

Středoškolská odborná činnost 2008/2009

Obor 04 – biologie

Molekulární mechanismy bakteriální odpovědi na změnu živin v prostředí:

Regulace genové exprese iniciačními nukleosid trifosfáty

Autor:

Adam Kalina

Gymnázium, Praha 6, Arabská 14

4. ročník

Konzultant práce:

Mgr. Libor Krásný PhD.

(Mikrobiologický ústav, AV ČR v.v.i.)

Praha, 2009

Prohlašuji tímto, že jsem soutěžní práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Libora Krásného PhD. a uvedl v seznamu literatury veškerou použitou literaturu a další informační zdroje včetně internetu.

V Praze dne

vlastnoruční podpis autora

1 Anotace

Tato práce vznikla jako soutěžní příspěvek do Středoškolské odborné činnosti. Jejím cílem bylo vytvoření nástrojů pro studium mechanismů bakteriální odpovědi na změnu množství živin v prostředí. Tato reakce se na vnitrobuněčné úrovni projevuje produkcí nových bílkovin a naopak zastavením syntézy jiných. Tomuto jevu se odborně říká změna genové exprese.

V teoretické části jsou krátce shrnuty klíčové aspekty genové exprese: transkripce (přepis genetické informace z DNA do RNA: je prováděna enzymem RNA polymerázou [RNAP]) a translace (překlad přepsané RNA do bílkovin: probíhá na ribozomech). Důležitým regulačním mechanismem genové exprese je citlivost RNAP na iniciační nukleosid trifosfáty (iNTP).

Experimentální část popisuje vytvoření DNA konstruktů obsahující specifickou sekvenci DNA (promotor) z *Bacillus subtilis*, která je schopná vázat RNA polymerázu. Dalším krokem je ověření schopnosti konstruktů iniciovat transkripci. Sekvence promotoru byla vybrána tak, aby změřením transkripční aktivity původního konstruktů a jeho následných mutací bylo možné získat další informace o mechanismu regulace genové exprese iNTP.

Experimenty probíhaly v laboratořích Mikrobiologického ústavu Akademie Věd v Praze 4.

Klíčová slova: genová exprese, transkripce, RNA polymeráza, promotor, iniciační nukleosid trifosfáty

Obsah

1	Anotace	3
2	Seznam zkratek	6
3	Teoretický úvod: Genová exprese	7
3.1	Transkripce	8
3.1.1	Promotor	8
3.1.2	RNA polymeráza	9
3.1.3	Mechanismus transkripce	10
3.1.3.1	Iniciace	10
3.1.3.2	Elongace	12
3.1.3.3	Terminace	12
3.2	Regulace genové exprese na úrovni transkripce	13
3.2.1	Regulace <i>rrn</i> operonů u <i>E. coli</i>	14
3.2.2	Vliv sekvence promotoru na expresi genu <i>pyrC</i> u <i>E. coli</i>	16
3.2.3	Vliv identity +1 pozice na změny v genové expresi u <i>B. subtilis</i>	17
3.3	Translace	19
4	Materiál a metody	21
4.1	Přístroje	21
4.2	Používané chemikálie, enzymy a další preparáty	22
4.3	Složení pufrů a medií	23
4.4	Práce s DNA - příprava plasmidu s promotorovým konstruktem	24
4.4.1	Izolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i> DH5 α	25
4.4.1.1	Minipreparace	25
4.4.1.2	Midipreparace	26
4.4.1.3	Čištění plasmidové DNA fenolem a chloroformem	27
4.4.1.4	Srážení plasmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného	28
4.4.1.5	Analýza plasmidové DNA restrikčním štěpením	29
4.4.1.6	Elektroforetická analýza DNA	29
4.4.1.7	Izolace DNA z gelu	31
4.4.2	Klonování DNA	32
4.4.2.1	Příprava DNA inzertu	32

4.4.2.2	Příprava plasmidu a ligace DNA inzertu	33
4.4.2.3	Transformace buněk <i>E. coli</i> KB DH5 α	33
4.4.2.4	Sekvenační reakce	34
4.5	Metody práce s proteiny	35
4.5.1	Rekonstituce jádra RNAP a podjednotky σ^A z <i>B. subtilis</i>	35
4.6	Transkripční experimenty	36
4.6.1	Určování K_{CTP} promotorového konstruktů	36
5	Cíl práce	39
6	Výsledky	40
6.1	Experimentální strategie	40
6.1.1	Literární rešerše	40
6.2	Klonování	43
6.3	Ověření transkripční aktivity a určení hodnoty K_{CTP}	44
7	Diskuze	46
8	Závěr	47
9	Seznam literatury	48

2 Seznam zkratek

A	adenosin monofosfát
AK	aminokyselina
APS	ammoniumpersulfat
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BSA	bovine serum albumin
C	cytosin monofosfát
CTP	cytosin-5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Fis	factor for inversion stimulation
G	guanosin monofosfát
GTP	guanosin-5'-trifosfát
iNTP	iniciační nukleotid trifosfát
[iNTP]	koncentrace iniciačního nukleotid trifosfátu
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppGpp	guanosin-3'-difosfát-5'-difosfát
RNA	ribonukleová kyselina
RNAP	RNA polymeráza
SD	Shine-Dalgarnova sekvence
T	thymin monofosfát
tRNA	transportní RNA
U	uridin monofosfát
UP	upstream
UTP	uracil-5'-trifosfát

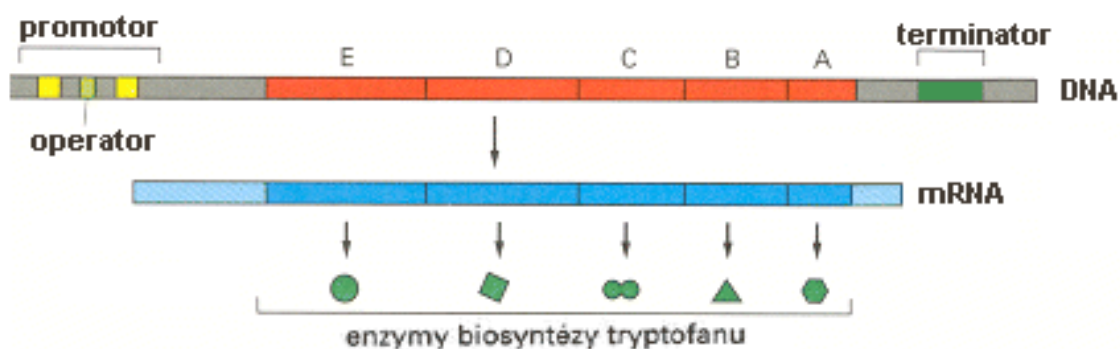
3 Teoretický úvod: Genová exprese

Genová exprese je děj, během kterého se podle genu určeného sekvencí DNA vytvoří funkční produkt. Geny mohou určovat dva typy produktů: AK geny kódují sekvenci aminokyselin (AK) v bílkovinách, zatímco RNA geny nesou informaci pro vznik transportní RNA (tRNA), ribozomální RNA (rRNA) a jiných regulačních RNA molekul. Geny jsou na chromozomu uloženy samostatně, nebo v operonech. Před každým genem leží promotor, na který se váže RNA polymeráza (RNAP, viz 3.1.2), a operátor, na který se vážou represory (viz 3.2). Operon má stejně jako samostatné geny pouze jeden promotor, ale jeho sekvence může kódovat více proteinů nebo molekul RNA. Společný začátek transkripce umožňuje ekvimolární zastoupení jednotlivých produktů. Kódující sekvence jsou od sebe odděleny dlouhými mezerníky. Na těchto nekódujících úsecích jsou obsaženy sekvence rozeznávané restrikcími endonukleázami, které rozstřihají RNA vytvořenou podle celého operonu na mRNA jednotlivých produktů. Výsledné produkty spolu biochemicky spolupracují, proto je výhodné syntetizovat je najednou [1].

Typickým příkladem operonu je operon *trp*, který kóduje enzymy metabolické dráhy aminokyseliny tryptofanu.



Obrázek 1: Obecné schéma genu, převzato z [1], upraveno.



Obrázek 2: Schéma operonu *trp*, převzato z [1].

3.1 Transkripce

Během transkripce dochází k přepisu genetické informace na templátovém řetězci DNA do komplementárního řetězce RNA. Tato reakce je katalyzována enzymem RNA polymerázou (RNAP) a počátek transkripce je rozpoznán pomocí promotoru.

3.1.1 Promotor

Promotor je regulační oblast genu ležící před samotnou genetickou informací přepisovanou do RNA. Místo počátku transkripce (první nukleotid přepisovaný do mRNA) se označuje jako +1 pozice, sekvence promotoru se označuje zápornými čísly a kódující sekvence kladnými čísly. Nukleotid nula neexistuje.

Nejdůležitější částí promotoru je promotorové jádro v délce asi 40 bází. Obsahuje diskriminátor, mezerník a dvě konzervativní hexamerové sekvence.

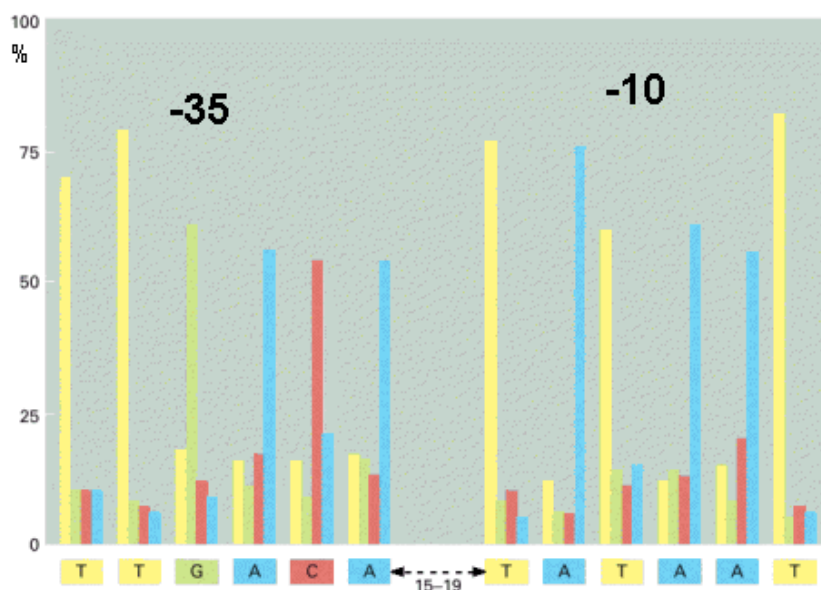


Obrázek 3: Schéma promotoru, převzato z [8].

Diskriminátor je různě dlouhá oblast mezi +1 a -10. Sekvence -10 hexameru je určena konsenzem 5'-TATAAT-3' a při transkripci na něm dochází k rozdělení vláken DNA. Na tento hexamer se v literatuře odkazuje jako na TATA box nebo Pribnow box [18] [19]. Mezi oběma hexamery je mezerník, který bývá různě dlouhý (mezi 15-19ti bázemi). Druhý hexamer -35 má konsenzus sekvence 5'-TTGACA-3' [3] [8] [17].

Konsenzus hexamerových sekvencí v promotoru vychází z poměru zastoupení jednotlivých bází v prozkoumaných promotorech. V okolí těchto hexamerů se může sekvence měnit, ale samotné hexamery zůstávají stejné nebo podobné u většiny promotorů [1].

Před promotorem ve směru k 5' konci leží elementy UP (upstream), A-T bohaté sekvence interagující s RNAP, a vazebná místa pro další proteiny [3][4][8].



Obrázek 4: Konzervované sekvence promotorového jádra u *E. coli*, jednotlivé sloupce vyjadřují procentuální zastoupení nukleotidů na jednotlivých pozicích prozkoumaných promotorů, převzato z [1].

3.1.2 RNA polymeráza

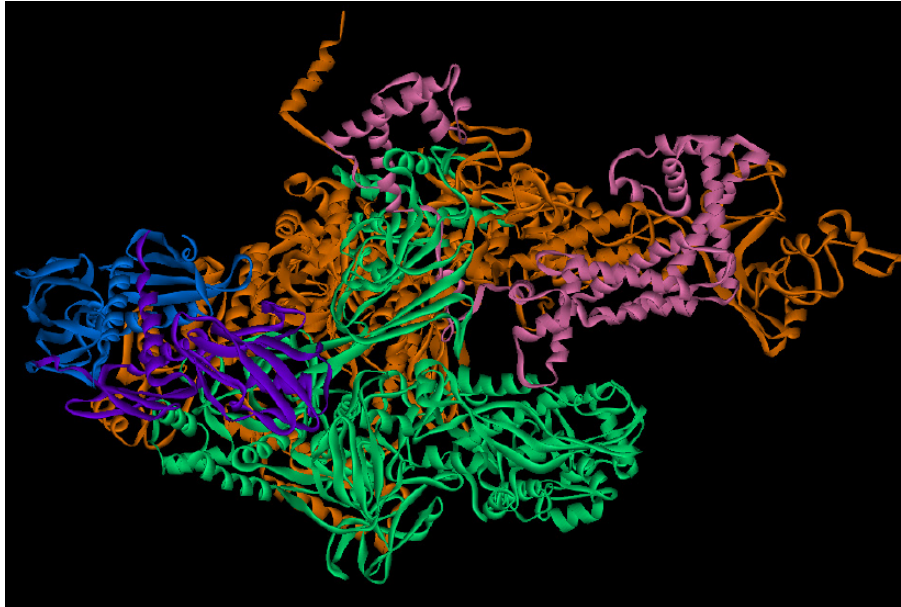
RNA polymeráza je DNA dependentní RNA-nukleotidyltransferáza. Tento komplikovaný holoenzym se skládá z několika podjednotek.

Jádro RNAP se skládá z pěti podjednotek: dvě α , β , β' a ω . Jádro není samo schopné rozeznávat sekvence promotoru, proto se k němu ve fázi iniciace transkripce připojuje faktor σ .

Podjednotka α je složena přibližně z 320 AK a plní především strukturní funkci. Každá z obou podjednotek α se skládá ze dvou domén spojených flexibilním můstkem. Spojené N-terminální domény drží pohromadě podjednotky β a β' . C-terminální doména interagují s elementy UP rozšířeného promotoru a zvyšují tak afinitu RNAP k DNA.

Podjednotky β a β' tvoří katalytické jádro enzymu. Vytvářejí sekundární kanál a β' navíc tvoří v primárním kanále „kormidlo“, kterým se oddělují vlákna DNA. Tyto dvě podjednotky tvoří dohromady tzv. klepeta. Vážou se spolu na dně primárního kanálu poblíž aktivního místa. Podjednotka β obsahuje přibližně 1340 AK, β' asi 1400 AK.

Počet AK v podjednotce σ se pohybuje mezi 400-700 AK, záleží na typu. Váže se na β' a odpovídá za rozpoznávání specifických úseků DNA - konzervovaných sekvencí hexamerů v promotorovém jádře. Na RNAP se mohou vázat různé podjednotky σ , které rozeznávají jiné sekvence. Podle toho rozlišujeme primární a sekundární faktory σ . První z nich odpovídají hlavně za transkripci genů potřebných především pro běžný chod buňky, tzv. „housekeeping“ genů. Sekundární faktory σ jsou nutné pro transkripci genů, které jsou potřeba jen při různých typech stresu. Takové geny mají atypické -10 a -35 hexamery a variabilní délku mezerníku.



Obrázek 5: Model RNA polymerázy z gramnegativní bakterie *Thermus thermophilus* vytvořený podle krystalové struktury: modře podjednotky α , zeleně β , hnědě β' a fialově σ , převzato z [8].

Přesná funkce podjednotky ω nebyla zatím detailně popsána. Víme o ní jen to, že se skládá z 90 AK a interaguje s podjednotkami β . Její vyřazení způsobuje zpomalení růstu buňky. Při izolaci RNAP byla u *B. subtilis* objevena navíc podjednotka δ , jejíž funkce je také zatím neznámá. Zdá se, že ovlivňuje RNAP u gram pozitivních (G+) bakterií podobně jako bílkovina DksA (viz 3.2.1) u gram negativních (G-) bakterií.

V kvartérní struktuře RNAP je možné rozeznat tři kanály. Primárním prochází při transkripci DNA a nachází se zde aktivní místo pro syntézu RNA. Toto vazebné místo obsahuje dva Mg^{2+} ionty koordinované třemi kyselými zbytky kyseliny asparágové. Sekundárním kanálem vstupují NTP a exit kanálem odchází hotová RNA [3][8][15].

3.1.3 Mechanismus transkripce

3.1.3.1 Iniclace

Pro úspěšné zahájení transkripce je potřeba promotor, RNAP a dostatečná koncentrace NTP, ze kterých bude RNA vznikat. U G- bakterií se iniciace transkripce mohou účastnit i jiné faktory, které ale nejsou pro průběh esenciální. Mohou to být různé látky bílkovinné, nebo nebílkovinné povahy, které mohou zesilovat, nebo zeslabovat úspěšnost transkripce.

Průběh iniciace transkripce je možné popsat následující rovnicí:



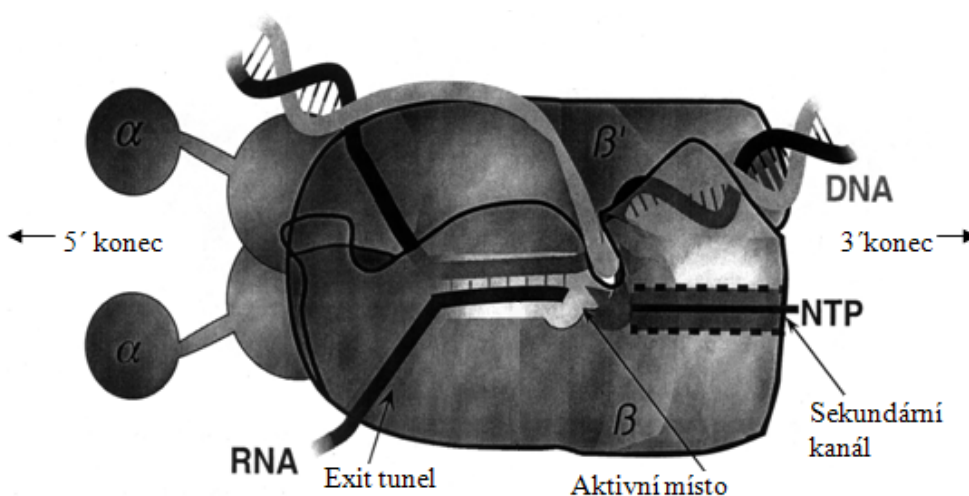
R = RNAP, P = promotor, RP_C = uzavřený komplex, RP_I = intermediáty, RP_O = otevřený komplex, RP_{NTP} = komplex s přiřazeným +1 nukleotidem, RP_E = elongační komplex

Iniciace transkripce začíná rozeznáním konzervovaných sekvencí promotoru faktorem σ a zformováním uzavřeného komplexu. DNA je v této fázi ohnutá, protože mezerník (16-17 párů bazí) je příliš dlouhý, než aby mohl být natažený. Také může proběhnout interakce C-terminálních domén podjednotek α s elementy UP, což zvyšuje afinitu RNAP k DNA.

Následující fází je tvorba intermediátů, ve které je DNA vnořena do primárního kanálu. Struktura intermediátů je specifická pro každou kombinaci RNAP a promotoru. Analyzovat tyto kinetické meziprodukty je velmi obtížné, proto toho o této fázi zatím mnoho nevíme.

Poté přechází RNAP s DNA do otevřeného komplexu. Uvnitř TATA boxu dochází k rozvolnění DNA a vytvoření transkripční bubliny (oblast jednovláknové DNA) od -12 do +2. Tato fáze probíhá většinou bez přítomnosti NTP. RNAP je v otevřeném komplexu chráněna před navázáním kompetitorů, např. heparinu. Stabilita otevřeného komplexu může být ovlivňována malými molekulovými efekty (ppGpp, iNTP, viz 3.2.1).

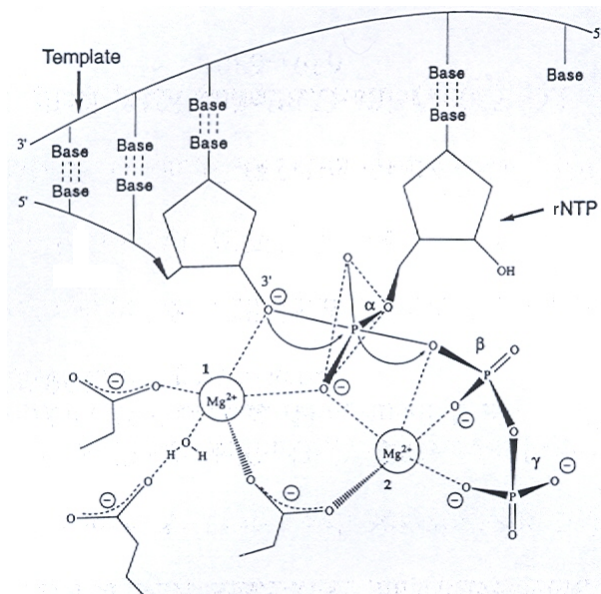
Po zformování stabilního otevřeného komplexu je přiřazen správný NTP k +1 pozici a začíná vlastní syntéza RNA. V této fázi může ještě docházet k abortivním transkripcím, opakovaným restartováním přepisu od +1 pozice za vzniku krátkých RNA produktů. Poté, co RNAP opustí promotor začíná elongační fáze, ve které je komplex promotoru s RNAP již velmi stabilní [3][8].



Obrázek 6: Komplex RNA polymerázy s DNA, primárním kanálem prochází DNA, sekundárním kanálem vstupují NTP do aktivního místa a Exit tunelem odchází hotová RNA, převzato z [8].

3.1.3.2 Elongace

Během elongační fáze se tvoří vlákno RNA podle DNA templátu. Polymerační reakce začíná přivedením NTP sekundárním kanálem do aktivního místa. Zde dochází k vazbě mezi 3' koncovým kyslíkem sacharidu předchozího nukleotidu a α -fosfátem nukleotidu následujícího. Při tom dochází k odštěpení pyrofosfátu. Chemicky se dá tato reakce popsat jako nukleofilní atak deprotonizované OH skupiny sacharidu na fosfát. Celý proces je umožněn koordinací kyslíku Mg^{2+} , čímž je zvýšena disociační konstanta hydroxylové skupiny [3][8].

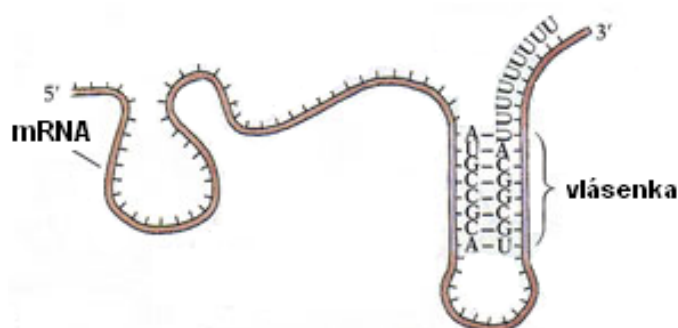


Obrázek 7: Dvou iontový mechanismus, převzato z [8].

3.1.3.3 Terminace

Polymerační reakce pokračuje dokud nedojde RNAP na konec operonu, kde se nachází terminátor. Tato charakteristická sekvence DNA může být dvojí povahy. Pro Rho dependentní je nutná přítomnost proteinu Rho, aby došlo k terminaci transkripce. Protein Rho rozeznává na mRNA sekvenci bohatou na cytosiny. Poté, co na ni nasedne, putuje po rostoucím vlákně k RNAP za spotřeby ATP. Transkripce je ukončena, když protein Rho dosáhne RNAP.

Terminátory nezávislé na Rho obsahují sekvenci DNA, která díky komplementaritě vytvoří po transkripci vlásenku. Poté následuje sekvence s častým opakováním uracilových bazí. Pnutí vzniklé rychlým zformováním vlásenky „cukne“ s vláknem RNA, které se díky nízké adhezi uracilů¹ vyváže z komplexu RNAP s DNA a tím ukončí transkripci [1][3][8][20].



Obrázek 8: Schéma sekundární struktury terminační sekvence mRNA, převzato z [20].

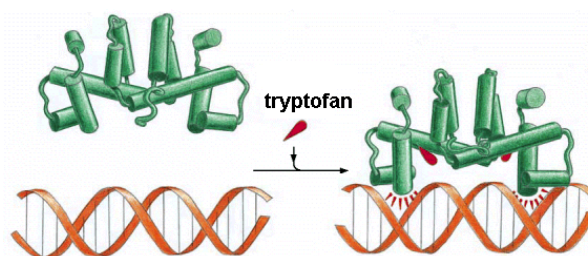
¹ Komplementární dvojice U-T tvoří jen dva vodíkové můstky. C-G tvoří tři.

3.2 Regulace genové exprese na úrovni transkripce

Regulovat množství produktu vyrobeného podle genetické informace je základní potřeba každé živé buňky. Pokud se organismus vyskytuje ve stabilním prostředí, není příliš nutné hladinu genové exprese měnit. Když ale dojde ke změně podmínek, závisí na rychlosti regulace jeho další přežití. Příčinou buněčného stresu může být změna teploty nebo pH v okolním prostředí. Dále se může jednat o nedostatek různých živin. V závislosti na tom je také potřeba regulovat, které geny budou exprimovány a které ne.

Regulace genové exprese se uskutečňuje na mnoha úrovních a liší se svými principy mezi prokaryotními a eukaryotními organismy. Prokaryotní organismy mají díky strukturování genů do operonů možnost regulovat metabolické dráhy složené z více enzymů najednou.

Mezi nejčastější regulační faktory na úrovni transkripce patří různé bílkovinné represory, které se vážou na operátor a znemožňují tak nasednutí RNAP. Například již zmíněný operon *trp* je regulovaný bílkovinným represorem TrpR. Pokud je přísun tryptofanu pro buňku zajištěn z okolí, naváže se tato



Obrázek 9: Represor TrpR, převzato z [1].

AK na represor. To změni jeho konformaci tak, že se pevně spojí s DNA na operátoru operonu *trp* a znemožní jeho transkripci. Pokud hladina tryptofanu poklesne, uvolní se z vazebného místa na represoru, který se díky tomu odpoutá od DNA a umožní tak transkripci. Vzniklé enzymy katalyzují vznik tryptofanu z jeho precursorů. Na stejném principu funguje regulace i dalších operonů, zodpovídajících za syntézu aminokyselin. Látka, která se váže na represor a měni jeho konformaci se nazývá induktor.

Represory mohou u některých genů pracovat i opačně: navázání induktoru do jejich struktury způsobí uvolnění DNA a transkripci genu. Příkladem je operon *lac*, který je aktivní pouze tehdy, je-li v buňce přítomná laktosa, za jejíž metabolismus tento operon odpovídá. Tento gen je také zároveň regulován bílkovinou reagující na stav glukosy v buňce. Operon *lac* je díky tomu transkribován pouze tehdy, je-li v buňce nízká hladina glukosy a vysoká hladina laktosy [1].

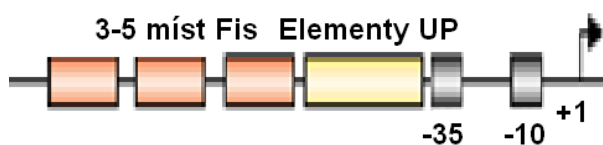
Regulace genové exprese pomocí represorů je velmi účinná a nedochází při ní k téměř žádným transkripčním inhibovaným genů. V případě, že by byl jeden gen regulován +1 pozicí (viz níže) a zároveň represorem (což je neobvyklé), byla by regulace represorem nadřazená a ovlivňovala by transkripci genu mnohonásobně více [5].

3.2.1 Regulace *rrn* operonů u *E. coli*

Ve výše zmíněných případech je genová exprese regulována tak, že ani není umožněna interakce RNAP s promotorem. Dalším způsobem je destabilizace otevřeného komplexu RNAP s DNA a regulace na +1 pozici. Zatímco většina promotorů u *E. coli* vytváří stabilní komplexy, promotory operonů, které kódují sekvenci všech tří rRNA (16S², 23S, 5S) tvoří výjimku. Na chromozomu *E. coli* je sedm ribozomálních operonů. U všech může transkripce začínat na dvou promotorech: P1, nebo P2. Každý z nich je aktivní při odlišných růstových stádiích buňky. U promotorů P1 je v šesti případech iNTP ATP a jednou GTP, u P2 i CTP. Pro více informací o ribozomech viz 3.3.

Na rozdíl od ostatních promotorů se u rRNA promotorů nachází také elementy UP a oblast Fis (factor for inversion stimulation). Ty jsou potřeba k zvyšování síly vazby DNA s RNAP, protože afinita RNAP k jádru tohoto promotoru je nižší než u jiných operonů. Interakce elementů UP s RNAP byla již zmíněna v 3.1.2. Fis je heterodimerní protein, který funguje v buňkách *E. coli* jako globální regulační faktor. Váže se na DNA směrem ke 5' konci od promotoru a UP elementů. Může interagovat s C-terminálními doménami podjednotky α . Vazbou do velkého žlábků na DNA zvětšuje její ohyb a umožňuje její lepší konformaci s RNAP při iniciaci transkripce.

Hladina proteinu Fis je přímo závislá na nutriční bilanci buňky. Nejvíce tohoto proteinu obsahují bakteriální kultury ve fázi raného exponenciálního růstu, krátce po přesunutí do čerstvého média. V tomto období mají buňky dostatečný přísun živin a vysoká hladina Fis stimuluje rychlý růst a dělení. S postupem exponenciální fáze se množství Fis v buňce snižuje a během stacionární fáze je již neměřitelné. V této fázi se přestávají buňky dělit s předešlou rychlostí, protože medium je jimi už přesycené a přísun živin se zmenšuje.



Obrázek 10: Schéma promotoru *rrn*, červené bloky představují vazebná místa pro protein Fis, žlutý blok elementy UP, šedé bloky konzervované hexamery, šipka označuje transkripční start, převzato z [8].

Elementy UP a oblasti Fis zesilují transkripci (oblasti Fis 3-8 krát, elementy UP 20-50 krát, tj. dohromady cca 300 krát), ale jestli k transkripci vůbec dojde je ovlivněno malými molekulovými efekty (iNTP, ppGpp), protože právě ty ovlivňují stabilitu RP_O . Použití těchto molekul má oproti regulaci pomocí různých proteinů nespornou výhodu: jejich koncentrace přímo a rychle vypovídá o koncentraci živin v okolí (zatímco *de novo* syntéza proteinů trvá poměrně dlouho).

² Svedberg, sedimentační koeficient charakteristický pro každou rRNA.

Energetický stav buňky je velmi dobře charakterizován koncentrací nukleosid trifosfátů, jejichž stav klesá, pokud se omezí přísun živin z okolí. Pokud tedy dojde k tomu, že bakteriální kultura vyčerpá medium, ve kterém se nachází, je potřeba regulovat další energetický výdej buněk, omezit proteosyntézu a přestat se dělit. V takové situaci není RNAP schopna vytvořit stabilní komplex s DNA a úroveň transkripce rRNA je výrazně snížena. Když jsou posléze buňky naředěny a přesunuty do čerstvého média, dochází ke zvýšení koncentrace NTP, což pozitivně ovlivňuje stabilitu RP_O a zvyšuje rychlost transkripce. Tento jev je ale pozorován pouze u některých promotorů, které potřebují pro maximální rychlosti iniciace transkripce relativně vysokou hladinu svého iNTP. Takové promotory se označují jako senzitivní.

Guanosin-3'-difosfát-5'-difosfát (ppGpp) zrychluje tvorbu RP_O , ale snižuje jeho stabilitu, čímž snižuje rychlost transkripce. PpGpp je syntetizován proteinem RelA. Tento protein je navázán přímo na ribozomu a reaguje na přítomnost nenabitých tRNA (tRNA bez AK) na A vazebném místě na velké podjednotce ribozomu (viz 3.3). To znamená, že k výraznému zvýšení hladiny ppGpp v buňce dochází pouze tehdy, má-li buňka nedostatek AK. Tímto mechanismem se sníží počet ribozomů v cytoplasmě a celková hladina proteosyntézy.

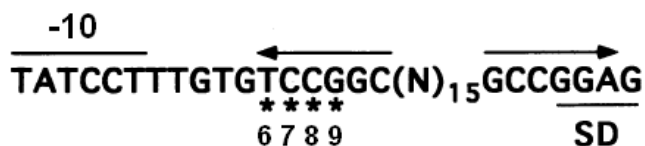
Aby tento mechanismus regulace malými molekulovými efekty vůbec fungoval, je potřeba přítomnost proteinu DksA. Ten svou strukturou zasahuje do NTP kanálu RNAP a snižuje stabilitu otevřeného komplexu. Tím zesiluje účinnost malých molekulových efektorů na rychlost iniciace transkripce. Protein DksA se vyskytuje především u G- bakterií. Má několik různých homologů u G+, ale ty nemají na regulaci operonů *rrn* velký vliv [4][8].

Stejným způsobem jako operony *rrn* je regulován i operon *fis*, zodpovídající za syntézu bílkoviny Fis. U *E. coli* je za transkripci a regulaci exprese operonu *fis* zodpovědný promotor *FisP*, který na své +1 pozici obsahuje CTP. Mutace tohoto nukleotidu ukázaly, že iniciace CTP je důležitou součástí regulace tohoto genu. S jinými nukleotidy na +1 pozici není regulace tak účinná. Dostatečná koncentrace CTP vyžaduje stálý přísun živin, proto je gen *Fis* exprimován pouze v buňkách v čerstvých médiích [13].

Dalším důležitým faktorem pro expresi genů regulovaných malými molekulovými efekty je sekvence diskriminátoru a délka mezerníku. Záměnou G a C bází za A a T báze v diskriminátoru se zcela ztrácí regulovatelnost promotoru, stejně jako změnou délky mezerníku ze 16ti bází na jinou délku. Tyto změny způsobí vyšší stabilitu RP_O , čímž zaniká význam regulace pomocí iNTP a ppGpp [4].

3.2.2 Vliv sekvence promotoru na expresi genu *pyrC* u *E. coli*

Jak již bylo zmíněno v 3.2, většina genů u *E. coli* je regulována pomocí různých inhibitorů a supresorů. Stejný mechanismus se předpokládá i u regulace genu *pyrC*, který kóduje enzym dihydroorotázu odpovídající za část metabolické dráhy pyrimidinů. U *E. coli* je celkem šest samostatných genů nebo operonů, které kódují šest enzymů katalyzující syntézu UMP, prekursoru všech pyrimidinových nukleosidů. Tyto geny jsou regulovány nezávisle na sobě dostupností pyrimidinu. Podle původních domněnek byl *pyrC* regulován represorem PurR, který se váže na operátor tohoto genu. Ale PurR je slabý represor, který navíc reaguje na koncentraci purinů, nikoliv pyrimidinů a stará se o rovnovážné zastoupení purinů a pyrimidinů. Exprese *pyrC* je ve skutečnosti primárně regulována translačními mechanismy, které ale vycházejí ze senzitivity vůči nukleotidům při výběru transkripčního startu.

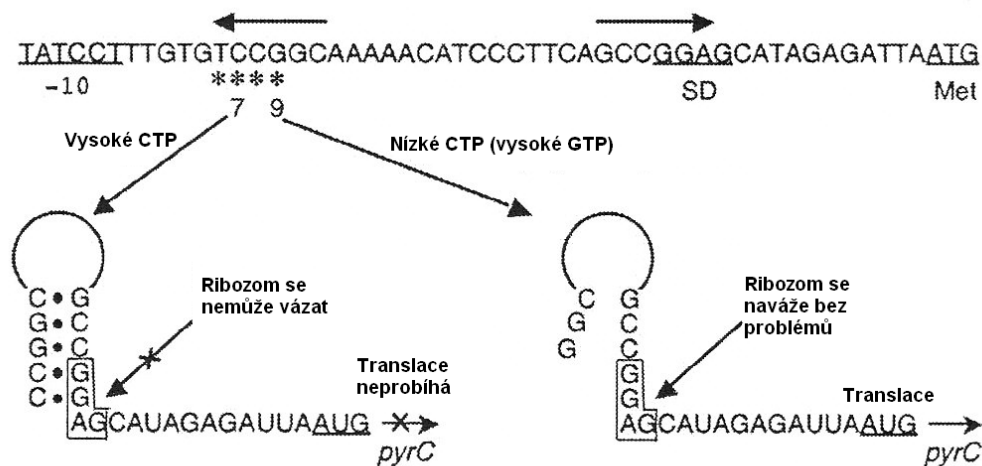


Obrázek 11: *pyrC* promotor, hvězdičky označují možná místa startu transkripce, šipky označují vzájemně komplementární oblasti podléající se na tvorbě sekundární struktury, mezi nimi je šestnáct nukleotidů, převzato z [9].

Transkripci tohoto genu je možné zahájit na jednom z nukleotidů 6 až 9 (nukleotidy jsou číslovány směrem od 5' konce -10 hexameru). Pomocí mutací tohoto promotoru bylo stanoveno, že nejsilnější pozicí pro iniciaci transkripce je 7, nejslabší jsou 9 a 10 ($7 > 8 > 6 > 9 > 10$). Preference iNTP byla stanovena takto: $ATP \geq GTP > UTP \gg CTP$.

Nejčastěji iniciuje transkripce na C-7 nebo G-9. Dochází zde ke kompetici mezi nejslabším iNTP (CTP), které se nalézá na nejsilnější pozici a iniciačně silnějším GTP na pozici nevhodné pro iniciaci. Výsledek tohoto soupeření závisí na koncentracích NTP v buňce. Pokud je hladina CTP vysoká, dochází k iniciaci transkripce primárně na C-7, pokud je nízká na G-9.

Abychom chápali, jak tato kompetice mezi iniciačními nukleotidy může ovlivnit expresi genu, musíme se podívat na vzniklý transkript. RNA iniciované na C-7 vzniká malé množství (protože CTP je slabé iNTP) a je delší o dva nukleotidy. To umožní vznik sekundární struktury na této mRNA, protože se vytvoří vlásenka mezi komplementárními bázemi na začátku transkriptu a v oblasti +20. Mezi komplementární báze účastníci se vzniku této vlásenky patří i část Shine-Dalgarno (SD) sekvence. SD sekvence je signální místo pro navázání ribozomu na mRNA, konsenzus SD sekvence je AGGAGG [16]. Kvůli participaci části této sekvence na tvorbě vlásenky se na vzniklou mRNA nemůže navázat ribozom, transkript není translatován a nedochází k vytvoření genu jím kódovaného. Pokud transkripce iniciuje na G-9, nevytvoří se vlásenka a k iniciaci translace dochází bez problémů.



Obrázek 12: Mechanismus regulace exprese genu *pyrC*, hvězdičky označují možná místa startu transkripce, šipky označují vzájemně komplementární oblasti podílející se na tvorbě sekundární struktury, Met je triplet bazí kódující AK methionin, startovní místo pro translaci, převzato z [9].

Gen *pyrC* je tedy negativně regulován hladinou CTP v buňce, stejně, jak se zjistilo později, jako operony *pyrD* a *carAB* (další operony kódující enzymy pro metabolismus pyrimidinů u *E. coli*). Pokud je koncentrace CTP ([CTP]) dostatečně vysoká, iniciuje transkripce primárně na C-7, což vede k vytvoření malého množství transkriptu, který navíc nemůže být kvůli vzniklé vlásence translatován. Pokud koncentrace CTP v cytoplasmě klesla, ale buňka nebude energeticky vyčerpána (signalizováno hladinou GTP), bude transkripce *pyrC* iniciovat primárně na G-9. To povede k vytvoření vyššího počtu translatovatelné mRNA a ke zvýšení syntézy dihydroorotázy.

Výsledky dosažené během výzkumu regulace exprese *pyrC* velmi dobře zapadají do rámce našich znalostí o regulaci genové exprese iNTP. Srovnání 300 promotorů u *E. coli* ukázalo, že ve 47 % případů je iniciačním nukleotidem ATP, ve 28 % GTP (dohromady 75 % puriny), v 15 % UTP a pouze v 10 % CTP. Tyto údaje jsou v souladu se zjištěnými preferencemi pozic a nukleotidů pro iniciaci transkripce u *pyrC* [9].

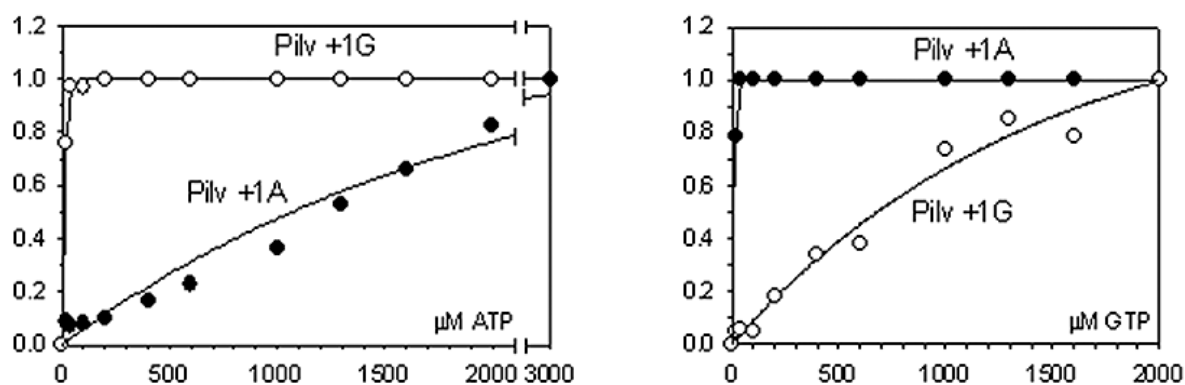
Předpokládá se, že podobný mechanismus přepínání iniciace transkripce jako u *pyrC* mezi dvěma nukleotidy se vyskytuje i u dalších genů [11].

3.2.3 Vliv identity +1 pozice na změny v genové expresi u *B. subtilis*

Jak ukazuje současný výzkum, pravidla pro regulaci genové exprese popsaná u *E. coli* neplatí univerzálně. Příkladem je regulace *rrn* promotorů u G+ bakterie *Bacillus subtilis*. Od gram negativní *E. coli* se liší už architekturou *rrn* promotorů. Diskriminátor je místo A-T bohatý na G-C, elementy UP mají pouze malý vliv a všechny *rrn* promotory iniciují na +1G pozici. Dále pak u *B. subtilis* neexistují žádné homology proteinu DksA, ani Fis. PpGpp se sice u *B. subtilis* také syntetizuje, ale sílu tran-

skripce ovlivňuje nepřímo. Při syntéze ppGpp je proteinem RelA spotřebováváno GTP. Vzniklé ppGpp následně inhibuje enzym IMP dehydrogenázu, který je součástí biosyntézy GTP. Důsledkem toho vzniká při nedostatku AK rozdíl v hladinách ATP a GTP. Hladina GTP je tedy vysoká jen při dostatku AK, při jejich nedostatku je převýšena hladinou ATP. Protože *rrn* promotory iniciují GTP, jsou negativně regulovány při nedostatku AK. Naopak, jak ukázala analýza transkripčních startů jiných genů, většina pozitivně regulovaných genů iniciuje ATP. Nepřímý vliv ppGpp na iniciaci transkripce byl dokázán pomocí mutovaného promotorového jádra *rrnB* P1, u kterého byla +1 GTP pozice zaměněna za ATP. To mělo za následek zvyšování exprese tohoto genu zároveň s rostoucí koncentrací ATP, ačkoliv takový nárůst *in vivo* signalizuje nedostatek AK. Podobných výsledků bylo nedávno dosaženo i u bakterie *Thermus thermophilus*, *B. subtilis* tedy zřejmě není ojedinělou výjimkou.

Příkladem genu iniciujícího ATP je *Pilv*, který řídí transkripci operonu *ilv-leu*. Tento operon kóduje geny pro biosyntézu aminokyselin leucinu, isoleucinu a valinu, musí tedy nutně být pozitivně regulován nedostatkem AK.



Obrázek 13: Vliv +1 pozice a koncentrace iNTP ([iNTP]) na aktivitu promotoru. V levé části je reakce na koncentraci ATP ([ATP]), v pravé na GTP. *Pilv* +1A je původní promotor (černé body), *Pilv* +1G jeho mutace (nevyplněné body). Osa x ukazuje [iNTP], osa y relativní hodnotu transkripce. Pomalý nárůst aktivity promotoru s rostoucí [iNTP] je charakteristický pro regulovaný promotor, rychlý nárůst pro neregulovaný. Při záměně +1 pozice z A na G se zcela obrátí mechanismus regulace. Promotor, který byl původně regulován [ATP] je po nahrazení +1 pozice závislý na [GTP] a na změnu [ATP] nereaguje. Převzato z [5].

Oproti *E. coli* jsou u *B. subtilis* změněny poměry mezi iniciujícími nukleotidy: 56 % ATP, 38 % GTP (94 % puriny celkem), UTP 4,5 %, CTP 1,5 % (podle srovnání 130 promotorových jader rozeznávaných podjednotkou σ^A).

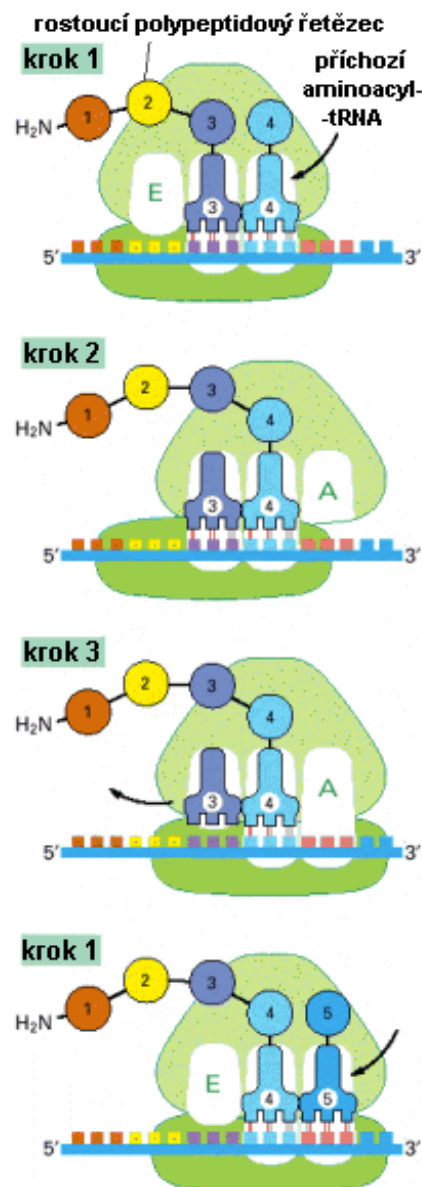
U G- bakterií se vznik senzitivity vůči iNTP vysvětluje interakcí bílkoviny DksA s RNAP. Tím se RP_O destabilizuje a zesiluje se vliv malých molekulových efektorů. U G+ bakterií se transkripce žádný podobný faktor nezúčastní a RP_O je senzitivní pouze na iNTP [5].

3.3 Translace

Translace je překlad genetické informace z pořadí nukleotidů v mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Translace je katalyzovaná ribozomy, organelami tvořenými rRNA a proteiny. Ribozomy se skládají z malé a velké podjednotky a jsou esenciální součástí proteosyntézy. Jejich počet v cytoplasmě přímo ovlivňuje rychlost syntézy proteinů a generační čas bakterií. Ribozomy mohou v exponenciální fázi růstu bakteriálních buněk tvořit až 40 % hmotnosti ze sušiny buňky.

Aby mohly ribozomy syntetizovat bílkoviny, je nejdříve potřeba aktivovat aminokyseliny. To je uskutečňováno specifickým enzymem aminoacyl-tRNA syntetázou, který navazuje aminokyseliny na tRNA s odpovídajícím antikodonem. Každá buňka má dvacet různých aminoacyl-tRNA syntetáz, pro každou aminokyselinu jednu.

Translace probíhá ve třech fázích, podobně jako transkripce. Při iniciaci se naváže mRNA svým 5' koncem na peptidylové místo na malé podjednotce ribozomu a poté se obě podjednotky spojí. Bakteriální mRNA obsahuje signální sekvenci šesti nukleotidů před každou oblastí kódující bílkovinu (DS sekvence). Díky tomu je možné, aby se ribozom navázal i na prostředek mRNA, pokud nese více genů. Pořadí aminokyselin v bílkovině je určeno pořadím kodonů (trojic bází) na mRNA. Počátek translace je ve všech organismech určen kodonem AUG, který specifikuje čtecí rámeček. Pro vytvoření správně fungující bílkoviny je čtecí rámeček velmi důležitý, protože kdyby došlo k jeho posunutí, syntetizovala by se zcela jiná bílkovina. Kodon AUG kóduje aminokyselinu methionin, která tak tvoří N-konec všech nově vzniklých bílkovin, ačkoliv je ve většině případů následně odštěpena speciální proteázou. Iniciační fáze je ukončena vazbou methionin-tRNA na vazebné místo P na malé podjednotce.



Obrázek 14: Připojení AK k peptidickému řetězci probíhá ve třech krocích: při prvním kroku nasedá aminoacyl-tRNA na vazebné místo A, ve druhém kroku dochází k posunu této aminoacyl-tRNA do vazebného místa P za vzniku peptidické vazby AK s již vytvořeným řetězcem, třetím krokem je vyloučení předchozí tRNA z vazebného místa E, poté se celý cyklus opakuje, převzato z [1].

V elongační fázi se na vazebné místo A váže další aminoacyl-tRNA s odpovídajícím antikodonem. Při posunu velké podjednotky vůči malé dojde ke vzniku peptidické vazby mezi C-terminální doménou první aminokyseliny a N-terminální doménou druhé. Tato reakce je katalyzována enzymem peptidyltransferázou, který je lokalizován ve velké podjednotce ribozomu. Energie potřebná ke vzniku této vazby pochází z rozštěpení makroergické vazby mezi tRNA a methioninem (dále pak rozštěpením vazby předchozí aminokyseliny a její tRNA). Posunutím ribozomu k 3' konci mRNA se posune čtecí rámec a přeruší se vazba mezi iniciačním kodonem na mRNA a antikodonem první tRNA, která je tím uvolněna z vazebného místa E. Do volného místa A se naváže další aminoacyl-tRNA a celý proces se opakuje, dokud není translace ukončena jedním z terminačních kodonů. Poté se nově vzniklý protein uvolní a ribozom se rozpadne na podjednotky [1].

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje

Centrifugy

Heraeus Cryofuge 8000 - chlazená centrifuga s výkyvným rotorem, maximální zrychlení 8000 x g

Universal 16 R - chlazená mikrocentrifuga s maximálním odstředivým zrychlením 20 000 x g

Qualitron, INC. - stolní centrifuga na krátké stáčení roztoku v mikrozkuhavce

Elektroforézy

Vertikální elektroforéza Sigma - velikost gelu: 16,5 cm x 17,5 cm

Horizontální agarózová elektroforéza OWL - velikost gelu: 13 x 11,5 cm, 7 x 8 cm

Agarózová elektroforéza - velikost gelu: 6,5 x 7,5 cm

Elektroforetické zdroje Bio-Rad Model 500/200 a POWER PAC 3000

Inkubátory a třepačky

Eppendorf Termostat 5320 - používán pro inkubaci roztoků s restrikčními endonukleázami

Thermo 120 - termoblok s možností nastavení teploty

Biological Termostat BT 120 - používán pro inkubace Petriho misek s transformovanými buňkami

Block Heater Stuart SBH130D

Ostatní

Denzitometr Bio-Rad Molecular Imager FX (USA)

Expoziční kazeta s expoziční fólií BAS-MS2040 Fuji (Japan)

Spektrofotometr - Shimadzu UV - 1601

PCR Cyclor - PTC - 100 MJ Research

PCR Cyclor - PTC - 200 MJ Research

GM počítač mini-monitor Series 900

Sušička gelů Biometra D 62

Vakuová pumpa KNFLAB Laboport

4.2 Používané chemikálie, enzymy a další preparáty

Agar pro pevné půdy (Lachema, ČR)

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

Aqua pro injectione biotika (Braun, SRN)

Akrylamid (Serva, USA)

Amoniumpersulfat (Serva, USA)

Ampicilin (Biotika, SR)

Bromphenole blue (Serva, USA)

EDTA (chelaton III, Lachema, ČR)

GTP (Roche, USA)

ATP (Roche, USA)

CTP (Roche, USA)

UTP (Roche, USA)

[α - ^{32}P] UTP (M.G.P., ČR)

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

N, N' - methylenbisacrylamid (Serva, USA)

Trishydroxyethylaminomethan (Serva, USA)

Octan sodný (Lachema, ČR)

Ethanol (Penta, ČR)

Glykogen (Applied biosystems, USA)

Fenol (Fluka, USA)

Chloroform (Penta, ČR)

BSA (hovězí albumin) (Takara, Japonsko)

pufř pro Taq polymerázu (Roche, USA)

Restrikční endonukleázy - *EcoRI*, *HindIII*, (TaKaRa, Japonsko) + restrikční pufř H a M

RNA polymeráza holoenzym z *E. coli* (Epicentre biotechnologies, USA)

T4 DNA ligáza (Takara, Japonsko)

4.3 Složení pufrů a medií

LB medium	
Látka	Množství na 1 liter
Tryptone	10 g
Kvasnicový extrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	doplnit objem do 1 l

TAE pufr	
Látka	Množství na 1 liter 50x TAE
Tris.HCl	242 g
Kyselina octová	57.1 ml
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	100 ml
H ₂ O	doplnit objem do 1 l

TBE pufr	
Látka	Množství na 1 liter 10x TBE
Tris.HCl	108 g
Kyselina boritá	55 g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40 ml
H ₂ O	doplnit objem do 1 l

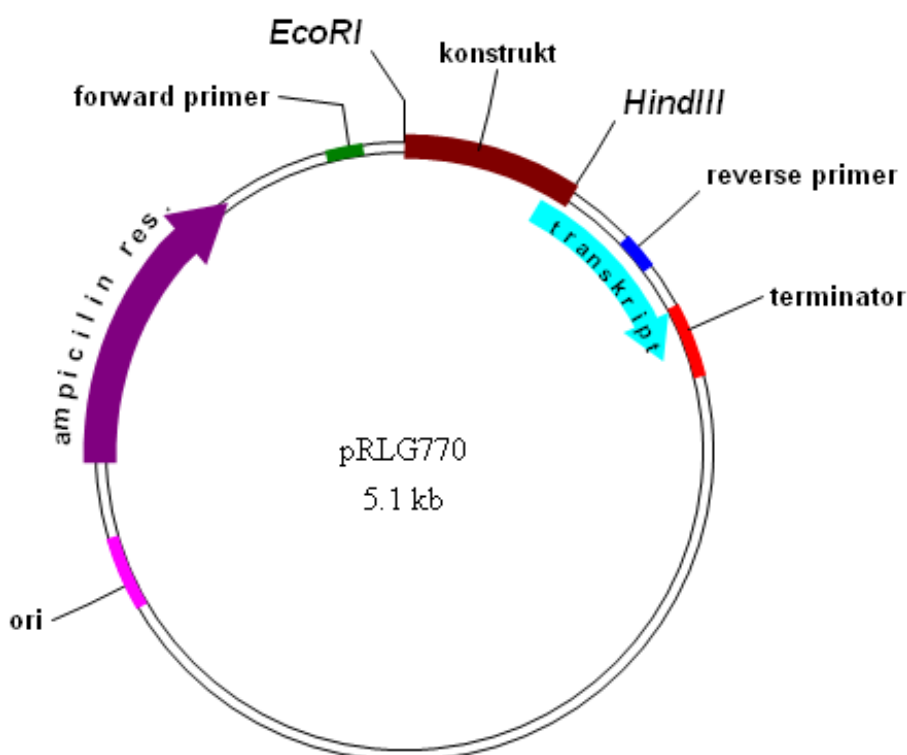
Transkripční pufr	
Látka	10 x koncentrovaný pufr
Tris.HCl pH 7,9	800 mM
MgCl ₂	200 mM
DTT	20 mM

4.4 Práce s DNA - příprava plasmidu s promotorovým konstruktem

Cílem klonování DNA bylo vytvoření plasmidu obsahující vybrané promotorové jádro. Tento plazmid sloužil následně jako DNA templát při transkripci *in vitro*.

Pro klonování byl použit plasmid pRLG770. Tento vektor tvoří 5080 párů bází a obsahuje několik restrikčních míst, mezi nimi i sekvence rozeznávané endonukleázami *EcoRI* a *HindIII*. Mezi tato dvě restrikční místa se vkládá konstrukt - promotorové jádro. Zhruba 120 bp od štěpícího místa pro *HindIII* směrem ke 3' se nalézá rho-independentní terminátor z *rrnB* genu *E. coli*. Na tomto terminátoru končí transkripce započatá na vloženém promotoru.

Jako selekční marker při klonování slouží gen β -laktamázy, který poskytuje rezistenci na ampicilin. Pokud buňka přijala plasmid s promotorovým konstruktem, projeví se to rezistencí na toto antibiotikum. Dále je na plasmidu obsaženo *ori* (sekvence určující počátek replikace), jehož součástí je promotor pro RNA1. Ten slouží pro regulaci počtu kopií plasmidu v buňce. Pokud je už v buňce dosaženo maximálního počtu kopií tohoto plasmidu, krátké RNA sekvence vytvořené na tomto promotoru se komplementárně vážou k nově vzniklé DNA při replikaci a inhibují tak její dokončení.



Obrázek 15: Plasmid pRLG770 s vyznačenými důležitými sekvencemi, modrá šipka označuje úsek přepisovaný do RNA při *in vitro* transkripci, který začíná na vloženém konstrukt. Fialová šipka označuje gen pro rezistenci na ampicilin. Vytvořeno v program BV Tech Plasmid. Úseky DNA nejsou v reálném poměru.

4.4.1 Izolace plasmidové DNA z *E. coli* DH5 α

4.4.1.1 Minipreparace

Touto metodou byla získávána plasmidová DNA pro ověření sekvencí vložených DNA konstruktů. Minipreparace byla prováděna pomocí souprav QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy QIAGEN. Principem této izolace plasmidové DNA je adsorpce DNA na silikagel v prostředí vysoké koncentrace solí. RNA, proteiny a další nízkomolekulární nečistoty jsou z kolonky odmyvány zvýšenou koncentrací solí. Plasmidová DNA je z kolonky eluována nízkou koncentrací solí. Minipreparace se liší od midipreparace 4.4.1.2 množstvím získané DNA. U midipreparace je také opačné pořadí koncentrací solí při promývání.

Použité roztoky:

Pufr P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, 100 g/ml RNÁza A

Pufr P2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Pufr N, Pufr PB, Pufr PE

Puf EB: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Vlastní postup:

- Jednou kolonií bylo inokulováno 7,5 ml LB média s antibiotikem ampicilin (konečná koncentrace 100 g/ml). Následně bylo inkubováno a třepáno 12-16 hodin ve 37 °C.
- Roztok kultury byl centrifugován při 10 000 x g, 10 minut ve 4 °C a supernatant byl odstraněn.
- Sediment byl resuspendován v 250 μ l pufru P1 a převeden do mikrozkuhavky.
- Bylo přidáno 250 μ l pufru P2, směs byla promíchána převrácením mikrozkuhavky (5-6 x) a inkubována 2 minuty na ledu.
- Lýze byla zastavena přidáním 350 μ l pufru N3, směs byla opět několikrát promíchána a inkubována 1 minutu na ledu. Sraženina byla centrifugována 20 minut při 14 500 x g a 4 °C.
- Supernatant byl promíchán a přepipetován na kolonku QIAprep, a převeden přes ni pomocí centrifugace (12 000 x g, 1 min, 4 °C).
- Prošlý roztok byl přepipetován na kolonku a znovu přes ni pomocí centrifugace převeden.

- Kolonka s navázanou plasmidovou DNA byla přečištěna 1 x 0,5 ml pufru PB a 2 x 0,75 ml pufru PE.
- Zbytky roztoků byly z kolonky odstraněny pomocí centrifugace (1 min).
- plasmidová DNA byla z kolonky eluována nanesením 50 μ l pufru EB a následnou centrifugací roztoku do čisté mikrozkuhavky.

4.4.1.2 Midipreparace

Touto metodou byla z buněk *E. coli* získávána plasmidová DNA o dostatečné čistotě a v dostatečném množství pro další pokusy. Midipreparace byla prováděna pomocí soupravy QIAfilter Plasmid Midi Kit od firmy QIAGEN. Principem této metody je alkalická lýze buněk a následná iontoměničová chromatografie.

Nabité molekuly z buněčného extraktu (DNA, RNA, některé proteiny) jsou vázány elektrostatickými silami k částicím v elektrostatické matrix, neboli pryskyřici (resin), v promývací kolonce. Promýváním kolonky roztoky se stoupající koncentrací solí se přerušuje elektrostatická vazba a látky jsou eluovány (přestávají být vázány) v pořadí proteiny, RNA, DNA. Plasmidová DNA je tedy k resinu vázána při nízké koncentraci solí a po oddělení od kontaminujících proteinů a RNA je eluována roztokem s vysokou koncentrací solí.

Použité roztoky:

Pufr P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 g/ml RNÁza

Pufr P2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Pufr P3: 3 M octan draselný, pH 5,5

Pufr QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % isopropanol (v/v), 0,15 % Triton X-100 (v/v)

Pufr QC: 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % isopropanol (v/v)

Pufr QF: 1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 8,5, 15 % isopropanol (v/v)

Zásobní roztok ampicilinu (50 mg/ml)

Vlastní postup:

- Z glycerolové konzervy uložené v -80 °C byla vložena bakteriální kultura do LB média s antibiotikem ampicilin (konečná koncentrace 100 μ g/ml). Kultura byla následně inkubována za stálého třepání 8-10 hodin ve 37 °C.

- Narostlá kultura byla centrifugována při 10 000 x g, 15 minut, při teplotě 4 °C.
- Po odstranění supernatantu byl sediment resuspendován ve 4 ml pufru P1.
- Přidáním 4 ml pufru P2 a jemným promícháním obsahu kyvety celý roztok do cca 1,5 min zmodral. Změna barvy je způsobena indikátorem pH, který je obsažen v pufru P2 a indikuje lyzi bakteriálních buněk.
- Přidáno 4 ml neutralizačního pufru P3 a vše bylo opět jemně promícháno do té doby než se roztok odbarvil a vytvořil se „tvaroh“.
- Pomocí stříkačky z kitu byl roztok zbaven tvarohu přenesen do kolonky ekvilibrované 4 ml pufru QBT.
- Kolonka byla dvakrát promyta 10 ml pufru GC.
- plasmidová DNA byla z kolonky eluována 5 ml pufru QF do nové zkumavky.
- Do zkumavky bylo přidáno 3,5 ml isopropanolu, plasmidová DNA v tomto prostředí precipituje.
- Roztok byl následně centrifugován při 9 000 x g, 30 min, při 4 °C.
- Po slítí supernatantu byl pelet usušen ve vakuu.
- Pelet byl rozpuštěn v 150 μ l injekční vody (rozpuštění trvá 8-10 hodin).

4.4.1.3 Čištění plasmidové DNA fenolem a chloroformem

Touto metodou se DNA čistí od znečišťujících proteinů, hlavně od RNÁzy, která se používá při midipreparaci (pufr P1). Směs fenolu a chloformu sráží proteiny, které se pak vyskytují na hranici vodné a fenolové fáze. Centrifugováním je možné je od sebe oddělit a vodnou fázi s DNA odpipetovat. Fenol a chloroform jsou jedovaté těkavé látky, proto je potřeba pracovat v odvětrávané digestoři.

Použité roztoky:

Fenol - ekvilibrovaný s 0,1 M Tris, pH 8-9, 0,1 % 8-hydroxychinolinem, 0,2 % 2-mercaptoethanolem
Chloroform

Vlastní postup:

- K roztoku s plasmidovou DNA byl připipetován fenol v poměru 1 : 1, poté byla směs důkladně promíchána.
- Vodná fáze byla přepipetována do nové zkumavky.
- Do zkumavky byl připipetován poloviční objem fenolu a stejný objem chloroformu.
- Směs byla centrifugována při 13 500 x g, 5 min.
- Vodná fáze byla přepipetována do nové zkumavky.
- Přidán stejný objem chloroformu.
- Centrifugace při 13 500 x g, 5 min.

4.4.1.4 Srážení plasmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného

Srážení, neboli precipitace, je vznik nové oddělené pevné fáze (DNA) ve fázi kapalné.

Použité roztoky:

3 M octan sodný (Naac), pH 5,2

96 % ethanol

70 % ethanol

Vlastní postup:

- Roztok s plasmidovou DNA byl smíchán s 1/10 objemu 3 M NaAc, pH 5,2.
- K vzniklému celkovému objemu byl přidán 2,2 násobek objemu 96 % ethanolu (-20 °C) a vše bylo důkladně promícháno.
- Směs byla inkubována 10 minut v -80 °C.
- Centrifugace při 14 000 x g, 15 min, při 4 °C.
- Pelet byl opláchnut vychlazeným 70 % ethanolem, usušen a rozpuštěn v 50 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7,9.
- Koncentrace plasmidové DNA byla určena spektrofotometricky, při vlnové délce 260 nm. Dále byl určen poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm.

4.4.1.5 Analýza plasmidové DNA restrikčním štěpením

Použité roztoky:

Restrikční endonukleázy *EcoRI* a *HindIII*: konečná koncentrace 1-2 U/500 ng³ DNA

Pufr M

Pufr H

Roztok EDTA 0,5 M, pH 5,2

Injekční voda

Vlastní postup:

- Nejprve byla namíchána restrikční směs o objemu 10 μ l, která obsahovala plasmidovou DNA, restrikční endonukleázu a restrikční pufr.
- V případě, že bylo štěpeno dvěma enzymy současně, byl použit takový pufr, ve kterém oba enzymy vykazovaly vysokou aktivitu.
- Restrikční směs byla inkubována 1 hodinu v 37 °C.
- Po inkubaci byla reakce ukončena přidáním roztoku EDTA (chelaton III, sloučenina vyvazující hořčnaté ionty nezbytné pro aktivitu enzymu).

4.4.1.6 Elektroforetická analýza DNA

K analýze plasmidové DNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza. Princip této metody je v tom, že DNA se v roztoku chová jako polyanion a v elektrickém poli se pohybuje k anodě. Pro odhad délky a koncentrace fragmentů DNA byl použit hmotnostní marker (DNA z λ bakteriofága štěpená *EcoRI* a *HindIII*, velikost fragmentů v rozmezí 564 bp - 21 226 bp). Podle výsledku elektroforetické analýzy lze odhadnout koncentraci DNA ve vzorku a také, zda-li je ve vzorku dostatečné množství DNA použitelné pro další kroky.

³Unit definition (jednotková definice) je veličina charakteristická pro každý enzym. V případě restrikčních endonukleáz je jedna jednotka definována jako množství enzymu potřebného k štěpení 1 μ g of λ DNA za 1 hodinu při 37 °C v celkovém objemu 50 μ l.

Obrázek 16: Ilustrační fotografie separace plasmidů,

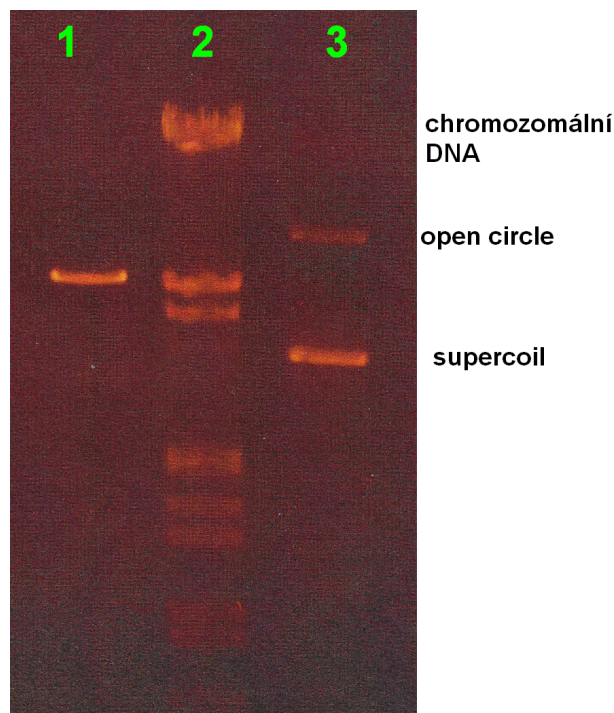
1 % agarozový gel,

1 - lineární plasmid po štepění *HindIII* a *EcoRI*,

2 - λ marker DNA *HindIII* a *EcoRI*,

3 - neštěpený plasmid, popisky po pravé straně označují pozice na kterých se pohybuje supercoil (plasmid s vláknem DNA v nadšroubovicové struktuře, tato konformace je nezbytná pro experimenty *in vitro*),

open circle (plasmidová DNA s jednovláknovým zlomem) a chromozomální DNA, která ve vzorku zůstala po izolaci z *E. coli* (na tomto snímku je jí pouze neznatelné množství). Foto: Luděk Sojka



Použité roztoky:

Agaróza

50x TAE, pH 8,0 - 2M Tris-acetát, 50 mM EDTA, pH 8,0

Ethidium bromid - 10 mg/ml

Vzorkový pufr pro DNA - 2,5 mg/ml bromfenolová modř, 2,5 mg/ml xylen cyanol, 30 % glycerol, 6 mM EDTA

Vlastní postup:

- Nejprve byla sestavena elektroforéza.
- 0,3 g agarózy bylo v mikrovlné troubě rozvařeno v 1x TAE na 1 % agar.
- Agaróza byla poté ochlazena pod tekoucí vodou na teplotu asi 50 °C a nalita do aparatury na elektroforézu. Do gelu byly pomocí „hřebenu“ vytvořeny komůrky.
- Do připravených komůrek nanášeny vzorky plasmidové DNA a hmotnostní marker.
- Po nanesení vzorků byla DNA dělena za stálého napětí 5 V.cm⁻¹. Ke sledování průběhu elektroforézy sloužila bromfenolová modř a xylene cyanol (bromfenolová modř putuje přibližně na úrovni 250 bp a xylen cyanol 2500 bp).
- Po půl hodině byl el. proud zastaven a gel byl vložen do EtBr lázně na další půl hodinu.

- Gely byly prohlíženy na UV transiluminátoru při vlnové délce 320 nm (v této oblasti je vidět ethidium bromid integrovaný do DNA) a vybrané gely byly fotografovány přístrojem Polaroid nebo Panasonic do digitálního formátu.
- U plasmidů byla zkoumána jejich kvalita i kvantita.
- Pokud to vyžadoval další postup, byly vybrané DNA fragmenty z gelu izolovány.

4.4.1.7 Izolace DNA z gelu

Izolace DNA z gelu byla prováděna pomocí soupravy QIAEX II od firmy Qiagen. Preparace je založena na afinitní chromatografii, kdy se DNA váže na silikagelové kuličky v prostředí chaotropních solí.

Použité roztoky:

Pufr QG

Pufr PE

Pufr EB

Isopropanol

Vlastní postup:

- Z agarózového gelu byl skalpelem vyříznut bloček obsahující DNA pro izolaci.
- Dílek byl zvážen a vložen do mikrozkušavky.
- Do mikrozkušavky byl přidán pufr QG (300 μ l pufru na 100 mg gelu).
- Směs byla důkladně promíchána a inkubována 10 minut v 50 °C (každé dvě minuty inkubace byla směs opět důkladně promíchána).
- Následně bylo upraveno pH roztoku podle přítomného barevného indikátoru. Pokud byla barva roztoku oranžová nebo fialová byl přidán 3 M octan draselný pH 5,0 dokud nebyl roztok žlutý.
- Ke směsi byl přidán isopropanol v poměru 100 μ l na 100 mg gelu.
- Roztok byl přenesen na kolonku s membránou a centrifugován 1 minutu při 12 500 x g a tento krok zopakován.
- Na kolonku bylo nanášeno 0,5 ml pufru QG, který byl centrifugován 1 minutu při 12 500 x g.

- Na kolonku bylo naneseo 0,75 ml pufru PE, který byl centrifugován 1 minutu při 12 500 x g.
- Kolonka byla centrifugována „na sucho“ 1 minutu při 12 500 x g a supernatant byl odstraněn a kolonka byla přenesena do nové mikrozkušavky.
- DNA byla z membrány eluována 50 μ l pufru EB, který byl centrifugován do připravené mikrozkušavky.

4.4.2 Klonování DNA

4.4.2.1 Příprava DNA inzeru

Inzerty byly skládány z komplementárních jednovláknových DNA řetězců (primerů). Tyto primery byly navrženy tak, že na výsledném dvouvlákně DNA vznikly přesahující lepivé konce odpovídající štěpení restrikčními enzymy *EcoRI* a *HindIII*, které ale neobsahovaly fosfát na konci vláken. Pro annealing (spojení dvou vláken k sobě) bylo potřeba do reakční směsi přidat pufr pro polymerázu *Taq*. Tím se vytvoří stejné iontové prostředí jako u PCR, čímž se umožní hybridizace (spojování vláken komplementárními bázemi) obou vláken. Schéma DNA inzeru: Jednotlivé jednovláknové DNA řetězce byly objednávány u externí firmy (EastPort, ČR).

226/hsmBI H

```

EcoRI        -35                -10                +1                HindIII
AATTC GTTTATTGTGT TAATCATTACAAAAAATGATAAAAATAAAAAAGCAAGACGTATA
5'                                                3'

```

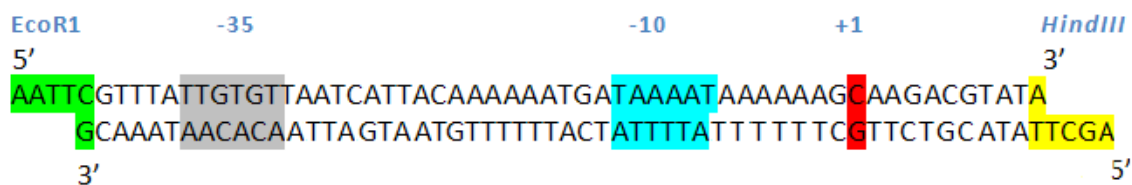
226/hsmBI D

```

HindIII       +1                -10                -35                EcoRI
AGCTTATACGTCTTCTTTTTATTTCATTTTTGTAAATGATTAAACACAATAAACG
5'                                                3'

```

Obrázek 17: Schéma jednotlivých primerů, obě dvě vlákna jsou zobrazena od 5' konce k 3'. Barevně jsou vyznačeny důležité sekvence.



Obrázek 18: Vlákno DNA vzniklé spojením obou primerů.

Vlastní postup:

- Do mikrozkušavky bylo napipetováno po 5 μ l forward a reverse vlákna DNA, 10 μ l 10 x pufru *Taq* pol, 5 μ l 25 mM MgCl a doplněno vodou do objemu 100 μ l.
- Směs byla vložena do PCR cycleru v programu kdy během 1 hodiny klesá teplota směsi z 95 °C na 45 °C rychlostí 1 °C za minutu.

4.4.2.2 Příprava plasmidu a ligace DNA inzertu

Plasmid pRLG770 byl nejprve štěpen odpovídajícími restrikčními endonukleázami (viz 4.4.1.5), restrikční směsi byly rozděleny agarózovou elektroforézou a štěpený plasmid z gelu izolován. Takto připravený plasmid byl použit pro ligaci s inzertem. K ligaci byla používána T4 DNA ligáza od firmy Takara o koncentraci 20 U/ μ l⁴. Enzym DNA ligáza spojuje kohezní konce plasmidů a ligovaných inzertů za vzniku fosfodiesterových vazeb. Reakce je energeticky náročná a vyžaduje přítomnost ATP v pufru.

Vlastní postup:

- Nejprve byly namíchaný reakční směsi tak, aby obsahovaly plasmid a inzert v molárním poměru 1 : 5. Obvykle bylo použito 50-100 ng plasmidu, 1-5 U ligázy a ligační pufr o koncentraci 1 x.
- Směs byla inkubována 3-16 hodin při 16 °C.
- Ligace byla ukončena inaktivací enzymu inkubací při 65 °C po dobu 15 minut.

4.4.2.3 Transformace buněk *E. coli* KB DH5 α

Transformace všech kmenů byla prováděna metodou tepelného šoku. Kmen KB DH5 α nemá plasmid kódující gen pro β -laktamázu.

⁴Zde je jedna jednotka definována jako množství enzymu schopné zligovat více jak 90 % z 6 μ g λ DNA *HindIII* fragmentů za 30 minut v 16 °C v celkovém objemu 20 μ l.

Vlastní postup:

- Zmražené kompetentní buňky byly roztáty v ledové lázni. Na ledu byly také vychlazeny zkumavky pro další použití.
- Ligační směs a neupravené plasmidy (negativní kontrola) byly rozpipetovány do vychlazených (0 °C) zkumavek a bylo připipetováno po 200 μ l kompetentních buněk. Směsi byly lehce protřepány a inkubovány 30 minut v ledové lázni.
- Mikrozskumavky byly inkubovány 90 sekund ve 42 °C (teplotní šok) a pak 5 minut v ledové lázni.
- Do každé mikrozskumavky byl přidán 1 ml LB média. Mikrozskumavky byly třepány 1 hodinu v 37 °C v horizontální poloze.
- Buňky byly krátce centrifugovány, supernatanty byly odlity a sedimenty byly resuspendovány ve zbytku média, který stekl zpět ze stěn mikrozskumavky.
- Buňky byly rozetřeny na misky s ampicilinem a inkubovány 12-16 hodin ve 37 °C dnem vzhůru.
- Buňky, které přijaly plasmid s insertem získaly rezistenci na ampicilin a vytvořily kolonie i v antibiotickém mediu. Negativní kontrola prokázala, že bez genu pro β -laktamázu nemohou bakteriální buňky v LB mediu s ampicilinem narůst.

4.4.2.4 Sekvenační reakce

K ověření úspěšnosti klonování a transformace byla použita sekvenační reakce a její vyhodnocení na kapilárním sekvenátoru. K amplifikaci byl použit systém BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). K sekvenaci byly použity tyto primery: 30 F forward primer pro p770 (~60 bp 5' směrem od *EcoRI*): CCACCTGACGTCTAAGAAACC.

1620 R reverse primer pro p770 (~25 bp 3' směrem od *HindIII*): GCGCTACGGCGTTTCACTTC.

Vlastní postup:

- Nejprve byl do 200 μ l mikrozskumavek namíchán sekvenační mix o finálním objemu 10 μ l, Jedna reakce obsahovala: 2 μ l premixu BigDye Terminátor
1 μ l forward nebo reverse primeru (3-10 pmol)
7 μ l plasmidové DNA z minipreparace

- Směs byla dobře promíchána, vložena do cycleru a reakce probíhala v cyklu 96 °C 10 sec. - taní DNA, 45 °C 5 sec. - nasedání primerů, 60 °C 4 min - polymerace, celkově v 35ti cyklech.
- K produktům reakce bylo přidáno 10 μ l 3 M NaAc a 80 μ l vody. Vzorek byl promíchán a přepipetován do 1,5 ml mikrozkušavky.
- Bylo přidáno 5 μ g glykogenu a promícháno. Následně bylo přidáno 300 μ l 96 % ethanolu a opět promícháno, tímto krokem byl produkt sekvenační reakce sražen.
- Vzorek byl centrifugován 20 minut při 17 000 x g a 4 °C.
- Pelet byl opláchnut 250 μ l 70 % ethanolu a centrifugován jako v předchozím bodě.
- Pelet byl usušen ve vakuu a odeslán do sekvenační laboratoře.
- DNA sekvence byla kontrolována pomocí programu Chromas. Bakteriální kolonie obsahující požadovaný plasmid s inzertem byly zakonzervovány do glycerolových konzerv (850 μ l buněčné kultury a 150 μ l glycerolu) a uschovány při -80 °C.

4.5 Metody práce s proteiny

4.5.1 Rekonstituce jádra RNAP a podjednotky σ^A z *B. subtilis*

Touto metodou se oba proteiny složí do funkční holoenzymu RNAP. Jádro RNAP bylo izolováno v naší laboratoři metodou afinitní chromatografie na Ni²⁺ iontech.

Použité roztoky:

Roztok jádra RNAP 6,9 μ M

Roztok σ^A podjednotky 54,7 μ M

Vlastní postup:

- Roztoky jádra RNAP a σ^A podjednotky byly v molárním poměru 1 : 6 smíchány a inkubovány 30 minut při 30 °C.
- Takto rekonstituované proteiny se uchovávají při -20 °C.
- Pro transkripční reakci *in vitro* se dále ředí uchovávacím pufrem v poměru 1 : 12 na požadovanou koncentraci 300 nM.

4.6 Transkripční experimenty

Transkripční experimenty *in vitro* byly prováděny s RNAP z *B. subtilis* rekonstituovanou z jádra RNAP a z σ^A podjednotky. Při reakci byl použit radioaktivně značený nukleosid trifosfát - UTP. Radioaktivně značen je jeho α -fosfát obsahující ^{32}P . ^{32}P je α -zářič s poločasem rozpadu 14,3 dne a silou emitovaných α -částic 1,71 MeV. Rozpad probíhá podle rovnice $^{32}\text{P} \rightarrow e^- + ^{32}\text{S}$. Záření vniklé rozpadem UTP zabudovaného do řetězce vnikající RNA se absorbuje pomocí absorpční folie. Množství produktu transkripční reakce bylo měřeno denzitometricky. Protože jsou vznikající transkripty vždy stejně velké, poměr jejich intenzit záření odpovídá poměru jejich množství a odpovídají tedy za daných podmínek rychlosti iniciace transkripce nebo množství RNAP schopné transkripce. Jelikož se pracuje se zdrojem ionizujícího záření, musí se používat příslušné ochranné pomůcky.

4.6.1 Určování K_{CTP} promotorového konstruktu

K_{CTP} je hodnota koncentrace iniciačního nukleotidu potřebná pro 50 % maximální rychlosti iniciace transkripce z daného promotoru. Hodnota K_{NTP} se používá jako srovnávací faktor mezi jednotlivými promotory. Transkripce se provádí při 10 různých koncentracích iniciačního nukleotid trifosfátu. Koncentrace ostatních reaktantů je konstantní. Množství produktu transkripční reakce přímo odpovídá rychlosti iniciace transkripce při dané koncentraci iNTP. Množství produktu se po elektroforéze měří denzitometricky.

Použité roztoky a materiály:

20x transkripční pufr

20 mM ATP, CTP, GTP

1 mM UTP

$[\alpha - ^{32}\text{P}]$ 1 mM UTP (9,25 Mbq)

zásobní roztok plasmidu 200 ng/ μl

1 M KCl

BSA 10 mg/ml

zásobní roztok RNAP z *B. subtilis* (300 nM)

STOP roztok: 95 % formamid, 20 mM EDTA pH 8,0, 0,05 % bromfenolová modř, 0,05 % xylene cyanol

5,5 % roztok AA v 7 M močovíně a TBE pufru

10 % APS

TEMED

10 x TBE

Vlastní postup:

- Jelikož se při experimentu pracuje se zdrojem ionizujícího záření, musí se používat příslušné ochranné pomůcky (rukavice, brýle, plexisklové štíty) a pracovat na vyhrazeném místě (digestoř).
- Transkripční reakce byla prováděna při 20, 40, 100, 200, 400, 600, 1000, 1300, 1600, 2000 μM koncentrace CTP. Vychází se ze zásobního roztoku 20mM CTP, který se příslušně ředí.
- Následně byla připravena reakční směs obsahující všechny složky potřebné pro transkripci, kromě RNAP. Složení reakční směsi pro 1 reakci (v praxi se připravuje pro více reakcí najednou příslušným znásobením):

Objem (μl)	Složka směsi
0,1	20 mM ATP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	20 mM CTP (finální koncentrace 200 μM)
0,1	1 mM UTP (finální koncentrace 10 μM)
1	CTP příslušného ředění
0,1	$[\alpha - ^{32}]$ UTP
2	plasmid (finální množství 80 ng)
3,5	iH_2O
1,5	1 M KCl (finální koncentrace 150mM)
0,1	BSA 10 mg/ml

- Do připravených mikrozkušavek bylo napipetováno 1 μl CTP příslušného ředění a k němu 8 μl reakční směsi.
- Zkušavky byly preinkubovány 5 minut při 30 °C a reakce byla iniciována přidáním 1 μl RNAP (finální koncentrace 30 nM). Celkový objem reakce byl 10 μl .
- Transkripce probíhala 15 minut při 30 °C a byla ukončena se přidáním 10 μl STOP roztoku

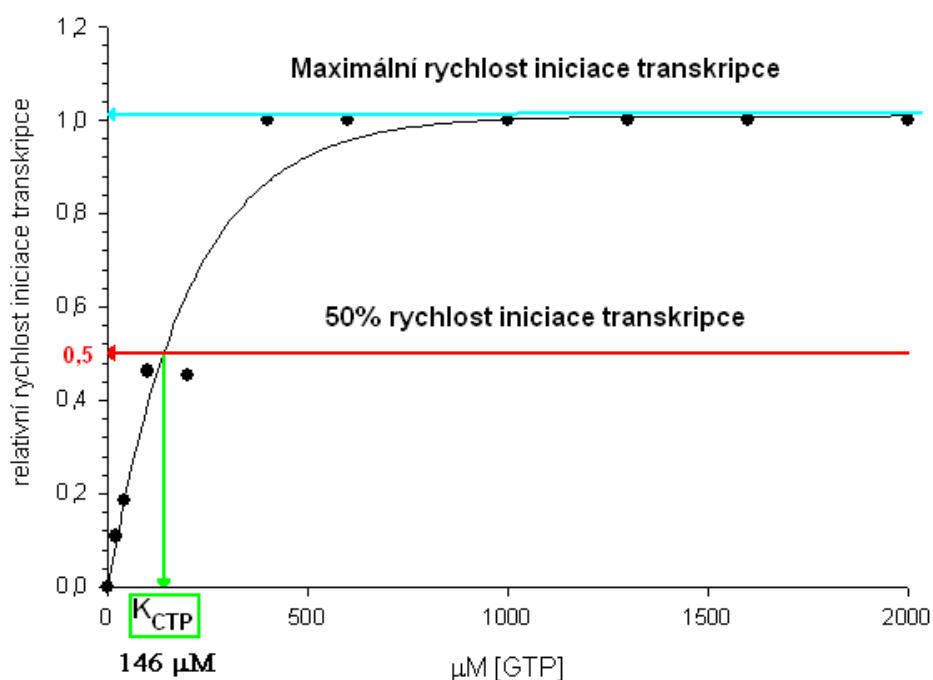
(obsahuje chelatony vychytávající Mg^{2+} ionty potřebné pro transkripci a formamid denaturující RNAP).

- Produkty transkripce byly separovány na 5,5-7 % polyakrylamidovém gelu v TBE pufru. Gel byl následně sušen a poté uzavřen do expoziční kazety, kde se na citlivou folii absorbuje záření vznikající z transkriptů.
- Primárním výsledkem byl obraz gelu se zřetelně ozářenými pásy odpovídající transkriptům. Intenzity jednotlivých pásů byly měřeny na přístroji Bio-Rad Molecular Imager FX a kvantifikovány pomocí softwaru Bio-Rad Quantity One. Množství transkriptu bylo určeno jako intenzita příslušného pásu zmenšená o intenzitu pozadí.
- Jednotlivé intenzity se vztahují vzhledem k hodnotě intenzity v plateau fázi. Plateau fáze je fáze, kdy se zvýšením koncentrace iCTP již nezvýší rychlost iniciace transkripce, tedy ani množství produktu transkripční reakce.

Výsledky byly matematicky zpracovány, vyneseny do grafu a z rovnice vynesené křivky byla určena hodnota K_{CTP} příslušná danému promotoru.

Prokládaná křivka má tvar $y = a(1 - e^{-b \cdot x})$

Pro K_{CTP} platí $K_{CTP} = \frac{-\ln(1-\frac{a}{b})}{0,5}$



Obrázek 19: Závislost rychlosti iniciace transkripce na [GTP] u promotoru PywaA +IG.

5 Cíl práce

V teoretické části byly popsány příklady mechanismů regulace genové exprese iNTP u různých genů a bakteriálních druhů. Experimentální část vychází ze získaných poznatků o regulaci genové exprese u *B. subtilis*. Jak je zřejmé ze srovnání promotorů u *E. coli* v 3.2.1 a u *B. subtilis* v 3.2.3, CTP a UTP jsou používány jako iNTP pouze velmi zřídka. RNAP při iniciaci preferuje ATP nebo GTP. Proč jsou ale při iniciaci transkripce upřednostňovány dvojice bazí A-T nebo G-C na kódujícím a komplementární vlákně DNA před zrcadlovými dvojicemi T-A a C-G, není známo.

Cílem tohoto projektu bylo vytvořit nástroj, pomocí kterého by bylo možné sledovat interakci aktivního místa RNAP s promotorem obsahující málo preferovaný iNTP (CTP). Mutacemi takového promotorového jádra by bylo následně možné porovnat vliv identity +1 pozice na aktivitu tohoto motoru.

Prvním krokem byla identifikace promotoru schopného iniciovat transkripci na +1C a vytvoření patřičného DNA konstruktů. CTP bylo zvoleno jako vhodné iniciační NTP, protože je velmi nesnadné „donutit“ RNAP iniciovat na mutovaném promotoru CTP, kde +1 pozice (původně A či G) byla změněna na CTP, pokud se v blízkém okolí nachází jiné A či G. Následnými transkripčními experimenty měla být zjištěna hodnota K_{CTP} (koncentrace CTP potřebná k dosažení 50 % maximální transkripce, viz níže) a její změny v závislosti na mutacích promotorového jádra, popřípadě hodnoty K_{NTP} při mutacích +1 pozice (na A, G, U).

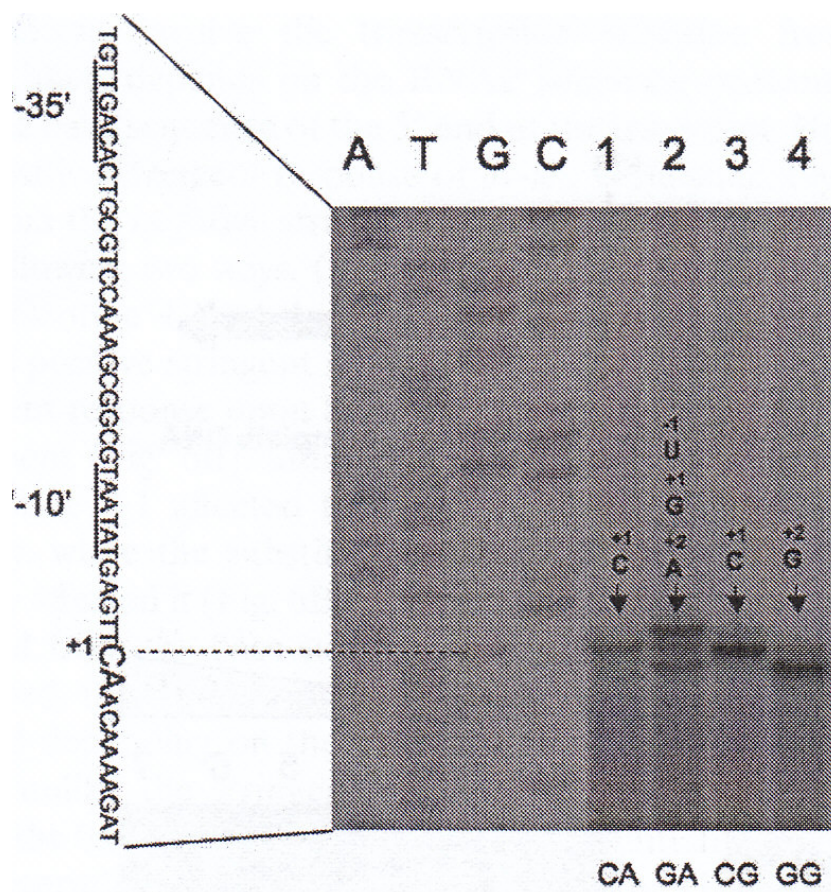
6 Výsledky

6.1 Experimentální strategie

6.1.1 Literární rešerše

Na začátku projektu bylo potřeba v genomu *B. subtilis* vybrat vhodné promotorové jádro senzitivní na iCTP. Z literatury jsou známy pouze tři případy, kdy je CTP uvedeno jako startovní pozice pro transkripci.

První z nich pochází ze studie operonu *ilv-leu* (viz 3.2.3). Tento operon iniciuje na dvou sousedních pozicích. Primer extension určila tyto dvě pozice jako C a A. V jiných studiích bylo ale uvedeno, že tento operon iniciuje na dvou po sobě jdoucích A. Určení jedné iniciační pozice jako C je s nejvyšší pravděpodobností chybná, nasvědčují tomu i experimenty *in vitro* [10].



Obrázek 20: Primer extension operonu *ilv-leu*, převzato z [10].

Vizuální kontrolou kompilace σ^A -dependentních promotorových elementů u *B. subtilis* z [6] byly zjištěny dva promotory, u kterých bylo CTP uvedeno jako iNTP.

První z těchto promotorů stojí před kódující sekvencí genu *ffh* [7], který se blíže nespecifikovaným způsobem podílí na řízení sekrece proteinů u *B. subtilis*.

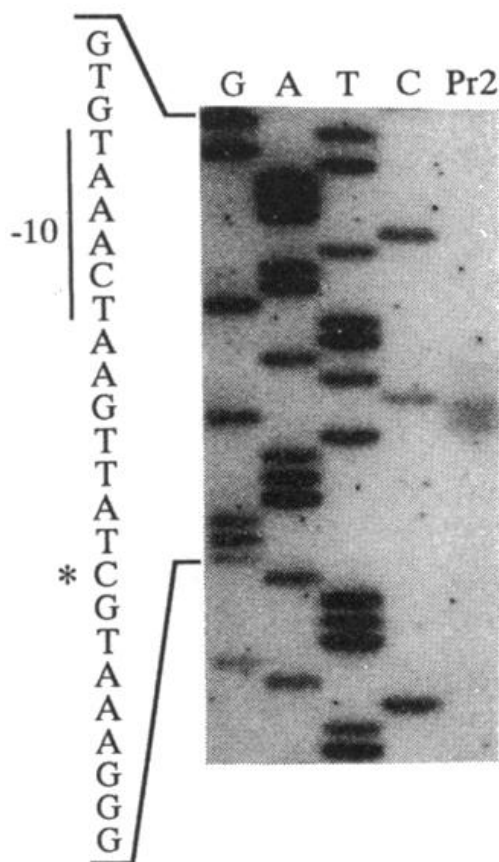
```

ATATTTAGCGTATTTTGGAAAAGTTAATCGCCGCTTTGACAAGATAAAAACTTGACAGTG
-35
TCATTAAAACCGTGTAAACTAAGTTATCGTAAAGGGATTGACTTAACAAAGGGGAGAGC
-10 SD
    
```

Obrázek 21: Sekvence genu *ffh*, podtržené sekvence představují konzervované hexamery v promotorovém jádře a SD sekvenci v kódující oblasti, šipka ukazuje start transkripce a její směr, převzato z [7].

Detailnější kontrola sekvence mRNA tohoto genu, která byla získána pomocí primer extension, přinesla pochyby, zda-li je nukleotid na +1 pozici opravdu určen správně. Špatná interpretace výsledků primer extension ohledně iNTP není v případě zmíněného článku relevantní, protože v tomto případě byl experiment proveden kvůli kontrole sounáležitosti dvou genů do jednoho operonu.

Obrázek 22: Primer extension transkriptu genu *ffh*, G, A, T a C jsou sekvenační dráhy pro jednotlivé nukleotidy, Pr2 je DNA vytvořená reverzní transkriptázou z mRNA genu *ffh*, hvězdička označuje odhadovaný start transkripce. Podle srovnání rychlosti putování lze určit délku primer extension fragmentu a srovnat ho s délkou fragmentů v sekvenačních dráhách, čímž lze určit identitu jeho prvního nukleotidu na 5' konci. V tomto případě je však výsledek sporný, Pr2 nedosahuje zcela pozice CTP uváděného jako +1 pozice. Protože primer extension se odehrává v jiném iontovém prostředí než sekvenace, mají fragmenty vzniklé při této proceduře tendenci putovat na gelu spíše pomaleji, než by odpovídalo jejich délce. Kvůli tomu lze usoudit, že +1 pozicí tohoto promotoru není C, ale G, převzato z [7].



Druhý promotor stojí před genem *hsmB1* [14], který kóduje enzym BsuBI. Tento restriktivně/modifikační enzym rozeznává sekvenci 5' CTGCAG 3' a pro autory článku byl zajímavý zejména proto, že tato sekvence je stejná jako sekvence rozeznávaná enzymem PstI u G- bakterie *Providencia stuartii*.

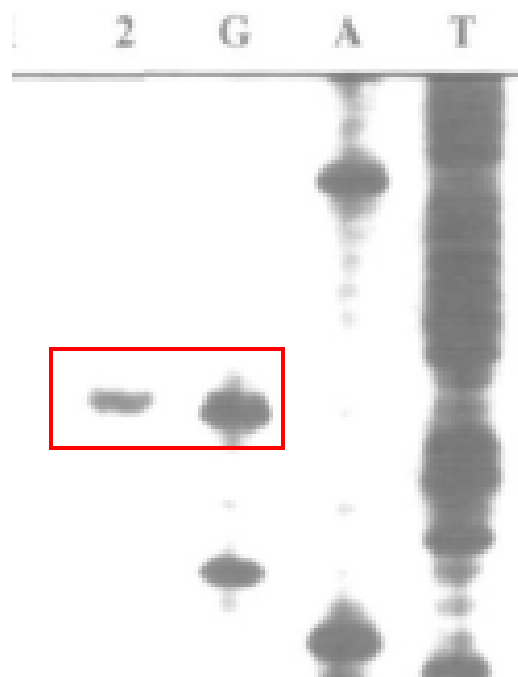
```

ATTGTGATAAACCCTGCTGAAAAGTACCAACAGGGTTTACTGTGTTAATCATTACAAAA
                                     -35
ATGATAAAAAAAAAAGCAACGACGTATCAATATTAAGCAGTGCTACCATGACTCAAATTC
      -10                                     ← 5'0

```

Obrázek 23: Sekvence genu *hsmB1*, podtržené sekvence představují konzervované hexamery v promotorovém jádře a SD sekvenci v kódující oblasti, šipka ukazuje start transkripce a její směr, převzato z [14].

Protože tento enzym byl izolován z jiného kmene *B. subtilis* než je běžně používán jako modelový organismus, bylo potřeba sekvenci promotorového jádra získat jinak, než izolací z živých buněk. Žádat autory článku o zaslání příslušného kmene by mělo nejisté výsledky, proto bylo potřeba nechat si příslušné primery syntetizovat.

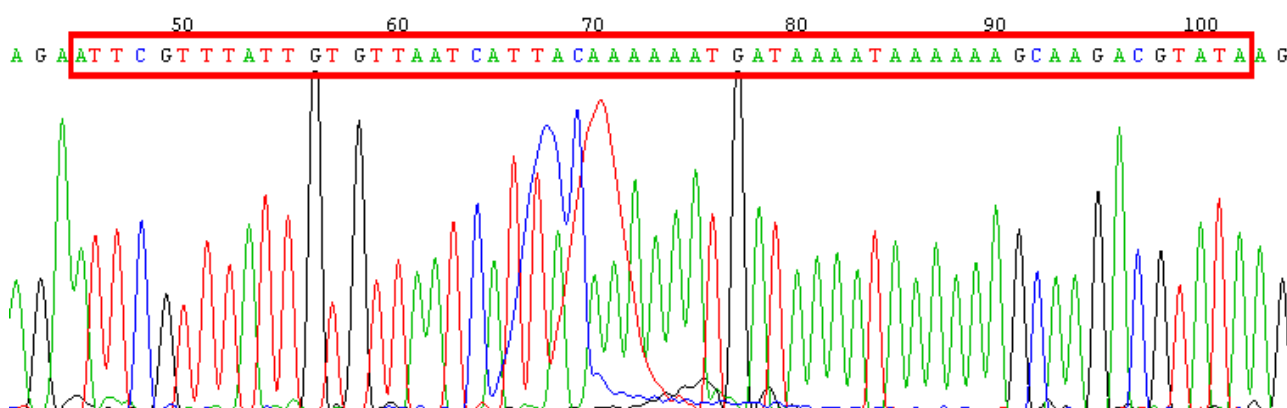


Obrázek 24: Primer extension genu *BsuBI*, G, A, T a C jsou sekvenční dráhy komplementární pro jednotlivé nukleotidy (tj. G=C, A=T), 2 - RNA izolovaná z *B. subtilis* ISB8 (*hsrBI*⁺, *hsmB1*⁺). Červený rámeček ukazuje stejnou velikost RNA fragmentu s fragmentem v sekvenční dráze, převzato z [14].

6.2 Klonování

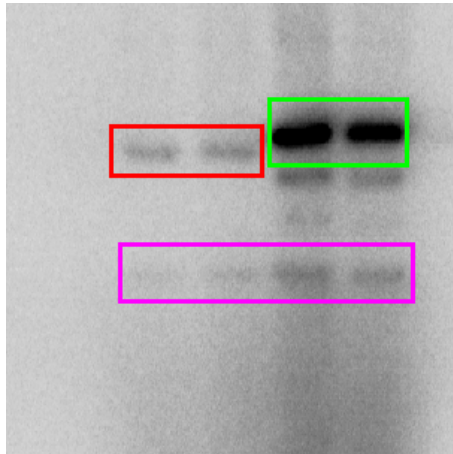
Poté, co byly objednané jednovláknové primery k dispozici, byl proveden annealing obou vláken (viz 4.4.2.1). Tento insert byl následně pomocí enzymu ligázy vložen do plazmidu pRLG770 (viz 4.4.2.2). Plazmid pRLG770 byl izolován z DH α kmene *E. coli* (viz 4.4.1.2) a jeho restriční analýzou na agarózovém gelu byl vyštěpen úsek mezi sekvencemi rozeznávanými enzymy *HindIII* a *EcoRI* (viz 4.4.1.5). Takto vzniklá lineární DNA opatřená „lepivými konci“ byla izolována z gelu (viz 4.4.1.7). Poté byl mezi konce lineárního plazmidu vložen konstrukt z vybraného promotorového jádra. Následně byl plazmid přidán do kultury *E. coli* a po termošoku proběhla selekce bakteriálních buněk, které plazmid přijaly. U plazmidu izolovaného z těchto buněk byla sekvenací ověřena přítomnost promotorového jádra.

Kmen s plazmidem obsahující sekvenci promotorového jádra enzymu BsuBI byl zařazen do strain booku pod označením #618 a pro další použití byla vytvořena glycerolová konzerva.

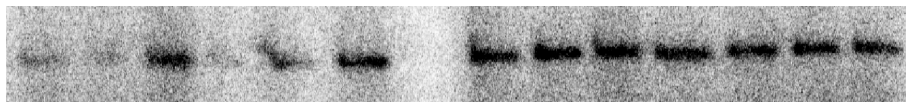
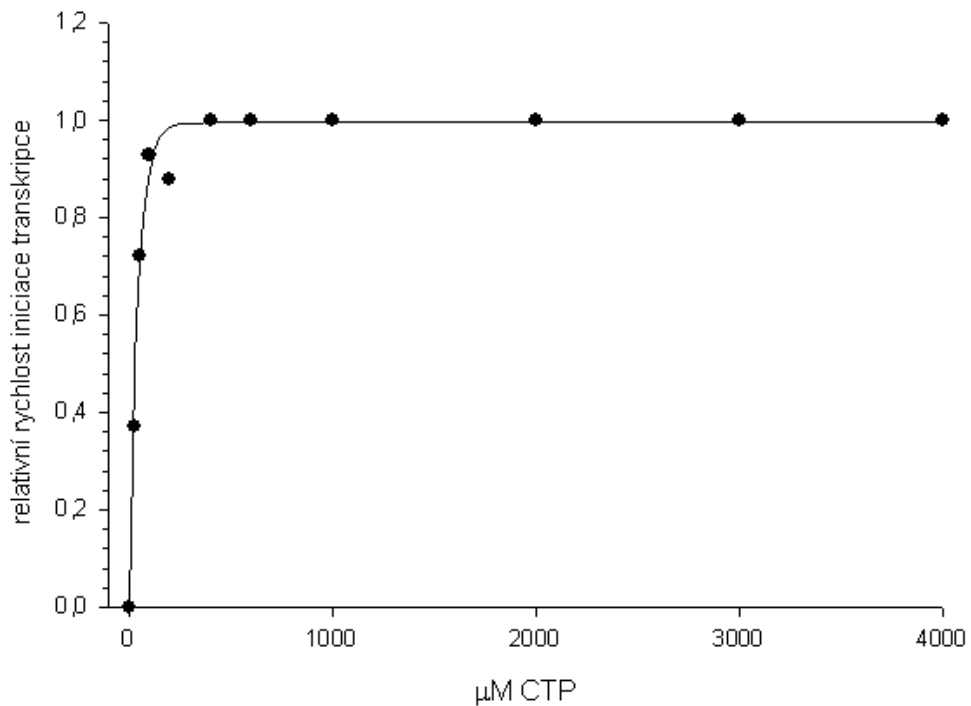


Obrázek 25: Ověření správného vložení promotorového jádra kapilárním sekvenátorem. Insert je označený červeným rámečkem.

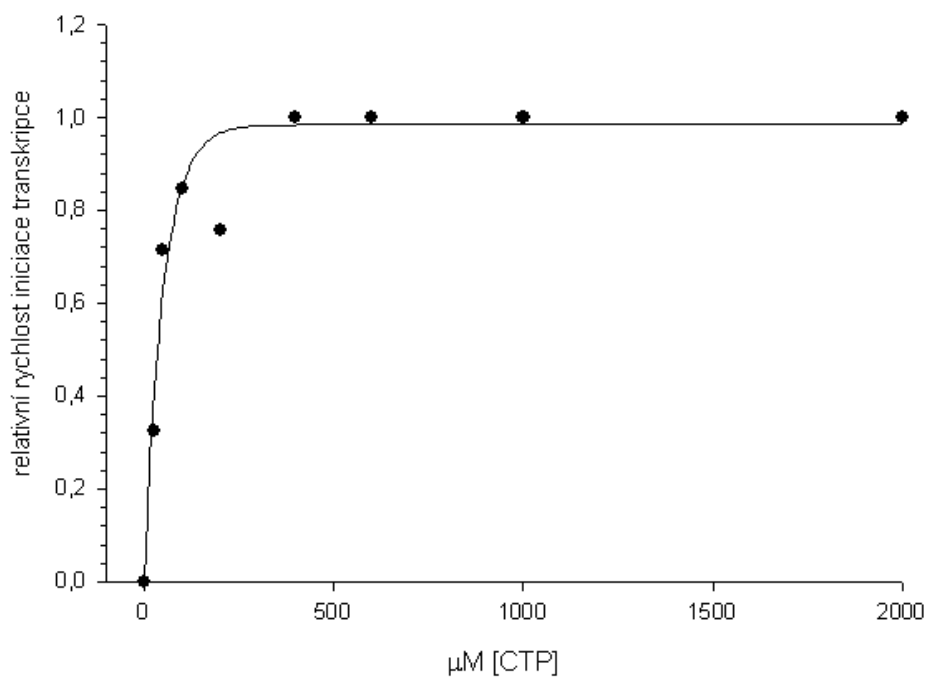
6.3 Ověření transkripční aktivity a určení hodnoty K_{CTP}



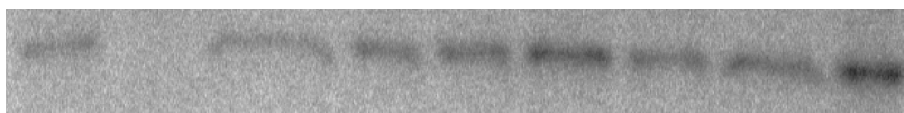
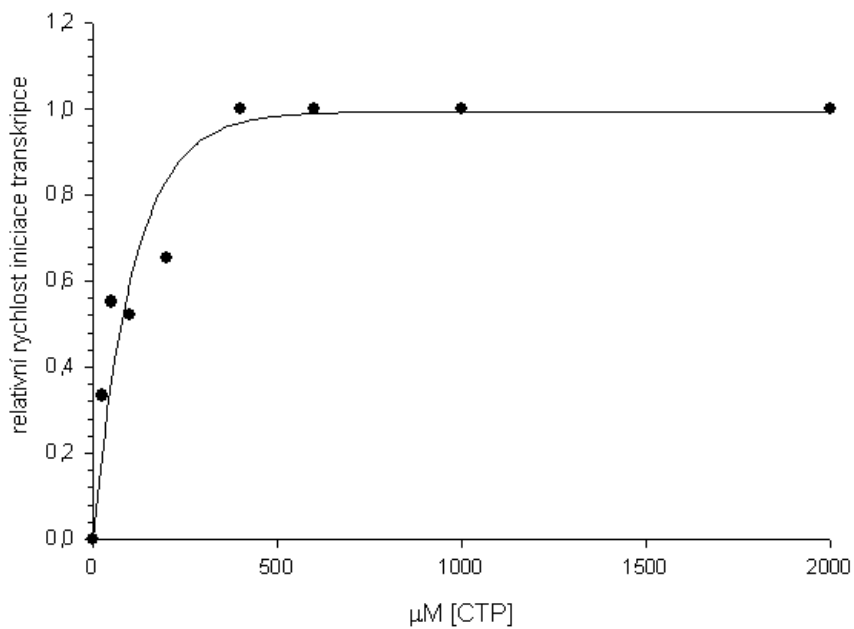
Obrázek 26: Ověření transkripční aktivity promotorového konstrukt. V červeném rámečku vlastní konstrukt, v zeleném marker, ve fialovém RNA1.



Obrázek 27: CTP titrace 1, $K_{CTP} = 31 \mu\text{M}$



Obrázek 28: CTP titrace 2, $K_{CTP} = 33 \mu\text{M}$



Obrázek 29: CTP titrace 3, $K_{CTP} = 44 \mu\text{M}$

7 Diskuze

Známe jen velmi málo promotorů, které u *B. subtilis* iniciují na +1 pozici molekulou CTP. Z prozkoumané literatury jsem uvedl tři takové promotory. U dvou z nich se jedná pravděpodobně o chybný závěr a tyto promotory iniciují na jiném nukleotidu. Třetí z uvedených promotorů byl zvolen jako vhodný nástroj pro experimenty *in vitro*.

Promotorový konstrukt byl vložen do plasmidu a jeho přítomnost byla potvrzena sekvenací. Předběžné výsledky ze tří uvedených *in vitro* transkripcí ukazují, že hodnota K_{CTP} je u tohoto promotoru poměrně nízká, ačkoliv původní předpoklad byl opačný. Průměrné K_{CTP} bylo u *PhsmB1* 37 μM . Hodnota K_{NTP} koreluje s regulací promotoru v buňce. Aby promotor reagoval změnou svojí aktivity na změnu NTP v buňce, musí být jeho hodnota K_{NTP} obvykle 100 μM a vyšší. Tyto výsledky poukazují na možnost, že promotor *PhsmB1* tvoří s RNAP stabilní RP_O a není tedy regulován koncentrací CTP. Promotory tvořící stabilní RP_O jsou u *B. subtilis* velmi vzácné a známe jich pouze několik.

Předběžné výsledky ovšem nebylo možné potvrdit. Kvůli neznámé technické chybě se při dalších experimentech jevila hodnota K_{CTP} naopak vysoká. Bude tedy nutné experimenty zopakovat, aby bylo možné výsledky ověřit.

8 Závěr

Úspěšně byl navrhnout a vytvořen požadovaný promotorový konstrukt a jeho přítomnost na plasmidu byla potvrzena sekvenací. Poté byly provedeny pilotní experimenty pro zjištění hodnoty K_{CTP} . Výsledky těchto experimentů naznačují, že hodnota K_{CTP} je u *PhsmB1* nízká a tento promotor není regulován [CTP]. Práce na tomto projektu bude probíhat i nadále, protože výsledky je potřeba potvrdit.

Tato práce patří do základního výzkumu, ale důležitost výzkumu bakterií je zřejmá. Uvnitř našeho těla i na jeho povrchu žijí stovky druhů prokaryotních organismů. Odhaduje se, že jen ve střevech máme jeden kilogram bakterií a na počet je bakteriálních buněk v našem těle desetkrát více než našich vlastních. Některé bakterie nám slouží, jiné škodí a dalších si ani nevšimneme. Nicméně bakteriální infekce jsou stálou hrozbou a vedeme s nimi válku, kterou nemůžeme nikdy úplně vyhrát. Bakterie se velmi rychle množí a dokážou během krátké doby zaplnit veškerý dostupný prostor. Rapidně reagují na změny prostředí a díky horizontálnímu přenosu genů se rychle objevují nové kmeny, rezistentní na antibiotika. Jediným způsobem jak nepodlehout bakteriím je udržovat si trvalý náskok a vyvíjet nová antibiotika rychleji, než jsou bakterie schopné reagovat. A k tomu je potřeba tyto organismy studovat a pochopit co nejlépe mechanismy, na kterých fungují. Laboratoř, ve které jsem pracoval, spolupracuje s FN Motol na vývoji antibiotik na principu inhibitorů aktivního místa RNAP. Pro správné fungování takových antibiotik musíme co nejlépe pochopit, jak aktivní místo RNAP funguje, včetně toho, proč při iniciaci transkripce preferuje na +1 pozici pořadí purin⁵-pyrimidin⁶.

Fungující antibiotika jsou ale poměrně vzdálený cíl a tento projekt má na něj relativně malý bezprostřední vliv. Přímé využití výsledků této práce by se dalo sledovat u výzkumu vlivu sekvence promotoru na stabilitu RP_O RNAP. Na takovém výzkumu v současné době pracuje např. Mgr. Luděk Sojka z AV ČR. Stejná data by se dala také použít v *in silico* modelech iniciace transkripce, které probíhají na MFF UK pod vedením Ivana Barvíka.

Závěrem této práce bych chtěl poděkovat Liboru Krásnému za možnost pracovat v jeho laboratoři na MBÚ a zároveň Alžbětě Švenkové a Luďku Sojkovi za tolik potřebnou pomoc při laborování.

⁵ na kódujícím vlákně

⁶ na komplementárním vlákně

9 Seznam literatury

- [1] ALBERTS, B.: et al.: *Molecular biology of the cell*. 4th edition. Garland: [s.n.] [online]. 2002. 1616 s. [cit. 2009-03-03] Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4>. ISBN 0-8153-3218-1.
- [2] BROWN, T. A.: *Klonování genů a analýza DNA: Úvod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 408 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [3] DVOŘÁČEK, L.: *Srovnání RNA polymeras gram pozitivních a gram negativních bakterií*. Praha, 2008. 40 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Libor Krásný Ph.D. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
- [4] KRÁSNÝ, L.: *Změň rychlost růstu a nebo zahyň: regulace produkce rRNA u prokaryot*. In Molekulární biologie a genetika IX. Praha : Akademie věd České republiky, 2004. s. 163-174.
- [5] KRÁSNÝ, L. a kol.: *The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology. 2008, vol. 69, no. 1, s. 42-54.
- [6] HELMANN, J. D.: *Compilation and analysis of Bacillus subtilis σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA*. Nucleic Acids Research. 1995, vol. 23, no. 13, s. 2351-2360.
- [7] HONDA, K., NAKAMURA, K., NISHIGUCHI, M., YAMANE, K.: *Cloning and Characterization of a Bacillus subtilis Gene Encoding a Homolog of the 54-Kilodalton Subunit of Mammalian Signal Recognition Particle and Escherichia coli Ffh*. The Journal of Bacteriology. 1993, vol. 175, no. 15, s. 4885-4894.
- [8] KOUBA, J.: *Vliv DNA elementů na aktivitu a regulaci rRNA promotorů u Bacillus subtilis*. Praha, 2008. 87 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Libor Krásný Ph.D. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

- [9] LIU, J., TURNBOUGH, C. L.: *Effects of transcriptional start site sequence and position on nucleotide-sensitive selection of alternative start sites at the pyrC promoter in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1994, Volume 176, no. 10, s. 2938-2945.
- [10] TOJO, S., SATOMURA, T., KUNAMATO, K., HIROOKA, K.: *Molecular Mechanisms underlying the positive stringent response of the Bacillus subtilis ilv-leu operon, involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids*. Journal of Bacteriology. 2008, vol. 190, no. 18, s. 6134-6147.
- [11] TURNBOUGH, C. L., SCHWITZER, R. L.: *Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008, vol. 72, no. 2, s. 266-300.
- [12] VONDREJS, V., STORCHOVÁ, Z.: *Genové inženýrství I*. Praha : Karolinum, 1997. 58 s.
- [13] WALKER, K. A., MALLIK, P., PRATT, T. S.: *The Escherichia coli fis Promoter Is Regulated by Changes in the Levels of Its Transcription Initiation Nucleotide CTP*. The Journal of Biological Chemistry. 2004, vol. 279, no. 49, s. 50818-50828.
- [14] XU, G., KAPFER, W., WALTER, J., TRAUTNER, T. A.: *BsuBI—an isospecific restriction and modification system of PstI. characterization of the BsuBI genes and enzymes*. Nucleic Acids Research. 1992, vol. 20, no. 24, s. 6517-6523.
- [15] Wikipedia, The Free Encyclopedia: *RNA polymerase* [online]. c2009 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_polymerase>
- [16] Wikipedia, The Free Encyclopedia: *Shine-Dalgarno sequence* [online]. c2009 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Shine_Dalgarno>
- [17] Wikipedia, The Free Encyclopedia: *Promoter* [online]. c2009 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Promoter>>
- [18] Wikipedia, The Free Encyclopedia: *Pribnow box* [online]. c2009 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pribnow_box>
- [19] Wikipedia, The Free Encyclopedia: *TATA box* [online]. c2009 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/TATA_box>

- [20] *Termination Signal For Transcription In Prokaryotes* [online]. 2008 [cit. 2009-03-03].
Dostupný z WWW:
<<http://www.biog1105-1106.org/demos/106/unit02/3d.prokterminationsignal.html>>.