuto delecí jsme provedli z důvodu možného funkčního zastoupení produktů obou těchto genů. Funkce genu *ymxC* v *B. subtilis* je taktéž neznámá, stejně jako funkce *ybxF*. Podobným způsobem jako gen *ybxF* jsme tedy inaktivovali také gen *ymxC* (kmen $\Delta ymxC$, popis inaktivace je uveden v kapitole Přístroje, materiál a metody). I v případě genu *ymxC* jsme došli k závěru, že jeho delece nemá žádný vliv na celkový fenotyp *B. subtilis*. Následně jsme geny *ybxF* a *ymxC* inaktivovali v rámci jednoho kmene *B. subtilis* ($\Delta ybxF \Delta ymxC$) a ani u tohoto dvojité mutantního kmene jsme vliv inaktivace obou genů nepozorovali. Došli jsme k závěru, že gen *ymxC* a stejně tak i gen *ybxF* nepatří u *B. subtilis* mezi esenciální geny.

3. Lokalizace proteinu YbxF v *B. subtilis*

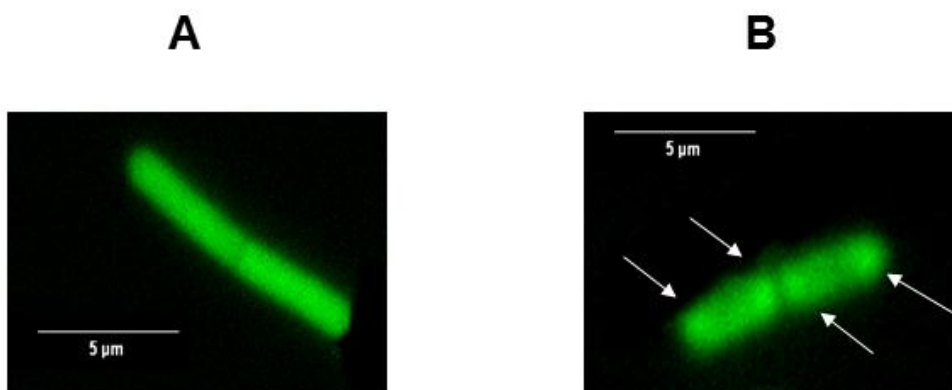
Vzhledem k tomu, že gen *ybxF* je součástí důležitého *str* operonu, provedli jsme testy lokalizace a distribuce proteinu YbxF v *B. subtilis*. Pro tento účel jsme připravili kmen *B. subtilis*, do jehož chromozomu jsme vložili kopii genu *ybxF* fúzovanou s genem *gfp*, který kóduje tzv. zelený fluorescenční protein (dále jen GFP). Součástí konstruktů byl také inducibilní promotor (*P_{xyl}*), který je senzitivní ke koncentraci xylózy a umožnil nám tak v buňce regulovat expresi fúzního proteinu YbxF-GFP. Takto připravený konstrukt jsme integrovali do místa *amyE* v chromozomu parentálního kmene *B. subtilis* (kmen číslo I; *ybxF⁺ ybxF-gfp*) a kmene s inaktivovaným genem *ybxF* (kmen číslo II; $\Delta ybxF ybxF-gfp$). Současně jsme připravili také dva kontrolní kmene, jejichž chromozom obsahoval místo genu *ybxF* fúzovaného s *gfp* pouze samotný gen *gfp* (kmen číslo III; *ybxF⁺ gfp*) a kmen číslo IV; $\Delta ybxF gfp$). Úspěšná příprava zmíněných kmenů byla ověřena jak sekvenačně, tak metodou Western blot použitím protilátky proti GFP (obr. 29, str. 88). Seznam kmenů a jejich genotyp je uveden v tabulce 1 (str. 44) v kapitole Přístroje, materiál a metody.

Růstová rychlost kmene *B. subtilis* produkujícího samotný protein GFP a stejně tak růstová rychlost kmene produkujícího fúzní protein YbxF-GFP odpovídala růstové rychlosti parentálního kmene *B. subtilis*. U obou kmenů jsme úspěšně detekovali emisi GFP. Tato fakta dokazují, že produkce samotného GFP a stejně tak proteinu YbxF fúzovaného s GFP nemá na růst či životaschopnost *B. subtilis* žádný vliv.



Obr. 29: Detekce fúzního proteinu YbxF-GFP a samotného proteinu GFP v sonikátech *B. subtilis* metodou Western blot (Sojka *et al.*, 2007). Kmen číslo II, $\Delta ybxF ybxF-gfp$; IV, $\Delta ybxF gfp$; P, rodičovský kmen 168 (*ybxF⁺*); M, marker.

V následujícím experimentu jsme porovnávali intenzitu fluorescenčních signálů kmenů *B. subtilis* nesoucích samotné GFP a fúzní protein YbxF-GFP během exponenciální a stacionární fáze růstu. Zjistili jsme, že intenzita fluorescence je výrazně silnější během exponenciální fáze růstu bakterie. Naopak u spor výše uvedených kmenů *B. subtilis* nebyla žádná fluorescence detekována (data nepublikována). Fluorescenční signál odpovídající samotnému proteinu GFP (kmen číslo IV, $\Delta ybxF$ *gfp*) byl rozložen rovnoměrně po celé buňce, jak během exponenciální (obr. 30A, str. 89), tak během stacionární fáze růstu, což je výsledek, který je v souladu s již dříve publikovanými daty (Mascarenhas *et al.*, 2001). Naopak u kmene, kde byl produkován fúzní protein YbxF-GFP (kmen číslo II, $\Delta ybxF$ *ybxF-gfp*) nebyl fluorescenční signál rozložen rovnoměrně, nýbrž jeho intenzita byla výrazně zesílena v oblastech pólů buňky (obr. 30B, str. 89). Bipolární rozložení v rámci buňky je charakteristické pro ribosomy, které jsou zejména v exponenciální fázi růstu ze středu buňky vytlačovány do stran buněčným jádrem (Lewis *et al.*, 2000; Mascarenhas *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2006). K tomuto efektu nedochází u bakterií během stacionární fáze růstu. Z těchto výsledků vyplynula hypotéza, že by se protein YbxF u *B. subtilis* mohl vázat na ribosom a to během exponenciální fáze růstu.



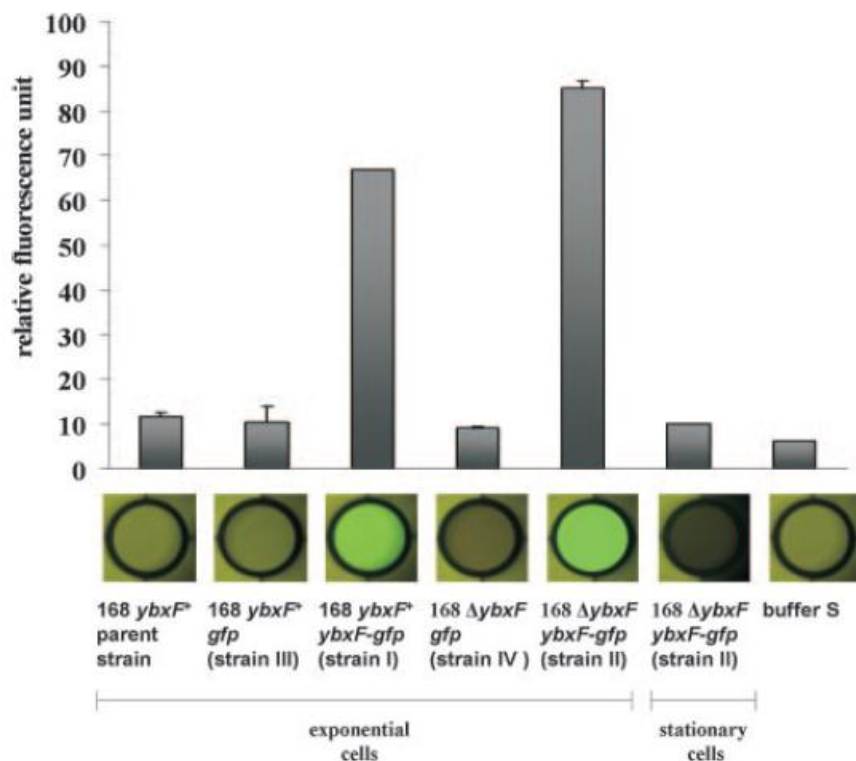
Obr. 30: Fluorescence GFP buněk *B. subtilis* z exponenciální fáze růstu (Sojka *et al.*, 2007). (A): fluorescence samotného GFP u kmene číslo IV ($\Delta ybxF$ *gfp*); (B): fluorescence fúzního proteinu YbxF-GFP u kmene číslo II ($\Delta ybxF$ *ybxF-gfp*); šípky znázorňují místa zesílené intenzity fluorescence odpovídající pólům buňky.

4. YbxF – součást ribosomu exponenciálně rostoucích bakterií *B. subtilis*

Abychom zjistili, zdali se protein YbxF skutečně váže na ribosom *B. subtilis*, provedli jsme izolaci ribosomů z kmenů číslo I až IV, jak z exponenciálně rostoucích, tak ze stacionárních buněk. Ribosomy jsme po izolaci a důkladné purifikaci testovali na intenzitu fluorescence GFP (obr. 31, str. 91). Z obrázku 31 je patrné, že pouze ribosomy izolované z kmene I (*ybxF⁺ ybxF-gfp*) a z kmene II (Δ *ybxF ybxF-gfp*) vykazovaly silnou fluorescenci GFP i přes veškeré provedené centrifugační a purifikační kroky (podrobně v kapitole Materiál & metody). Je tedy zřejmé, že u exponenciálně rostoucích bakterií *B. subtilis* je protein YbxF součástí ribosomu. Fluorescenční signál ribosomů izolovaných z kmene II postrádajícího původní kopii genu *ybxF* (Δ *ybxF ybxF-gfp*) byl silnější nežli signál odpovídající ribosomům izolovaným z kmene I, kde byla kopie původního genu *ybxF* součástí genomu (*ybxF⁺ ybxF-gfp*). Slabší fluorescence kmene I je pravděpodobně důsledkem kompetice původního proteinu YbxF a fúzního proteinu YbxF-GFP o stejné vazebné místo na ribosomu. Je třeba zmínit, že vzhledem k mírnému rozdílu ve fluorescenci kmene I a II byl tento kompetitivní efekt velmi slabý, což odpovídá silné a tedy převažující expresi fúzního proteinu YbxF-GFP kontrolované inducibilním promotorem.

V kontrolním experimentu jsme ribosomy izolovali zcela identickým způsobem také z exponenciálně rostoucích kmenů číslo III (*ybxF⁺ gfp*) a IV (Δ *ybxF gfp*). Oba tyto kmeny produkovaly pouze volný protein GFP a fluorescence suspenze jejich ribosomů byla velmi slabá, odpovídající pouze pozadí. Tento experiment tedy vyloučil jak vazbu samotného GFP na ribosom, tak i vazbu proteinu YbxF na ribosom prostřednictvím proteinu GFP (obr. 31, str. 91).

Ribosomy izolované z kmenů I (*ybxF⁺ ybxF-gfp*) a II (Δ *ybxF ybxF-gfp*) ve stacionární fázi růstu neprojevovaly žádnou fluorescenci (obr. 31, str. 91). I přes přítomnost fúzního proteinu YbxF-GFP v obou výše uvedených kmenech, protein YbxF v této fázi růstu tak již pravděpodobně není součástí ribosomu.

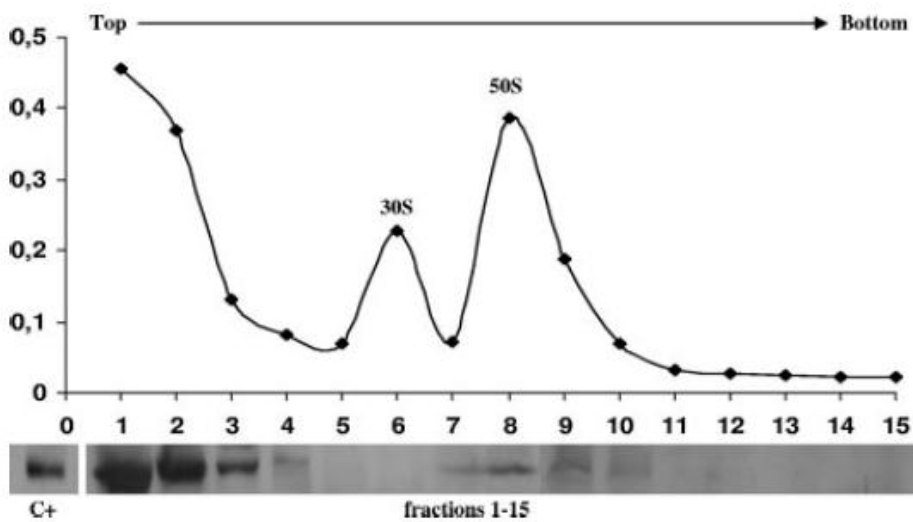


Obr. 31: Fluorescence GFP ribosomů izolovaných z *B. subtilis* (Sojka *et al.*, 2007). Kmeny *B. subtilis*, které byly zdrojem izolovaných ribosomů, jsou uvedeny u grafu pod osou x. „Buffer S“ odpovídá negativní kontrole (roztok pufru použitý pro uchovávání ribosomů).

5. Lokalizace proteinu YbxF na ribosomu *B. subtilis*

Kmen číslo II *B. subtilis* (Δ *ybxF ybxF-gfp*) nesoucí pouze jedinou kopii genu *ybxF*, která byla fúzována na *gfp* jsme použili pro zjištění ke které ribosomální podjednotce se protein YbxF váže. Buněčné lyzáty kmene II získané během exponenciální fáze růstu jsme centrifugovali při vysokých otáčkách v sacharózovém gradientu za použití nízké koncentrace (0.3 mM) iontů Mg^{2+} . Tímto způsobem jsme dosáhli rozdělení ribosomů na podjednotky 50S a 30S. Jednotlivé frakce jsme testovali metodou Western blot na přítomnost fúzního proteinu YbxF-GFP za použití identické protilátky proti GFP, jako v předešlých experimentech (obr. 32, str. 92). Podle očekávání jsme největší množství fúzního proteinu detekovali ve vrchních frakcích supernatantu. Avšak menší část fúzního proteinu jsme detekovali i ve frakcích odpovídajících podjednotce 50S. Naopak ve frakcích odpovídajících podjednotce 30S nebyl

fúzní protein detekován. Tento výsledek naznačuje, že YbxF se váže na podjednotku 50S a zde zřejmě do oblasti vzájemného styku obou ribosomálních podjednotek. Při disociaci ribosomu na jednotlivé podjednotky pak dojde k uvolnění většiny YbxF a ten se tak detekuje v supernatantu.



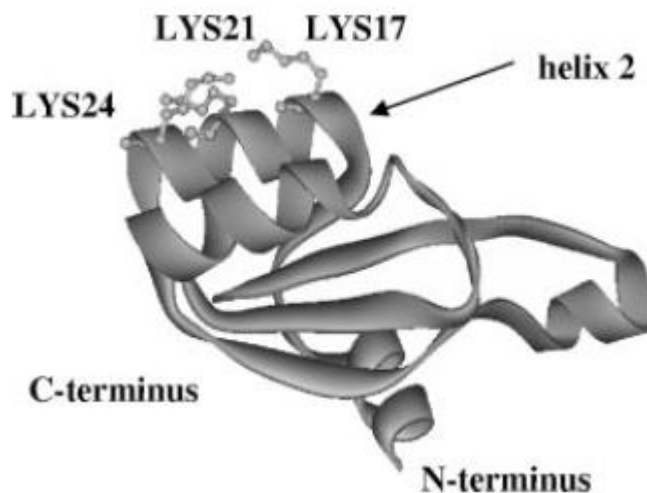
Obr. 32: Profil ribosomálních podjednotek 50S a 30S po jejich rozdělení v sacharózovém gradientu a detekce fúzního proteinu YbxF-GFP v jednotlivých frakcích metodou Western blot (Sojka *et al.*, 2007). Ribosomální frakce byly získány z exponenciálně rostoucích bakterií kmene II ($\Delta ybxF ybxF-gfp$). Výřez výsledků analýzy Western blot je uveden pod grafem. C+ odpovídá pozitivní kontrole [ribosomy z exponenciálně rostoucího kmene II ($\Delta ybxF ybxF-gfp$)].

6. Model proteinu YbxF vytvořený *in silico*

Pomocí dostupných krystalických struktur homologních proteinů jsme ve spolupráci s Ivanem Barvíkem z Matematicko-fyzikální fakulty UK v Praze vytvořili modely proteinu YbxF *in silico*. Jako templáty pro modelování byly použity modely kvasinkového ribosomálního proteinu L30e, ribosomálního proteinu L30e pocházejícího z klíčků pšenice a ribosomálního proteinu L7ae z *Pyrococcus abyssi* (Chao *et al.*, 2003; Charron *et al.*, 2004; Halic *et al.*, 2005). Protein YbxF je z hlediska své aminokyselinové sekvence identický z 19,5 % s kvasinkovým proteinem L30e, z 23 % s pšeničným L30e a ze 40 % s L7ae

z *P. abyssii*. Všechny tři modely YbxF měly velmi podobný strukturní charakter, což je v souladu s vysokou podobností výchozích modelů samotných homologních proteinů. Všechny proteiny mají charakteristické hydrofobní jádro, které se skládá ze čtyř β -listů obklopených čtyřmi α -helixy. Druhý α -helix (počítáno od N-konce) se skládá z 12 aminokyselin. Krajní glycinové zbytky jsou podstatou specifické flexibility obou konců druhého α -helixu. Sekvence tohoto α -helixu vykazuje nejvyšší homologii mezi všemi čtyřmi proteiny. U kvasinkového proteinu L30e a u L7ae z *Haloarcula marismortui* byl druhý α -helix identifikován jako důležitý pro vazbu těchto proteinů na ribosom (Ban *et al.*, 2000; Halic *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2004).

Druhý α -helix proteinu YbxF obsahuje tři bazické aminokyselinové zbytky. Jedná se o lyzin v pozicích 17, 21 a 24 (K17, K21 a K24) tvořící na modelu YbxF strukturu, která silně vystupuje do okolního prostoru (obr. 33, str. 94). Sekvenční analýza provedená ze všech dostupných sekvencí proteinu YbxF a jeho homologů nám ukázala vysokou konzervovanost pozitivně nabitých aminokyselin v této oblasti. U proteinu YbxF se jedná o motif K17-K21-K24 následovaný motivem K-K-R u L30e a N34-K38-E41 u proteinů L7ae. Proteiny L30e a L7ae využívají první aminokyselinu helixu 2 pro kontakty se sekvencí rRNA či mRNA. Lyziny K21 a K24 proteinu YbxF na základě modelu vytvořeného dle pšeničného L30e a L7ae z *P. abyssii* předurčují kontakty s neznámým proteinovým „clusterem“ II respektive s ribosomálním proteinem L15e (Halic *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2004).



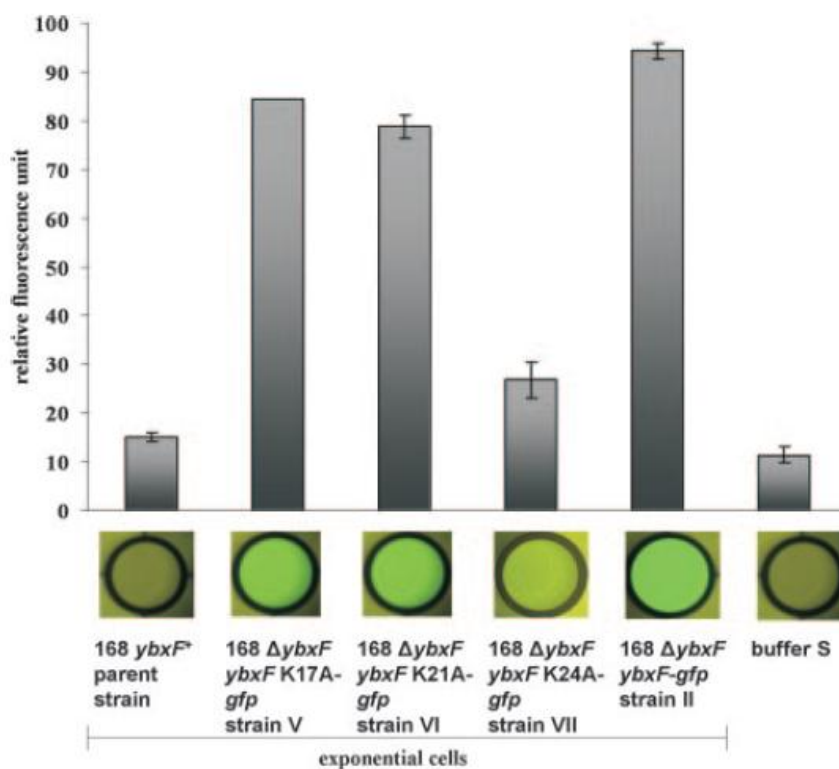
Obr. 33: 3D homologní model proteinu YbxF vytvořený *in silico* na základě homologní struktury ribosomálního proteinu L30e izolovaného z klíčků pšenice (Sojka *et al.*, 2007). Bazické aminokyseliny druhého α -helixu jsou zvýrazněny. Kód PDB použitého templátového modelu je 1YSH.

7. Úloha konzervovaných lyzinů ve vazbě YbxF na ribosom

V následujícím experimentu jsme testovali, zdali jsou vysoce konzervované lyziny v pozicích 17, 21 a 24 proteinu YbxF důležité pro vazbu tohoto proteinu na ribosom *B. subtilis* během exponenciální fáze růstu. Pro tento účel jsme připravili tři mutantní kmeny *B. subtilis*, jejichž součástí byl protein YbxF nesoucí vždy záměnu jednoho ze tří lyzinů za alanin. Takto upravenou sekvenci *ybxF* jsme fúzovali s *gfp*. Jednalo se o kmeny *B. subtilis* číslo V ($\Delta ybxF ybxF$ K17A-*gfp*), VI ($\Delta ybxF ybxF$ K21A-*gfp*) a VII ($\Delta ybxF ybxF$ K24A-*gfp*). Jejich genotyp je uveden v tabulce 1 v kapitole Přístroje, materiál a metody.

Z výše uvedených kmenů jsme v exponenciální fázi růstu izolovali ribosomy, které jsme následně testovali na intenzitu fluorescence proteinu GFP. Stejně jako u předešlých experimentů jsme na základě intenzity fluorescence GFP sledovali, zdali se fúzní protein YbxF-GFP váže na ribosom. Porovnávali jsme tak fluorescenci ribosomů izolovaných z kmenů V až VII a z kontrolního kmene II. V porovnání s ribosomy z kmene II ($\Delta ybxF ybxF$ -*gfp*) jsme zjistili silně zeslabenou fluorescenci odpovídající ribosomům izolovaným z kmene VII ($\Delta ybxF ybxF$ K24A-*gfp*), kde byl lyzin v pozici 24 nahrazen alaninem (obr. 34,

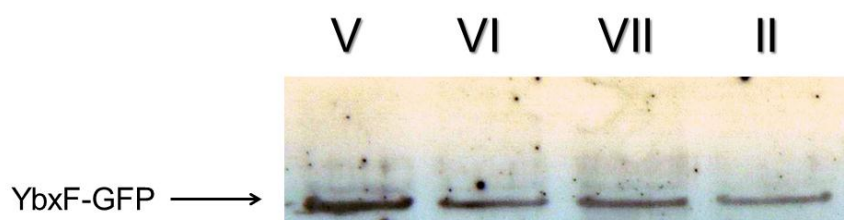
str. 95). Tento výsledek tedy ukázal, že lyzin v pozici 24 proteinu YbxF je zřejmě důležitý pro vazbu tohoto proteinu na ribosom. Fluorescence ribosomů z kmenů V ($\Delta ybxF ybxF$ K17A-*gfp*) a VI ($\Delta ybxF ybxF$ K21A-*gfp*) byla zeslabena v porovnání s kmenem II pouze mírně, což je zřejmě dáno pouze minoritní úlohou obou lyzinů K17 a K21 ve vazbě proteinu YbxF na ribosom.



Obr. 34: **Fluorescence GFP ribosomů izolovaných z *B. subtilis* – bodová mutagenese** (Sojka *et al.*, 2007). Kmeny *B. subtilis*, které byly zdrojem izolovaných ribosomů, jsou uvedeny u grafu pod osou x. „Buffer S“ odpovídá negativní kontrole (roztok pufru použitý pro uchování ribosomů).

V následujícím kontrolním experimentu jsme potvrdili, že rozdíly ve schopnosti mutantních proteinů YbxF-GFP vázat se na ribosom jsou způsobeny danou mutací a nikoliv rozdílnou mírou jejich exprese. Provedli jsme expresní analýzu těchto tří mutantních proteinů YbxF-GFP (buněčné lyzáty kmenů V, VI a VII), kterou jsme porovnávali s expresí proteinu YbxF-GFP ve své původní, nemutované podobě (buněčný lyzát kmene II). Kvantifikace exprese všech čtyř proteinů metodou Western blot s protilátkou proti GFP

rozhodně prokázala, že exprese mutantních proteinů YbxF-GFP není nižší než exprese nemutované formy YbxF-GFP. Nižší úroveň fluorescence ribosomů u mutovaných forem YbxF-GFP je tak zřejmě způsobena jejich nižší afinitou k mutovaným formám YbxF-GFP a nikoliv nižší koncentrací ribosomů. Primární výsledky jedné z Western blot analýz jsou uvedeny na obrázku 35 (str. 96).



Obr. 35: Exprese mutovaného fúzního proteinu YbxF-GFP u *B. subtilis*. Analýza Western blot protilátkou proti GFP. Ribosomy izolované z kmenů V ($\Delta ybxF ybxF$ K17A-*gfp*), VI ($\Delta ybxF ybxF$ K21A-*gfp*), VII ($\Delta ybxF ybxF$ K24A-*gfp*) a II ($\Delta ybxF ybxF$ -*gfp*).

Diskuze

V první části disertační práce je popsána problematika regulace iniciace bakteriální transkripce pomocí koncentrace iNTP. Tato regulace byla doposud nejvíce studována u gram negativní bakterie *E. coli*, na příkladu promotorů řídících transkripci genů pro ribosomální RNA. My jsme se zaměřili na studium této regulace u gram pozitivní bakterie *B. subtilis*, jak v případě ribosomálních, tak i neribosomálních promotorů. Hledali jsme elementy promotorové sekvence DNA, které jsou za tuto regulaci odpovědné. Tyto elementy jsme identifikovali a na základě jejich umístění v promotorové sekvenci jsme testované promotory senzitivní k [iNTP] rozdělili do dvou tříd. U promotorů I. třídy je hlavním senzorem [iNTP] 3' oblast promotoru, tj. hexameru -10 až po pozici +1, kdežto u promotorů II. třídy jsou to obě promotorové oblasti (3' a 5'), které jsou vyžadovány pro senzitivitu těchto promotorů k [iNTP].

Typickými zástupci skupiny promotorů I. třídy jsou promotory *rrn* P1. Regulační 3' oblast promotoru zodpovědná za jejich senzitivitu k [iNTP], kterým je vždy GTP, je při iniciaci součástí transkripční bubliny a senzitivita těchto promotorů k [iNTP] negativně koreluje se stabilitou jejich otevřených komplexů (promotory *rrn* P1 tvoří nestabilní otevřené promotorové komplexy). Hlavním limitujícím faktorem pro efektivní transkripční iniciaci z těchto promotorů je samotný velmi krátký časový interval, který má příchozí iNTP (iGTP) u těchto promotorů k dispozici. Důležitou roli v aktivitě těchto promotorů hraje thymin v pozici -5 v jejich 3' oblasti. Jeho role je obdobou úlohy vysoce konzervovaného cytosinu v pozici -7 ribosomálních promotorů *E. coli*. Z hlediska pozice této báze se nejedná o přímou homologii, neboť pozice -7 u *rrn* promotorů *E. coli* je v porovnání s pozicí -5 u *rrn* promotorů *B. subtilis* umístěna o 1 bp blíže sekvenci hexameru -10. Je třeba zmínit, že thymin v pozici -5 je také součástí 3' oblasti promotorů *PgcaD* a *PinfC*, ale v sekvenci promotoru *Pilv* se už v této pozici nevyskytuje. Absence thyminu v pozici -5 u promotoru *Pilv* by mohla být kompenzována sekvencí jeho 3' oblasti, která je relativně bohatá na guanin a cytosin. Na základě počítačového molekulárního *in silico* modelu RNAP z *B. subtilis* a sekvence promotoru tvořícího otevřený komplex jsme došli k závěru, že báze v pozici -5 *rrn* promotorů *B. subtilis* má potenciál vytvářet interakce se dvěma oblastmi RNAP. První možností je kontakt báze -5T s motivem 428-ERVVRE-433 podjednotky β

RNAP a druhou hypotetickou možností je kontakt této báze s regionem 1.2 podjednotky σ^A . Pro zcela přesvědčivé prokázání jedné z těchto možných interakcí je třeba provést další experimenty.

U promotorů II. třídy je citlivost na koncentraci iNTP podmíněna nejen určitou sekvencí 3' oblasti, ale i 5' oblastí. Je třeba zmínit, že sekvence 5' oblasti (-39 až -14) z promotoru *rrnB* P1 v sobě nese elementy, které v kombinaci s 3' oblastí promotorů II. třídy vytvářejí chiméru, která je nadále senzitivní k [iNTP]. Efekt 5' oblasti promotoru *rrnB* P1 ale není dominantní, což dokazuje výsledek získaný testováním senzitivity chimerního promotorového konstruktů #9 k [iNTP] *in vivo* (obr. 23, str. 78). Veškeré informace, které jsme doposud získali tak svědčí pro hypotézu, že jsou to právě různé kombinace promotorové sekvence, které stojí za senzitivitou promotorů k [iNTP]. Na základě doposud známých informací se tedy nedá určit obecně platné pravidlo pro senzitivitu promotorů k [iNTP] u *B. subtilis*. Pro přesné sekvenční vymezení elementů DNA zodpovědných za senzitivitu promotorů II. třídy bude nutné provést další experimenty.

Motiv rozšířené oblasti -10 je u *B. subtilis* součástí všech promotorů *rrn* P1 (Natori *et al.*, 2009). Bylo zjištěno, že tento motiv stabilizuje komplexy vytvořené mezi promotorovou sekvencí a RNAP (Camacho & Salas, 1999; Voskuil & Chambliss, 1998 a 2002) a tím dochází ke snížení hodnoty K_{NTP} . Výskyt tohoto motivu v sekvenci promotorů u *B. subtilis* je poměrně častý a jeho negativní vliv na senzitivitu promotorů k [iNTP] je vyvážen vlivem ostatních promotorových elementů (Hermann, 1995).

V tabulce 5 na straně 84 je uvedeno porovnání vybraných promotorových sekvencí pocházejících z různých bakteriálních druhů. V porovnání se vyskytují dva druhy promotorových sekvencí:

- (i) sekvence promotorů podobná sekvenci promotoru *rrnB* P1 u *B. subtilis* s oblastí mezi hexamerem -10 a pozicí +1 bohatou na páry adeninu a thyminu a zároveň u mnohých druhů také s thyminem v pozici -5. Tato sekvence je typickou promotorovou sekvencí vyskytující se bakterií kmene Firmicutes. Thymin v pozici -5 jsme identifikovali také u bakterií kmene Actinobacteria.
- (ii) sekvence promotorů podobné sekvenci promotorů *rrn* P1 u *E. coli* se sekvencí diskriminátoru bohatou na páry guaninu a cytosinu. Tento typ sekvence je typický pro promotory gram negativních bakterií a vyskytuje se také u gram pozitivních bakterií

kmene Actinobacteria. Z porovnání promotorových sekvencí vyplývá, že stejného způsobu regulace účinkem [iNTP] může být dosaženo také u promotorů s překvapivě různorodými sekvencemi vyskytujícími se u fylogeneticky velmi vzdálených bakteriálních druhů. Přitom platí, jak jsme zjistili i v našich experimentech, že citlivost nějakého promotoru na koncentraci svého iNTP závisí na sekvenci promotoru, ale i na původu RNAP. Tedy chování promotoru je dáno až souhrou obou těchto složek: promotor *Bsu-rrnB* P1 se chová s RNAP z *B. subtilis* jako vysoce senzitivní k [iNTP], s $K_{\text{NTP}} \sim 172 \mu\text{M GTP}$, kdežto v přítomnosti RNAP z *E. coli* se změní na tzv. nesenzitivní s $K_{\text{NTP}} \sim 18 \mu\text{M GTP}$.

RNAP z *B. subtilis* a *E. coli* se od sebe liší svou strukturou i celkovou velikostí. RNAP z *B. subtilis* je menší než RNAP z *E. coli*. RNAP z *B. subtilis* ve své struktuře postrádá zejména oblasti, které přispívají ke schopnosti RNAP z *E. coli* utvářet stabilní promotorové komplexy. U mutantní RNAP z *E. coli* postrádající zmiňované oblasti byla pozorována její schopnost utvářet méně stabilní otevřené komplexy (Artsimovitch *et al.*, 2003). Tato mutantní RNAP se tedy přiblížila svými vlastnostmi RNAP z *B. subtilis*. Promotory schopné utvářet s RNAP stabilní komplexy jsou u *B. subtilis* obecně méně časté. U *E. coli* je tomu právě naopak – promotory utvářející stabilní komplexy jsou zde daleko častější. V porovnání s *E. coli* tedy genom *B. subtilis* obsahuje daleko více promotorů, které jsou regulovány koncentrací jejich iNTP. U *B. subtilis* je tato regulace hlavní a zároveň velmi rychlou odpovědí na nové podmínky prostředí, do kterých se bakterie dostává.

Z naší studie je zřejmé, že se testované promotory citlivé na [iNTP] liší ve stupni senzitivity k [iNTP]. Příkladem je výrazný rozdíl v naměřených hodnotách K_{GTP} senzitivních promotorů *Pilv* a *PinfC* (obr. 27, str. 83). Můžeme se domnívat, že tyto rozdíly pozorované *in vitro* odpovídají rozdílným aktivitám obou promotorů *in vivo*. Zodpovězení této otázky zajisté vyžaduje provedení dalších experimentů.

Je možné, že u *B. subtilis* také některé další faktory proteinové povahy plní roli regulátorů senzitivity promotorů k [iNTP]. Jak bylo již dříve popsáno u *E. coli*, tyto faktory se mohou přímo vázat na RNAP. Faktor DksA se u *E. coli* váže do sekundárního kanálu RNAP a ovlivňuje tím senzitivitu promotorů k [iNTP] (Rutherford *et al.*, 2007). Podobně u *E. coli* plní svou funkci také faktor GreB (Potrykus *et al.*, 2006; Rutherford *et al.*, 2009). Jak již bylo popsáno v úvodu této práce, v genomu *B. subtilis* neexistuje přesný homolog proteinu DksA. Byly zde objeveny tři geny vykazující určitou sekvenční podobnost s genem

kódujícím DksA, ale jejich inaktivace žádný efekt na senzitivitu promotorů k [iNTP] nepřinesla (Krásný & Gourse, 2004). Roli regulátorů promotorové senzitivity k [iNTP] u *B. subtilis* by mohli plnit také proteiny GreA a podjednotka δ RNAP. Narozdíl od *E. coli*, kde se vyskytují faktory GreA a GreB je GreA jediným faktorem Gre v genomu *B. subtilis*. Role podjednotky δ u *B. subtilis* je v rámci dalších projektů extenzivně studována v naší laboratoři.

Ve druhé části disertační práce popisují výsledky získané ze studia proteinu YbxF u *B. subtilis*. Gen *ybxF* je součástí streptomycinového operonu, kde všechny ostatní geny kódují esenciální proteiny. Jak jsme však prokázali, YbxF oproti původním předpokladům do této skupiny esenciálních proteinů nepatří, i když se přepisuje jednak samostatně a také ve formě polycistronní mRNA (tj. dohromady s transkripty pro ribosomální proteiny a elongační faktory). Proto nás zajímala lokalizace YbxF v buňce. Připravili jsme proto kmeny *B. subtilis* produkující fúzní protein YbxF-GFP a zjistili jsme, že buňky produkující tuto fúzi vykazují zesílenou fluorescenci v oblastech buněčných pólů (obr. 30, str. 89). Již dříve bylo popsáno, že v těchto částech buňky jsou během buněčného dělení lokalizovány ribosomy. Efekt zesílené fluorescence v pólech jsme pozorovali pouze u exponenciálně rostoucích bakterií. Stacionární buněčná kultura tyto vlastnosti neměla. Jednalo se tedy o první náznak možné vazby proteinu YbxF na ribosom. Následně jsme provedli izolaci ribosomů z předem připravených kmenů *B. subtilis*, tak abychom byli schopni porovnat fluorescenci ribosomů v závislosti na přítomnosti a nepřítomnosti proteinu YbxF. Fluorescence ribosomů byla patrná jen u těch, které byly izolovány z kmenů, které produkovaly fúzní protein YbxF-GFP, kdežto fluorescence ribosomů izolovaných z kmene produkujícího samotné GFP byla takřka zanedbatelná (obr. 31, str. 91). Fluorescenci jsme také pozorovali jen u ribosomů izolovaných z exponenciálně rostoucích buněk. Došli jsme k závěru, že se protein YbxF váže na ribosom během exponenciální fáze růstu *B. subtilis*. Podobný efekt asociace proteinů s ribosomy závislé na fázi růstu byl již dříve pozorován také u některých dalších ribosomálních proteinů (Nanamiya *et al.*, 2004).

V navazujícím experimentu jsme zjistili, že po disociaci ribosomu na podjednotky se většina fúzního proteinu YbxF-GFP z ribosomu uvolnila. Pouze jeho malá část zůstala navázána na podjednotce 50S (obr. 32, str. 92). Na základě tohoto výsledku usuzujeme, že by se protein YbxF mohl přednostně vázat na podjednotku 50S a to do míst, kde se stýká

s podjednotkou 30S. Takovou hypotézu podporují i údaje o vazebném místě homologního proteinu L30e. Tento protein se váže na povrch ribosomu a interaguje s oběma ribosomálními podjednotkami (Halic *et al.*, 2005). Na druhou stranu, protein L7ae, který je taktéž strukturně podobný YbxF se váže pouze na velkou ribosomální podjednotku (Ban *et al.*, 2000).

Homologní model struktury proteinu YbxF byl vytvořen na základě dostupných krystalových struktur kvasinkového proteinu L30e, proteinu L30e z klíčků pšenice a proteinu L7ae z *P. abyssii* (obr. 33, str. 94). Ačkoliv jsou tyto proteiny strukturně podobné proteinu YbxF, je třeba zmínit, že jejich pI je velmi odlišné. Protein L30e má bazické pI ~ 9, naopak pI proteinu L7ae je kyselé (pI ~ 4). pI proteinu YbxF je 9,51. Protein L30e dále patří, na rozdíl od YbxF, mezi esenciální proteiny (Halic *et al.*, 2005). Funkce proteinu L7ae nebyla doposud objasněna. Na základě našich výsledků a dalších dostupných informací prozatím nelze říci, zdali je protein YbxF bakteriálním protějškem proteinu L30e nebo proteinu L7ae, a ani jaká by mohla být jeho úloha v buňce.

Shrnutí výsledků

První část mé disertační práce se zabývá obecným mechanismem regulace iniciace transkripce ribosomální RNA pomocí koncentrace iNTP u *B. subtilis*. Výsledky této části práce jsou shrnuty v kapitole Výsledky – část I. Vzhledem k zásadním rozdílům ve struktuře promotorů genů pro rRNA u *E. coli* a *B. subtilis*, rozhodli jsme se určit, které elementy sekvence promotorů jsou u *B. subtilis* zodpovědné za tento typ regulace. Systematicky jsme porovnali funkci jednotlivých úseků promotorů senzitivních vůči koncentraci iNTP s úseky z promotorů nesenzitivních. Zjistili jsme, že u *B. subtilis* je za tento způsob regulace jak *in vitro*, tak *in vivo* zodpovědná 3' oblast promotoru (promotorová sekvence od hexameru -10 až po pozici +1; označeno vzhledem k netemplátovému vlákně DNA řetězce), přičemž její charakter výrazně ovlivňuje stabilitu otevřených komplexů testovaných promotorů a tím také účinnost iniciace transkripce. Thymin v pozici -5 v 3' oblasti promotoru jsme určili jako další důležitý prvek podílející se na zmíněném způsobu regulace. Z hlediska senzitivity vůči koncentraci iNTP jsme testované promotory rozdělili do dvou tříd (třída I a třída II). Z analýzy promotorových sekvencí jiných bakteriálních druhů vyplynulo, že naše výsledky mohou být aplikovatelné také na mechanismy regulace senzitivity promotorů ostatních bakterií třídy Firmicutes k [iNTP].

Druhá část mé disertační práce se zabývá proteinovou složkou ribosomu a její výsledky jsou uvedeny v kapitole Výsledky - část II. Zabývali jsme se studiem proteinu YbxF u *B. subtilis*. Gen *ybxF*, který tento protein kóduje, byl již dříve v naší laboratoři objeven jako nová součást 5' konce streptomycinového operonu tohoto organismu. Vzhledem k přítomnosti genu *ybxF* v takto vysoce konzervovaném operonu, jehož všechny ostatní produkty patří mezi esenciální buněčné komponenty, rozhodli jsme se gen *ybxF* inaktivovat a přispět tak k objasnění jeho funkce. V následných testech však bylo zjištěno, že tato inaktivace neovlivnila ani růst ani chování *B. subtilis*. V genomu *B. subtilis* má gen *ybxF* paralogní zastoupení. Jedná se o gen *ymxC* v *nusA – infB* operonu. Přistoupili jsme proto také k inaktivaci tohoto paralogního genu a následně byl také připraven mutantní kmen *B. subtilis* s inaktivovanými oběma geny *ybxF* a *ymxC*. Ani u těchto mutantů nebyl pozorován žádný vliv inaktivace. Následně jsme provedli testy lokalizace proteinu YbxF v buňce a zjistili jsme asociaci tohoto proteinu s ribosomy během exponenciální fáze růstu

B. subtilis. Po disociaci ribosomů na podjednotky jsme YbxF detekovali na ribosomální podjednotce 50S. Z homologního modelu struktury proteinu YbxF vyplývalo, že lyzinové zbytky v pozicích 17, 21 a 24 druhého α -helixu by mohly zodpovídat za vazbu YbxF na ribosom. Experimentálně jsme pak prokázali, že lyzin v pozici 24 je důležitý pro tuto vazbu.

Seznam zkratek

A	adenin
AA	akrylamid
AK	aminokyselina
Amp	ampicilin
ATP	adenosin-5'-trifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	„base pair“ (počet párů bází)
C	cytosin
ccc	plazmidová DNA ve formě nadšroubovice („supercoiled“)
CAT	chloramfenikol acetyl transferáza
DNA	kyselina deoxyribonukleová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
G	guanin
I	intermediáty iniciace transkripce
iNTP	iniciační nukleosid trifosfát
kb	kilobáze (tzn. tisíc bází)
NTP	nukleosid trifosfát
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ppGpp	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
RE	restrikční endonukleáza
RNA	kyselina ribonukleová
RNAP	DNA dependentní RNA polymeráza
RP _C	uzavřený promotorový komplex
RP _O	otevřený promotorový komplex
rRNA	ribosomální RNA
SDS	dodecyl sulfát sodný
T	thymín
TAE	trisacetátový pufr

TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin
TF	transkripční faktor
U	uracil
[iNTP]	koncentrace iNTP

Prohlášení autorů

Potvrzuji, že podkladem disertační práce Mgr. Lud'ka Sojky jsou dvě publikace zveřejněné v impaktovaných časopisech a uvedené v příloze této práce. Mgr. Luděk Sojka je prvním autorem obou těchto prací a jeho podíl na experimentech zveřejněných ve zmíněných publikacích a v této práci je tedy zcela zřejmý. Podíl ostatních autorů na experimentech uvedených v disertační práci Mgr. Lud'ka Sojky je následující:

Mgr. Libor Krásný, Ph.D. provedl experiment, jehož výsledky jsou v této práci uvedeny na obrázku 13 (str. 65).

Mgr. Tomáš Kouba připravil první sadu promotorových konstruktů (obr. 16, str. 68) a dále provedl experiment, jehož výsledky jsou uvedeny v této práci na obr. 19, str. 72.

Za ostatní autory: **Mgr. Libor Krásný, Ph.D.**

Příloha – publikace autora

Zde uvádím publikace, které jsou podkladem této disertační práce. Text publikací je vložen do disertační práce od následující strany v tištěné verzi disertační práce.

1. **SOJKA, L.**, Fučík, V., Krásný, L., Barvík, I. and Jonák, J. (2007): **YbxF, a Protein Associated with Exponential-Phase Ribosomes in *Bacillus subtilis***. *J. Bacteriol.*, 189 (13): 4809 – 4814.
2. **SOJKA, L.**, Kouba, T., Barvík, I., Šanderová, H., Maderová, Z., Jonák, J., and Krásný, L. (2011): **Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in *Bacillus subtilis***. *Nucleic Acids Res.*, doi: 10.1093/nar/gkr032

Seznam literatury

- Achberger, E.C. & Whiteley, H.R. (1981) The role of the delta peptide of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase in promoter selection. *J. Biol. Chem.*, 256 (14), p.pp.7424-32.
- Aiyar, S.E., Gaal, T. & Gourse, R.L. (2002) rRNA Promoter Activity in the Fast-Growing Bacterium *Vibrio natriegens*. *J. Bacteriol.*, 184 (5), p.pp.1349-1358.
- Anagnostopoulos, C. & Spizizen, J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. , 81 (5), p.pp.741-746.
- Anderson, P. & Roth, J. (1981) Spontaneous tandem genetic duplications in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA (*rrn*) cistrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78 (5), p.pp.3113-7.
- Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Winkler, H.H. & Kurland, C.G. (1995) Unusual Organization of the rRNA Genes in *Rickettsia prowazekii*. *J. Bacteriol.*, 177 (14), p.pp.4171-4175.
- Artsimovitch, I., Svetlov, V., Murakami, Katsuhiko S & Landick, R. (2003) Co-overexpression of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits allows isolation and analysis of mutant enzymes lacking lineage-specific sequence insertions. *J. Biol. Chem.*, 278 (14), p.pp.12344-55.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289 (5481), p.pp.905-20.
- Bar-Nahum, G. & Nudler, E. (2001) Isolation and characterization of sigma 70 - retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*. *Cell*, 106 (4), p.pp.443-51.
- Barker, M.M. & Gourse, R.L. (2001) Regulation of rRNA Transcription Correlates with Nucleoside Triphosphate Sensing. *J. Bacteriol.*, 183 (21), p.pp.6315-6323.
- Beck, B.D., Arscott, P.G. & Jacobson, A. (1978) Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75 (3), p.pp.1250-4.
- Boor, K.J., Duncan, M.L. & Price, C.W. (1995) Genetic and Transcriptional Organization of the Region Encoding the Beta Subunit of *Bacillus subtilis* RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.*, 270 (35), p.pp.20329-20336.
- Bork, P., Dandekar, T., Diaz-Lazcoz, Y., Eisenhaber, F., Huynen, M. & Yuan, Y. (1998) Predicting function: from genes to genomes and back. *J. Mol. Biol.*, 283 (4), p.pp.707-25.

- Borukhov, S., Lee, J. & Laptenko, O. (2005) Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol. Microbiol.*, 55 (5), p.pp.1315-24..
- Borukhov, S. & Severinov, K. (2002) Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res. Microbiol.*, 153 (9), p.pp.557-62.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7 (72), p.pp.248-254.
- Browning, D.F. & Busby, S.J. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 (1), p.pp.57-65.
- Camacho, A. & Salas, M. (1999) Effect of mutations in the “extended -10” motif of three *Bacillus subtilis* sigmaA-RNA polymerase-dependent promoters. *J. Mol. Biol.*, 286 (3), p.pp.683-93.
- Cavanagh, A.T., Chandrangsu, P. & Wassarman, K.M. (2010) 6S RNA regulation of *relA* alters ppGpp levels in early stationary phase. *Microbiology*, p.pp.3791-3800.
- Cavanagh, A.T., Klocko, A.D., Liu, X. & Wassarman, K.M. (2008) Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma 70. *Mol. Microbiol.*, 67 (6), p.pp.1242-56.
- Cech, T.R. (2000) Structural biology: The ribosome is a ribozyme. *Science*, 289 (5481), p.pp.878-9.
- Chang, B.Y. & Doi, R.H. (1990) Overproduction, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* RNA polymerase sigma A factor. *J. Bacteriol.*, 172 (6), p.pp.3257-63.
- Chao, J.A., Prasad, G.S., White, S.A., Stout, C.D. & Williamson, J.R. (2003) Inherent Protein Structural Flexibility at the RNA-binding Interface of L30e. *J. Mol. Biol.*, 326 (4), p.pp.999-1004.
- Charron, C., Manival, X., Charpentier, B., Branlant, C. & Aubry, A. (2004) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction data of L7Ae sRNP core protein from *Pyrococcus abyssi*. *Acta Crystallogr.*, 60, p.pp.122-124.
- Choonee, N., Even, S., Zig, L. & Putzer, H. (2007) Ribosomal protein L20 controls expression of the *Bacillus subtilis* *infC* operon via a transcription attenuation mechanism. *Nucleic Acids Res.*, 35 (5), p.pp.1578-88.
- Condon, Ciaran, Liveris, D., Squires, C, Schwartz, I. & Squires, C L (1995) rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J. Bacteriol.*, 177 (14), p.pp.4152-6.

- Condon, Ciaran, Philips, J., Fu, Z.-yuan, Squires, Craig & Squires, Catherine L (1992) Comparison of the expression of the RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1 (1), p.pp.4175-4185.
- Cukras, A.R., Southworth, D.R., Brunelle, J.L., Culver, G.M. & Green, R. (2003) Ribosomal proteins S12 and S13 function as control elements for translocation of the mRNA:tRNA complex. *Mol. Cell*, 12 (2), p.pp.321-8.
- Das, A., Court, D. & Adhya, S. (1976) Isolation and Characterization of Conditional Lethal Mutants of *Escherichia coli* Defective in Transcription Termination Factor rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73 (6), p.pp.1959-1963.
- Dean, D. & Nomura, M. (1980) Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77 (12), p.pp.7084-8.
- Defeu Soufo, H.J., Reimold, C., Linne, U., Knust, T., Gescher, J. & Graumann, P.L. (2010) Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107 (7), p.pp.3163-8.
- Doherty, G., Fogg, M., Wilkinson, A. & Lewis, P. (2010) Small subunits of RNA polymerase: localisation, levels and implications for core enzyme composition. *Microbiology*, 156 doi 10.1099/mic.0.041566-0.
- Doherty, G.P., Meredith, D.H. & Lewis, P. (2006) Subcellular partitioning of transcription factors in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 188 (11), p.pp.4101-10.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., Record, M.T.J., Siegele, D.A. & Gross, C.A. (1992) Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell*, 70 (3), p.pp.501-512.
- Dubnau, D. & Losick, R. (2006) Bistability in bacteria. *Mol. Microbiol.*, 61 (3), p.pp.564-72.
- Ebright, R.H. (2000) RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.*, 304 (5), p.pp.687-98.
- Ellwood, M. & Nomura, M. (1980) Deletion of a ribosomal ribonucleic acid operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 143 (2), p.pp.1077-80.
- Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C. & Hecker, M. (2002) *Bacillus subtilis* Functional Genomics: Global Characterization of the Stringent Response by Proteome and Transcriptome Analysis. *J. Bacteriol.*, 184 (9), p.pp.2500-2520.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R. a, Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, J.L., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C. &

- Lucier, T.S. (1995) The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270 (5235), p.pp.397-404.
- Furano, A.V. (1975) Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. *PLoS Comput. Biol.*, 72 (12), p.pp.4780-4784.
- Gaal, T, Barkei, J., Dickson, R.R., DeBoer, H.A., DeHaseth, P.L., Alavi, H. & Gourse, R.L. (1989) Saturation mutagenesis of an *Escherichia coli* rRNA promoter and initial characterization of promoter variants. *J. Bacteriol.*, 171 (9), p.pp.4852-61.
- Gaal, T., Bartlett, M.S., Ross, W., Turnbough, C.L. jr & Gourse, R.L. (1997) Transcription Regulation by Initiating NTP Concentration: rRNA Synthesis in Bacteria. *Science*, 278 (5346), p.pp.2092-2097.
- Gao, H. & Aronson, A.I. (2004) The delta subunit of RNA polymerase functions in sporulation. *Curr. Microbiol.*, 48 (6), p.pp.401-4.
- Gentry, D.R. & Burgess, R.R. (1989) *rpoZ*, encoding the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, is in the same operon as *spoT*. *J. Bacteriol.*, 171 (3), p.pp.1271-7.
- Gentry, D.R. & Burgess, R.R. (1993) Cross-linking of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. *Biochemistry*, 32 (41), p.pp.11224-7.
- Ghosh, P., Ishihama, Akira & Chatterji, D. (2001) *Escherichia coli* RNA polymerase subunit omega and its N-terminal domain bind full-length beta' to facilitate incorporation into the alpha2beta subassembly. *Eur. J. Biochem.*, 268 (17), p.pp.4621-4627.
- Goldman, S.R., Ebright, R.H. & Nickels, B.E. (2009) Direct Detection of Abortive RNA Transcripts *in vivo*. *Science*, 324 (5929), p.pp.927-928.
- Golovin, A., Spiridonova, V. & Kopylov, A. (2006) Mapping contacts of the S12-S7 intercistronic region of *str* operon mRNA with ribosomal protein S7 of *E. coli*. *FEBS lett.*, 580 (25), p.pp.5858-62.
- Gonzalez-y-Merchand, J.A., Colston, M.J. & Cox, R.A. (1996) The rRNA operons of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of promoter elements and of neighbouring upstream genes. *Microbiology*, 142, p.pp.667-674.
- Gourse, R.L., Ross, W. & Gaal, T. (2000) UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.*, 37 (4), p.pp.687-95.
- Gruber, T.M. & Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57, p.pp.441-66.

- Gupta, R.S. (1998) What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Mol. Microbiol.*, 29 (3), p.pp.695-707.
- Guérout-Fleury, A., Frandsen, N. & Stragier, P. (1996) Plasmids for ectopic integration on *Bacillus subtilis*. *Gene*, 180, p.pp.57-61.
- Halic, M., Becker, T., Frank, J., Spahn, C.M.T. & Beckmann, R. (2005) Localization and dynamic behavior of ribosomal protein L30e. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12 (5), p.pp.467-8.
- Hammond, R.A., Barnes, M.H., Mack, S.L., Mitchener, J.A. & Brown, N.C. (1991) Regulation of the synthesis of *E. coli* elongation factor Tu. *Gene*, 98 (1), p.pp.29-36.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166 (4), p.pp.557-580.
- Haugen, S.P., Berkmen, M.B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C. & Gourse, R.L. (2006) rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, 125 (6), p.pp.1069-82.
- Haugen, S.P., Ross, W. & Gourse, R.L. (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6 (7), p.pp.507-19.
- Haugen, S.P., Ross, W., Manrique, M. & Gourse, R.L. (2008) Fine structure of the promoter – sigma region 1.2 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, p.pp.2-7.
- Helmann, J.D. (1995) Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigmaA - dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.*, 23 (13), p.pp.2351-60.
- Helmann, J.D. & Chamberlin, M.J. (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.*, 57, p.pp.839-72.
- Henkin, T.M. & Sonenshein, A.L. (1987) Mutations of the *Escherichia coli lacUV5* promoter resulting in increased expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 209, p.pp.467-474.
- Hirvonen, C.A., Ross, W., Wozniak, C.E., Marasco, E., Anthony, J.R., Aiyar, S.E., Newburn, V.H. & Gourse, R.L. (2001) Contributions of UP Elements and the Transcription Factor FIS to Expression from the Seven *rrn* P1 Promoters in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 183 (21), p.pp.6305-6314.
- de Hoon, M.J.L., Makita, Y., Nakai, K. & Miyano, S. (2005) Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Comput. Biol.*, 1 (3), p.p.e25.

- Hosoya, Y., Okamoto, S., Muramatsu, H. & Ochi, K. (1998) Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. *Antimicrob. Agents Ch.*, 42 (8), p.pp.2041-7.
- Hove-Jensen, B. (1992) Identification of tms-26 as an allele of the *gcaD* gene, which encodes N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 174 (21), p.pp.6852-6.
- Hsu, L.M., Vo, N.V. & Chamberlin, M.J. (1995) *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), p.pp.11588-92.
- Hudson, B.P., Quispe, J., Lara-González, S., Kim, Y., Berman, H.M., Arnold, E., Ebright, R.H. & Lawson, C.L. (2009) Three-dimensional EM structure of an intact activator-dependent transcription initiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106 (47), p.pp.19830-5.
- Hughes, K.T. & Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52, p.pp.231-86.
- Hunt, A., Rawlins, J.P., Thomaidis, H.B. & Errington, J. (2006) Functional analysis of 11 putative essential genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 152 (10), p.pp.2895-907.
- Hyde, E.I., Hilton, M.D. & Whiteley, H. R. (1986) 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), p.pp.16565-70.
- Ishihama, A. (2000) Functional Modulation of *Escherichia coli* RNA Polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, p.pp.499-518.
- Ishii, T., Yoshida, K., Terai, G., Fujita, Y. & Nakai, K. (2001) DBTBS: a database of *Bacillus subtilis* promoters and transcription factors. *Nucleic Acids Res.*, 29 (1), p.pp.278-80.
- Itoh, T., Takemoto, K., Mori, H. & Gojobori, T. (1999) Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 16 (3), p.pp.332-46.
- Johnston, E.B., Lewis, Peter J. & Griffith, R. (2009) The interaction of *Bacillus subtilis* sigmaA with RNA polymerase. *Protein Sci.*, 18 (11), p.pp.2287-97.
- Josaitis, C.A., Gaal, T & Gourse, R.L. (1995) Stringent control and growth-rate-dependent control have nonidentical promoter sequence requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 (4), p.pp.1117-21.

- Juang, Y.L. & Helmann, J.D. (1994) A Promoter Melting Region in the Primary Sigma Factor of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 235, p.pp.1470-1488.
- Kasai, K., Nishizawa, T., Takahashi, K., Hosaka, T., Aoki, H. & Ochi, K. (2006) Physiological analysis of the stringent response elicited in an extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, 188 (20), p.pp.7111-22.
- Keilty, S. & Rosenberg, M. (1987) Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.*, 262 (13), p.pp.6389-95.
- Kim, E.S., Song, J.Y., Kim, D.W., Chater, K. F. & Lee, K.J. (2008) A possible extended family of regulators of sigma factor activity in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.*, 190 (22), p.pp.7559-66.
- Klappenbach, J. a, Dunbar, J.M. & Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 66 (4), p.pp.1328-33.
- Klein, D.J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2004) The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.*, 340 (1), p.pp.141-77.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G. & Andersen, K.K. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (8), p.pp.4678-83.
- Koonin, E.V., Bork, P. & Sander, C. (1994) A novel RNA-binding motif in omnipotent suppressors of translation termination, ribosomal proteins and a ribosome modification enzyme? *Nucleic Acids Res.*, 22 (11), p.pp.2166-7.
- Koonin, E.V. & Galperin, M.Y. (1997) Prokaryotic genomes: the emerging paradigm of genome-based microbiology. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 7, p.pp.757-763.
- Krab, I.M. & Parmeggiani, A. (1998) EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim. Biophys. Acta*, 1443, p.pp.1-22.
- Krásný, L. & Gourse, R.L. (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J.*, 23 (22), p.pp.4473-83.
- Krásný, L., Mesters, J.R., Tieleman, L.N., Kraal, B., Fučík, V., Hilgenfeld, R. & Jonák, J. (1998) Structure and expression of elongation factor Tu from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.*, 283 (2), p.pp.371-81.
- Krásný, L., Tišerová, H., Jonák, J., Rejman, D. & Šanderová, H. (2008) The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 69 (1), p.pp.42-54.

- Krásný, L., Vacík, T., Fučík, V. & Jonák, J. (2000) Cloning and characterization of the *str* operon and elongation factor Tu expression in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, 182 (21), p.pp.6114-22.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), p.pp.680-685.
- Laptenko, O., Lee, J., Lomakin, I. & Borukhov, S. (2003) Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *EMBO J.*, 22 (23), p.pp.6322-34.
- Lathe III, W.C., Snel, B. & Bork, P. (2000) Gene context conservation of a higher order than operons. *Trends Biochem. Sci.*, 25 (10), p.pp.474-9.
- Lauber, M.A., Running, W.E. & Reilly, J.P. (2009) *Bacillus subtilis* ribosomal proteins: structural homology and post-translational modifications. *J. Prot. Res.*, 8 (9), p.pp.4193-206.
- Le Grice, S.F., Shin, C.C., Whipple, F. & Sonenshein, A.L. (1986) Separation and analysis of the RNA polymerase binding sites of a complex *Bacillus subtilis* promoter. *Mol. Gen. Genet.*, 204 (2), p.pp.229-236.
- Lechner, K., Heller, G. & Böck, A. (1989) Organization and nucleotide sequence of a transcriptional unit of *Methanococcus vannielii* comprising genes for protein synthesis elongation factors and ribosomal proteins. *J. Mol. Evol.*, 29 (1), p.pp.20-27.
- Lewis, P.J. & Marston, A.L. (1999) GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 227 (1), p.pp.101-10.
- Lewis, P.J., Thaker, S.D. & Errington, J. (2000) Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.*, 19 (4), p.pp.710-8.
- Liu, C., Heath, L.S. & Turnbough, C.L. (1994) Regulation of *pyrBI* operon expression in *Escherichia coli* by UTP-sensitive reiterative RNA synthesis during transcriptional initiation. *Genes Dev.*, 8 (23), p.pp.2904-2912.
- López de Saro, F.J., Woody, A.Y. & Helmann, J.D. (1995) Structural analysis of the *Bacillus subtilis* delta factor: a protein polyanion which displaces RNA from RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 252 (2), p.pp.189-202.
- López de Saro, F.J., Yoshikawa, N. & Helmann, J.D. (1999) Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 274 (22), p.pp.15953-8.

- MacLellan, S.R., Guariglia-Oropeza, V., Gaballa, A. & Helmann, J.D. (2009) A two-subunit bacterial sigma-factor activates transcription in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106 (50), p.pp.21323-8.
- MacLellan, S.R., Wecke, T. & Helmann, J.D. (2008) A previously unidentified sigma factor and two accessory proteins regulate oxalate decarboxylase expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 69 (4), p.pp.954-67.
- Maeda, H., Fujita, N. & Ishihama, A. (2000) Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 28 (18), p.pp.3497-503.
- Majewski, J. & Cohan, F.M. (1999) DNA sequence similarity requirements for interspecific recombination in *Bacillus*. *Genetics*, 153 (4), p.pp.1525-33.
- Mao, H. & Williamson, J.R. (1999) Local folding coupled to RNA binding in the yeast ribosomal protein L30. *J. Mol. Biol.*, 292 (2), p.pp.345-59.
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3, p.pp.208-218.
- Mascarenhas, J., Weber, M.H. & Graumann, P.L. (2001) Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *EMBO reports*, 2 (8), p.pp.685-9.
- Mathew, R. & Chatterji, D. (2006) The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol.*, 14 (10), p.pp.450-5.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E., Darst, S., Ebright, R.H. & Severinov, K. (2001) Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (3), p.pp.892-7.
- Mitani, T., Heinze, J.E. & Freese, E. (1977) Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine and hadacidin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77 (3), p.pp.1118-1125.
- Motáčková, V., Šanderová, Hana, Židek, L., Nováček, J., Padrta, P., Švenková, A., Korelusová, J., Jonák, J., Krásný, L. & Sklenář, V. (2010) Solution structure of the N-terminal domain of *Bacillus subtilis* delta subunit of RNA polymerase and its classification based on structural homologs. *Proteins*, 78 (7), p.pp.1807-10.
- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O. & Darst, S.A. (2002) Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, 296 (5571), p.pp.1285-90.

- Murray, H.D., Schneider, D.A. & Gourse, R.L. (2003) Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. *Mol. Cell*, 12 (1), p.pp.125-34.
- Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayama, R., Kosono, S., Kudo, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Park, S.M., Ochi, K. & Kawamura, F. (2004) Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *Mol. Microbiol.*, 52 (1), p.pp.273-83.
- Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C.S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F. & Tozawa, Y. (2008) Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 67 (2), p.pp.291-304.
- Nanamiya, H. & Kawamura, F. (2010) Towards an Elucidation of the Roles of the Ribosome during Different Growth Phases in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74 (3), p.pp.451-461.
- Nanamiya, Hideaki, Sato, Makiko, Masuda, K., Sato, Mikiko, Wada, T., Suzuki, S., Natori, Yousuke, Katano, M., Akanuma, Genki & Kawamura, Fujio (2010) *Bacillus subtilis* mutants harboring a single copy of the rRNA operon exhibited severe defects in growth and sporulation. *Microbiology*.
- Naryshkin, N., Revyakin, A., Kim, Y, Mekler, V. & Ebricht, R H (2000) Structural organization of the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*, 101 (6), p.pp.601-11.
- Natori, Y., Tagami, K., Murakami, K., Yoshida, S., Tanigawa, O., Moh, Y., Masuda, K., Wada, T., Suzuki, S., Nanamiya, Hideaki, Tozawa, Yuzuru & Kawamura, Fujio (2009) Transcription activity of individual *rrn* operons in *Bacillus subtilis* mutants deficient in (p)ppGpp synthetase genes, *relA*, *yjbM*, and *ywaC*. *J. Bacteriol.*, 191 (14), p.pp.4555-61.
- Nitschké, P., Guerdoux-Jamet, P., Chiapello, H., Faroux, G., Hénaut, C., Hénaut, A. & Danchin, A. (1998) Indigo: a World-Wide-Web review of genomes and gene functions. *FEMS Microbiol Rev.*, 22 (4), p.pp.207-227.
- Nowotny, V. & Nierhaus, K.H. (1988) Assembly of the 30S subunit from *Escherichia coli* ribosomes occurs via assembly domains which are initiated by S4 and S7. *Biochemistry*, 27 (18), p.pp.7051-5.
- Ogasawara, N. (2000) Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res. Microbiol.*, 151 (2), p.pp.129-34.
- Paul, B.J, Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D., Webb, C., Foster, J.W. & Gourse, R.L. (2004) DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118 (3), p.pp.311-22.

- Paul, B.J., Ross, W., Gaal, T. & Gourse, R.L. (2004) rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 38, p.pp.749-70.
- Pero, J. (1975) Highly Asymmetric Transcription by RNA Polymerase Containing Phage-SP01-Induced Polypeptides and a New Host Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72 (4), p.pp.1589-1593.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 (9), p.p.e45.
- Piggot, P.J. & Hilbert, D.W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7 (6), p.pp.579-86.
- Potrykus, K. & Cashel, M. (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Genet.*, 62, p.pp.35-51.
- Potrykus, K., Vinella, D., Murphy, H., Szalewska-Palasz, A., D'Ari, R. & Cashel, M. (2006) Antagonistic regulation of *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter activity by GreA and DksA. *J. Biol. Chem.*, 281 (22), p.pp.15238-48.
- Qi, Y. & Hulett, F.M. (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*. *Mol. Microbiol.*, 28 (6), p.pp.1187-97.
- Rainey, F. a, Ward-Rainey, N.L., Janssen, P.H., Hippe, H. & Stackebrandt, E. (1996) *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology*, 142, p.pp.2087-95.
- Recht, M.I. & Puglisi, J.D. (2001) Aminoglycoside Resistance with Homogeneous and Heterogeneous Populations of Antibiotic-Resistant Ribosomes. *Antimicrob. Agents Ch.*, 45 (9), p.pp.2414-2419.
- Roberts, J.W., Shankar, S. & Filter, J.J. (2008) RNA Polymerase Elongation Factors. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, p.pp.211-233.
- Roberts, J. & Park, J.S. (2004) Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7 (2), p.pp.120-5.
- Roberts, M.W. & Rabinowitz, J.C. (1989) The effect of *Escherichia coli* Ribosomal Protein S1 on the Translational Specificity of Bacterial Ribosomes. *J. Biol. Chem.*, 264 (4), p.pp.2228-2235.
- Rodnina, M.V., Beringer, M. & Wintermeyer, W. (2007) How ribosomes make peptide bonds. *Trends Biochem. Sci.*, 32 (1), p.pp.20-6.

- Ross, W, Thompson, J.F., Newlands, J.T. & Gourse, R.L. (1990) *E.coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.*, 9 (11), p.pp.3733-42.
- Ross, W., Ernst, A. & Gourse, R.L. (2001) polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev.*, p.pp.491-506.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. & Gourse, R.L. (1993) Recognition Element in Bacterial Promoters : DNA Binding by the Alpha Subunit of RNA Polymerase. *Science*, (27), p.pp.3-9.
- Rutherford, S.T., Villers, C.L., Lee, J.H., Ross, W. & Gourse, R.L. (2009) Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA. *Genes Dev.*, p.pp.236-248.
- Rutherford, Steven T, Lemke, J.J., Vrentas, C.E., Gaal, T., Ross, W. & Gourse, R.L. (2007) Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanism of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 366 (4), p.pp.1243-1257.
- Salgado, H., Santos-Zavaleta, A., Gama-castro, S., Millán-Zárate, D., Díaz-Peredo, E., Sánchez-Solano, F., Pérez-Rueda, E., Bonavides-Martínez, C. & Collado-Vides, J. (2001) RegulonDB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 29 (1), p.pp.72-74.
- Schaeffer, B.Y.P., Millet, J. & Aubert, J.P. (1964) Catabolic repression of bacterial sporulation. *Microbiology*, 126 (1960), p.pp.1-8.
- Schneider, D.A., Murray, H.D. & Gourse, R.L. (2003) Measuring control of transcription initiation by changing concentrations of nucleotides and their derivatives. *Methods Enzymol.*, 370 (1997), p.pp.606-17.
- Schumann, W., Ehrlich, S.D. & Ogasawara, N. (2001) *Functional analysis of Bacillus subtilis genes*, New York: John Wiley and Sons Ltd.
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M. & Cate, J.H.D. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 310 (5749), p.pp.827-34.
- Seepersaud, R., Needham, R.H.V., Kim, C.S. & Jones, A.L. (2006) Abundance of the Delta Subunit of RNA Polymerase Is Linked to the Virulence of *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.*, 188 (6), p.pp.2096-2105.
- Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy, F.V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A.C., Weir, J.R. & Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 313 (5795), p.pp.1935-42.

- Sevim, E., Gaballa, A., Beldüz, A.O. & Helmann, J.D. (2011) DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* and *Aeribacillus pallidus* AC6 σ (D) proteins. *J. Bacteriol.*, 193 (2), p.pp.575-9.
- Shazand, K., Tucker, J., Chiang, R., Stansmore, K., Sperling-Petersen, H.U., Grunberg-Manago, M., Rabinowitz, J.C. & Leighton, T. (1990) Isolation and molecular genetic characterization of the *Bacillus subtilis* gene *infB* encoding protein synthesis initiation factor 2. *J. Bacteriol.*, 172 (5), p.pp.2675-87.
- Shazand, K., Tucker, J., Grunberg-Manago, M., Rabinowitz, J.C. & Leighton, T. (1993) Similar organization of the *nusA-infB* operon in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 175 (10), p.pp.2880-7.
- Sojka, L., Fučík, V., Krásný, L., Barvík, I. & Jonák, J. (2007) YbxF, a protein associated with exponential-phase ribosomes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 189 (13), p.pp.4809-14.
- Sojka, L., Kouba, T., Barvík, I., Šanderová, H., Maderová, Z., Jonák, J. & Krásný, L. (2011) Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*
- Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. & Losick, R. (2002) *Bacillus subtilis and its closest relatives. From genes to cells.*, Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
- Sweetser, D., Nonet, M. & Young, R. a (1987) Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84 (5), p.pp.1192-6.
- Sánchez-Hidalgo, M., Núñez, L.E., Méndez, C. & Salas, J.A. (2010) Involvement of the beta subunit of RNA polymerase in resistance to streptolydigin and streptovaricin in the producer organisms *Streptomyces lydicus* and *Streptomyces spectabilis*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 54 (5), p.pp.1684-92.
- Takami, H., Takaki, Y., Nakasone, K. & Hiram, C. (1999) Sequence analysis of a 32-kb region including the major ribosomal protein gene clusters from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain C-125. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (2), p.pp.452-455.
- Tehranchi, A.K., Blankschien, M.D., Zhang, Y., Halliday, J.A, Srivatsan, A., Peng, J., Herman, C. & Wang, J.D. (2010) The Transcription Factor DksA Prevents Conflicts between DNA Replication and Transcription Machinery. *Cell*, 141 (4), p.pp.595-605.
- Tjian, R., Losick, R., Pero, J. & Hinnebusch, A. (1977) Purification and comparative properties of the delta and sigma subunits of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.*, 74 (1), p.pp.149-54.

- Tojo, S., Kumamoto, K., Hirooka, K. & Fujita, Y. (2010) Heavy involvement of stringent transcription control depending on the adenine or guanine species of the transcription initiation site in glucose and pyruvate metabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 192 (6), p.pp.1573-85.
- Tojo, S., Satomura, T., Kumamoto, K., Hirooka, K. & Fujita, Y. (2008) Molecular mechanisms underlying the positive stringent response of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon, involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids. *J. Bacteriol.*, 190 (18), p.pp.6134-47.
- Torres, M., Condon, C., Balada, J.M., Squires, C. & Squires, C.L. (2001) Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *EMBO J.*, 20 (14), p.pp.3811-20.
- Vassylyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M.N., Borukhov, S. & Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, 417 (6890), p.pp.712-9.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F. & vanSinderen, D. (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71 (3), p.pp.495-548.
- Voskuil, M.I. & Chambliss, G.H. (1998) The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. *Nucleic Acids Res.*, 26 (15), p.pp.3584-90.
- Voskuil, M.I. & Chambliss, G.H. (2002) The TRTGn Motif Stabilizes the Transcription Initiation Open Complex. *J. Mol. Biol.*, 322 (3), p.pp.521-532.
- Vrentas, C.E., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R.H. & Gourse, R.L. (2005) Response of RNA polymerase to ppGpp : requirement for the subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev.*, p.pp.2378-2387.
- Ward, J.B. & Zahler, S.A. (1973) Genetic studies of leucine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 116 (2), p.pp.719-26.
- Wassarman, K.M. (2007) 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol. Microbiol.*, 65 (6), p.pp.1425-31.
- Watson, S.P., Antonio, M. & Foster, S.J. (1998) Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* starvation-induced, stationary-phase mutants defective in survival or recovery. *Microbiology*, 144, p.pp.3159-69.
- Widom, R.L., Jarvis, E.D., LaFauci, G. & Rudner, R. (1988) Instability of rRNA operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 170 (2), p.pp.605-10.

- Wilson, D.N. & Nierhaus, K.H. (2005) Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 40 (5), p.pp.243-267.
- Wipat, A., Carter, N., Brignell, S.C., Guy, B.J., Piper, K., Sanders, J., Emmerson, P.T. & Harwoodl, C.R. (1996) The dnaB-pheA (256°-240°) region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing genes responsible for stress responses , the utilization of plant cell walls and primary metabolism. *Microbiology*, 142, p.pp.3067-3078.
- Wolf, M. (2004) Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (3), p.pp.871-875.
- Yap, W.H. & Wang, Y. (1999) Molecular cloning and comparative sequence analyses of rRNA operons in *Streptomyces nodosus* ATCC 14899. *Gene*, 232 (1), p.pp.77-85.
- Yasumoto, K., Liu, H., Jeong, S.M., Ohashi, Y., Kakinuma, S., Tanaka, K., Kawamura, F, Yoshikawa, H. & Takahashi, H. (1996) Sequence analysis of a 50 kb region between *spo0H* and *rrnH* on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiology*, 142, p.pp.3039-46.
- Yeh, H.Y., Chen, T.C., Liou, K.M., Hsu, H.T., Chung, K.M., Hsu, L.L. & Chang, B.Y. (2011) The core-independent promoter-specific interaction of primary sigma factor. *Nucleic Acids Res.*, 39 (3), p.pp.913-25.
- Young, F.S. & Furano, A.V. (1981) Regulation of the synthesis of *E. coli* elongation factor Tu. *Cell*, 24 (3), p.pp.695-706.