

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kristýna Hladíková

**DNA topologie jako faktor ovlivňující transkripci u bakterií**  
**DNA topology as a factor affecting transcription in bacteria**

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2024

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Liboru Krásnému Ph.D. za trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala celému týmu Laboratoře mikrobiální genetiky a genové exprese za vytvoření přívětivého prostředí a neustálou podporu.

## **Prohlášení**

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

V Praze, dne 29. 4. 2024

Podpis:

## Abstrakt

Topologie DNA hraje klíčovou roli v regulaci genové exprese tak, že ovlivňuje interakce mezi DNA a RNA polymerázou, a rovněž i dalšími regulačními proteiny. V této práci se věnuji procesu transkripce a vybraným mechanismům její regulace se zaměřením na vliv topologie DNA. Klíčovou charakteristikou topologie DNA je úroveň jejího nadšroubovicového vinutí. Popisuji, jaký vliv má nadšroubovice DNA na iniciaci transkripce, a jak jí ovlivňují topoizomerázy a proteiny asociující s nukleoidem. Dále se zabývám vybranými příklady regulace genové exprese pomocí topologie. Závěrem pak diskutuji alternativní faktor  $\sigma^N$  bakterie *Bacillus subtilis*, který vykazuje vyšší efektivitu iniciace transkripce na lineárních (tj. relaxovaných) templátech DNA, oproti templátům s negativní nadšroubovicí. Touto charakteristikou se  $\sigma^N$  diametrálně liší od ostatních faktorů  $\sigma$ .

**Klíčová slova:** DNA, topologie, RNA polymeráza, transkripce, promotor, faktor sigma

## Abstract

DNA topology plays a key role in regulation of gene expression by affecting interactions between DNA and RNA polymerase and other regulatory proteins. In this work, I review the process of transcription and selected mechanisms of its regulation, focusing on the effects of DNA topology. A key characteristic of DNA topology is the level of supercoiling. I describe how the DNA supercoiling influences initiation of transcription, and how it is affected by topoisomerases and nucleoid-associated proteins. I then discuss selected examples of regulation of gene expression by topology. Finally, I discuss the alternative  $\sigma^N$  factor from *Bacillus subtilis*, which allows more efficient transcription initiation from linear (*i.e.* relaxed) rather than supercoiled DNA templates. In this property,  $\sigma^N$  diametrically differs from other  $\sigma$  factors.

**Key words:** DNA, topology, RNA polymerase, transcription, promoter, sigma factor

## Seznam zkratek

ATP	<i>adenosin triphosphate</i>	adenosin trifosfát
<i>B. burgdorferi</i>		<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>B. subtilis</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
CT	<i>cholera toxin</i>	cholera toxin
CTP	<i>cytidine triphosphate</i>	cytidin trifosfát
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	kyselina deoxyribonukleová
Dps	<i>DNA-binding protein from starved cells</i>	DNA vazebný protein z hladových buněk
<i>E. coli</i>		<i>Escherichia coli</i>
FIS	<i>factor for inversion stimulation</i>	faktor pro inverzní stimulaci
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>	guanosin trifosfát
H-NS	<i>histone-like nucleoid structuring protein</i>	protein strukturující nukleoid
IHF	<i>integration host factor</i>	integrační hostitelský faktor
iNTP	<i>initiating nucleoside triphosphate</i>	iniciační nukleosidtrifosfát
Lk	<i>linking number</i>	celkový počet vinutí
LLPS	<i>liquid-liquid phase separation</i>	fázová separace
NAP	<i>nucleoid associated proteins</i>	proteiny asociující s nukleoidem
NTP	<i>nucleoside triphosphate</i>	nukleosidtrifosfát
ORF	<i>open reading frame</i>	otevřený čtecí rámeček
(p)ppGpp	<i>guanosine tetra- and pentaphosphate</i>	guanosin tetra- a pentafofát
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	kyselina ribonukleová
RNAP	<i>DNA dependent RNA polymerase</i>	RNA polymeráza závislá na DNA
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>	ribozomální RNA
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>	jednovláknová DNA
TCP	<i>toxin-coregulated pilus</i>	pilus regulovaný toxinem
TCDS	<i>transcription-coupled DNA supercoiling</i>	transkripční vinutí DNA
Tw	<i>twist</i>	dvoušroubovicové číslo
UCP	<i>uridine-5'-triphosphate</i>	uridintrifosfát
Wr	<i>writhe</i>	nadšroubovicové číslo

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Transkripce .....	3
2.1. RNA polymeráza .....	3
2.2. Faktory $\sigma$ .....	4
2.3. Promotor v DNA .....	5
2.4. Iniciace transkripce .....	6
2.5. Elongace transkripce .....	7
2.6. Terminace transkripce .....	8
3. Regulace transkripce .....	9
3.1. Faktory anti- $\sigma$ .....	9
3.2. Malé molekuly .....	9
3.3. Transkripční faktory .....	11
4. Topologie DNA .....	12
4.1. Nadšroubovicové vinutí .....	13
4.2. Topoizomerázy .....	13
4.3. Proteiny asociované s nukleoidem .....	15
4.3.1. Faktor FIS .....	15
4.3.2. Faktor H-NS .....	16
4.3.3. Faktor IHF .....	17
5. Regulace transkripce pomocí topologie DNA .....	19
6. Závěr .....	24
7. Použitá literatura .....	25

# 1. Úvod

Bakterie jsou všudypřítomné, podařilo se jim osídlit všechny habitaty na světě od půdy po termální prameny a dna oceánů. Představují základní složky nejen většiny ekosystémů, ale hrají důležitou roli i v lidském zdraví a průmyslu. Informace nezbytné pro vývoj a funkci všech živých organismů jsou zakódovány v molekule deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Přepis genetické informace z DNA probíhá procesem genové exprese.

Regulace exprese genů představuje stěžejní biologický proces, jehož studium poskytuje výchozí bod pro výzkum a pochopení bakteriální evoluce, adaptace nebo virulence. Patogenní bakterie využívají sofistikované strategie regulace genové exprese, aby mohly kolonizovat hostitelské prostředí, vyhýbat se imunitní odpovědi či ji modifikovat. Rozluštění těchto složitých regulačních mechanismů má zásadní význam pro vývoj nových léčiv a boj s infekčními chorobami.

Prvním a klíčovým krokem genové exprese je přepis informace z DNA do molekuly ribonukleové kyseliny (RNA). Molekula DNA však není jen statickým úložištěm genetické informace, ale také dynamickou molekulou, která podléhá četným strukturním změnám, jež zásadně ovlivňují její dostupnost, stabilitu a funkci v buněčném prostředí. Topologie DNA je zásadní při utváření vyšší struktury genomu a ovlivňuje procesy, jako je skládání chromatinu a prostorové uspořádání genetických elementů. Topologie DNA hraje klíčovou roli v regulaci genové exprese tím, že moduluje přístupnost/afinitu DNA pro RNA polymerázu a regulační proteiny. Pochopení mechanismů, kterými topologie DNA řídí expresi genů je zásadní nejen pro základní pochopení fungování tohoto procesu, ale může poskytnout informace pro vývoj nových antibiotik či využití v biotechnologiích, včetně výroby biopaliv, léčiv a průmyslových enzymů.

Ve své budoucí diplomové práci se budu experimentálně zabývat vlivem faktoru  $\sigma^N$  na bakteriální transkripci. Tento faktor  $\sigma$  z bakterie *Bacillus subtilis* vykazuje vyšší efektivitu iniciace transkripce na lineárních (tj. relaxovaných) templátech DNA, oproti templátům s negativní nadšroubovicí. Tímto se diametrálně liší od ostatních faktorů  $\sigma$  v *B. subtilis*, kde je efektivita iniciace transkripce vyšší na templátech s negativní nadšroubovicí (Sudzinová *et al.*, 2021). Výše zmiňovaná diplomová práce bude mít za cíl rozluštit molekulární podstatu tohoto chování.

Tato bakalářská práce tedy mapuje literaturu v oblasti regulace transkripce topologií DNA a poskytuje teoretický základ pro již probíhající experimentální práci. Nejprve jsou zde popsány základní principy bakteriální transkripce a stěžejní transkripční enzym DNA-dependentní RNA polymeráza (RNAP) spolu s faktory  $\sigma$ . Dále jsou vysvětleny vybrané mechanismy regulace transkripce s důrazem na jejich interakci s topologií DNA. V závěrečné části jsou pak popsány současné znalosti o transkripci na relaxovaných a nadšroubovicových templátech v závislosti na různých faktorech  $\sigma$ . Informace v této práci se zaměřují

převážně na modelovou bakterii *Escherichia coli*, případně *Bacillus subtilis*. Výjimky jsou specifikovány v textu.

## 2. Transkripce

Transkripce DNA je klíčový biologický proces, při kterém je podle molekuly DNA syntetizována molekula RNA, která je nezbytná pro následující produkci proteinů nebo může mít roli regulační, strukturní či katalytickou (shrnuto v Buskila *et al.*, 2014). Transkripce u bakterií hraje klíčovou roli v jejich růstu, přežití a schopnosti se přizpůsobit podmínkám v prostředí. V tomto procesu sehraje klíčovou roli RNAP a s ní asociující faktory  $\sigma$  (shrnuto v Paget, 2015).

### 2.1. RNA polymeráza

DNA-dependentní RNA polymeráza (RNAP) je zásadní pro přežití, růst a adaptaci buňky. Struktura, sekvence i funkce katalytického jádra RNAP jsou evolučně konzervované od bakterií po eukaryota (shrnuto v Ebright, 2000).

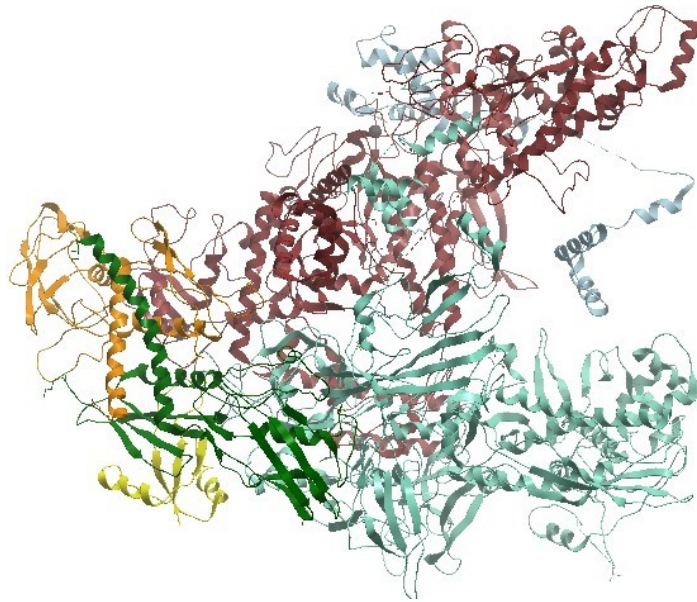
Jádro bakteriální RNAP se skládá z 5 podjednotek: dimeru  $\alpha$  a podjednotek  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\omega$ . Dvě podjednotky  $\alpha$  vytváří homodimer a jsou kódovány genem *rpoA*. Podjednotka  $\alpha$  obsahuje C-terminální doménu, která se u většiny promotorů váže na oblast před promotorem proti směru transkripce (tzv. UP element) a interaguje s mnoha transkripčními faktory. Hraje tedy klíčovou roli v regulaci transkripce. Neméně důležitá je i její role při sestavování podjednotek tím, že spojuje dohromady podjednotky  $\beta$  a  $\beta'$  (shrnuto v Ishihama, 1992).

Podjednotky  $\beta$  a  $\beta'$  vytvářejí strukturu enzymu, která připomíná krabí klepeta (**Obr. 1**). Tyto podjednotky vzájemně interagují a spolupracují na vytváření katalytického centra enzymu (Zhang *et al.*, 1999). Podjednotka  $\beta$  je kódována genem *rpoB* a podjednotka  $\beta'$  genem *rpoC*. Na podjednotku  $\beta'$  se váže podjednotka  $\omega$  kódovaná genem *rpoZ*. Delece tohoto genu nesnižuje životaschopnost bakterií *E. coli* v laboratorních podmínkách (Gentry *et al.*, 1991), nicméně způsobí zpomalení růstu oproti kmenu divokého typu (Mukherjee and Chatterji, 1997). Podjednotka  $\omega$  interaguje se specifickými oblastmi podjednotky  $\beta'$  a její C-terminální částí, což přispívá ke snížení konformační entropie. Tím podjednotka  $\omega$  podporuje sestavení RNAP a zvyšuje její stabilitu (Minakhin *et al.*, 2001).

RNAP řady grampozitivních bakterií (jako je např. modelová bakterie *B. subtilis*) obsahuje neesenciální podjednotku  $\delta$ , která je kódována genem *rpoE*. Tato podjednotka zvyšuje efektivitu a specifitu syntézy RNA pomocí zvýšené recyklace RNAP a větší selektivitě vůči promotoru (Juang, Helmann, 1994a). Přestože tato podjednotka není esenciální sama o sobě, její absence je pro buňku fatální, pokud soutěží s kmenem divokého typu (Rabatinová *et al.*, 2013). RNAP těchto bakterií obsahuje také neesenciální podjednotku  $\epsilon$ , kódovanou genem *rpoY*, jejíž funkce nebyla dosud objasněna (Keller *et al.*, 2014).



V RNAP se nachází tři důležité kanály. Primární kanál nebo také DNA kanál váže templátové vlákno DNA, zatímco sekundárním kanálem vstupují nukleosid trifosfáty (NTP) do aktivního místa. Nově syntetizovaná RNA opouští RNAP v místě zvaném výstupní kanál (*exit channel*) (Zhang *et al.*, 1999). Aktivní centrum RNAP se nachází na bázi primárního kanálu a obsahuje iont  $Mg^{2+}$ . Iont  $Mg^{2+}$  je chelátován aspartáty v konzervované sekvenci -NADFDGD- v podjednotce  $\beta'$ . Tento motiv je zodpovědný za koordinaci kovového iontu a je nezbytný pro katalytickou aktivitu enzymu, která je zprostředkována právě iontem  $Mg^{2+}$  (Zaychikov *et al.*, 1996).



**Obrázek 1.** Jádro RNAP *B. subtilis*

Podjednotky jsou barevně vyznačeny: dimer  $\alpha$  oranžovou a zelenou barvou, podjednotka  $\beta$  je vyznačena tyrkysovou, podjednotka  $\beta'$  červenou, podjednotka  $\omega$  žlutou a podjednotka  $\delta$  je vyznačena modře. Upraveno z PDB: 6ZCA.

## 2.2. Faktory $\sigma$

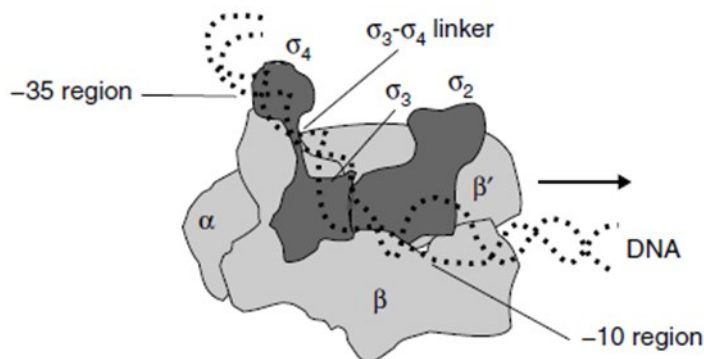
RNAP je schopna se nespecificky vázat na DNA a iniciovat syntézu RNA z konců DNA (shrnutí v Saecker *et al.*, 2011). Nicméně ke specifické iniciaci transkripce dochází ze sekvencí zvaných promotory (viz 2.3). K iniciaci z promotorové DNA je nezbytný faktor  $\sigma$ , jenž reverzibilně asociuje s jádrem RNAP za vzniku holoenzymu (Burgess *et al.*, 1969).

Obvykle jsou faktory  $\sigma$  rozdělovány do dvou odlišných rodin na základě homologie se dvěma faktory identifikovanými v modelové bakterii *E. coli*. Těmito faktory jsou primární faktor  $\sigma^{70}$  a strukturně odlišný faktor  $\sigma^{54}$ . Faktor  $\sigma^{70}$  je nezbytný pro běžnou transkripci v exponenciálně rostoucích buňkách, zatímco funkce faktoru  $\sigma^{54}$  je regulace transkripce podle signálů z prostředí (shrnutí v Paget, 2015).

Faktory  $\sigma$  obecně rozpoznávají specifické promotorové elementy, které se nacházejí před iniciačním místem transkripce, faktory  $\sigma^{70}$  rozpoznávají pozice -10 a -35, zatímco faktory  $\sigma^{54}$  pozice -12 a -24. Tyto

elementy mají obvykle délku 5-6 párů bází (bp) (shrnutí v Paget, Helmann, 2003). Faktory  $\sigma$  dále interagují s aktivátory transkripce, podílejí se na otevírání promotorové DNA a ovlivňují rané fáze transkripce (shrnutí v Saecker *et al.*, 2011).

Většina faktorů  $\sigma$  patří do rodiny 70, která je na základě struktury a funkce rozdělena na čtyři hlavní skupiny. Ty se od sebe liší také (ne)přítomností 4 konzervovaných domén ( $\sigma_{1.1}$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$ ,  $\sigma_4$ ). Každá z domén  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$  a  $\sigma_4$  interaguje se specifickými promotorovými elementy a s RNAP (Obr. 2). Všechny skupiny mají domény  $\sigma_2$  a  $\sigma_4$ , jelikož obsahují hlavní vazebné elementy RNAP a promotoru (Campbell *et al.*, 2002). Skupina 1 se skládá z primárních faktorů a jako jediná obsahuje doménu  $\sigma_{1.1}$ . Skupiny 2 až 4 jsou tvořené alternativními faktory se specializovanými funkcemi. Tyto alternativní faktory  $\sigma$  jsou koordinovaně exprimovány a řídí geny zapojené do různých funkcí, včetně reakcí na stres, morfologického vývoje a příjmu železa (shrnutí v Paget, 2015). Do skupiny 4 patří také faktor  $\sigma^N$  bakterie *B. subtilis*, který byl poprvé identifikován po vystavení buněk antibiotiku mitomycin C. Mitomycin C způsobuje linearizaci DNA a aktivuje expresi  $\sigma^N$ , což vede ke smrti buněk zatím neznámým mechanismem (Myagmarjav *et al.*, 2016).



**Obrázek 2.** Model interakce holoenzymu RNAP s DNA.

Hlavní domény faktoru  $\sigma$  jsou vyznačeny tmavě šedou barvou, zatímco domény RNAP jsou vyznačeny světle šedou. Šipka označuje směr transkripce. Převzato z (Paget, Helmann, 2003).

### 2.3. Promotor v DNA

Promotorová sekvence se skládá z krátkého úseku DNA, který funguje jako regulační element kontrolující iniciaci transkripce. Promotor se od genu nachází proti směru transkripce (*upstream*) a je zodpovědný za interakci a správné nasměrování RNAP. Bakteriální promotory většinou bývají dlouhé okolo 40 bp a obsahují několik specifických promotorových elementů. Tyto elementy jsou vysoce konzervované a rozpoznávají je především faktory  $\sigma$ . Mezi nejvýznamnější elementy faktoru  $\sigma^A$  (resp.  $\sigma^{70}$ ) patří oblast -10 (TTTATA) a oblast -35 (TTGACA), dále rozšířená oblast -10 a UP element. Konsensus sekvence TTTATA a TTGACA platí pro faktor  $\sigma^A$  (shrnutí v Saecker *et al.*, 2011).

Nerovnoměrně silné interakce RNAP s promotorovou DNA je určena jejich rozdílnou sekvencí. Nejvyšší efektivitu mají promotory se sekvencemi blízké konsenzuálním sekvencím a s UP elementy. Rozdíly v promotorových sekvencích sice umožňují regulaci promotorové aktivity, ale tato regulace není flexibilní vzhledem k podmínkám prostředí. Proto hraje klíčovou roli v adaptivní regulaci modulace transkripčními faktory či malými molekulovými efekty (shrnutí v Browning and Busby, 2004).

## 2.4. Iniclace transkripce

Transkripce začíná rozpoznáním a navázáním holoenzymu RNAP do promotorové oblasti DNA pomocí faktoru  $\sigma$ . Faktor  $\sigma$  primárně interaguje s oblastí DNA na počátku transkripční bubliny (oblast -10). Tím dochází k přeorganizování struktury DNA a k jejímu navázání na hlavní část RNAP. Pokud se holoenzym takto na DNA nenaváže, nedojde ke správnému připojení na promotor a transkripce se nezačíná (Bae *et al.*, 2015). Pro iniciování transkripce je klíčová orientace karboxylové (C) a aminové (N) koncové domény faktoru  $\sigma$  v komplexu holoenzymu-DNA. V tomto komplexu je k DNA faktor  $\sigma$  orientován C-koncovou doménou proti směru transkripce a N-koncovou doménou po směru transkripce. (Murakami *et al.*, 2002).

Nejprve se tedy vytvoří počáteční uzavřený komplex ( $RP_c$ ), kde je DNA ve formě duplexu. Následuje proces isomerizace, kdy dochází k oddělení templátového a netemplátového vlákna prostřednictvím podjednotky  $\sigma$ . Pomocí konformačních změn je templátová DNA umístěna do aktivního centra enzymu tvořeného podjednotkami  $\beta$  a  $\beta'$ . Nejprve vzniká nestabilní otevřený komplex, který je nahrazen vysoce stabilním otevřeným komplexem ( $RP_o$ ) (shrnutí v Saecker *et al.*, 2011).  $RP_o$  je stabilizován pomocí faktoru  $\sigma$ , který rozplétá dvouvláknovou strukturu DNA promotoru v oblasti -10, a svou doménou  $\sigma_2$  se naváže na netemplátové vlákno DNA (Juang, Helmann, 1994b). Některé promotory přirozeně vytvářejí pouze nestabilní otevřené komplexy, což umožňuje jejich regulaci koncentrací iniciačních nukleosid trifosfátů (iNTP) nebo alarmonem ppGpp (Barker *et al.*, 2001; Barker and Gourse, 2001; Krásný *et al.*, 2008).

Mezi doménami  $\sigma_3$  a  $\sigma_4$  se nachází konzervovaný linker ( $\sigma_{3.2}$ ), který se vkládá do aktivního centra RNAP. Linker  $\sigma_{3.2}$  napodobuje molekulu RNA a pomáhá přeuspořádání jednovláknové DNA (*single-stranded DNA*, ssDNA) do helikální struktury. Zvyšuje afinitu vazby k iNTP, nicméně tento linker musí být odstraněn po syntéze prvních 4 NTP (Murakami *et al.*, 2002).

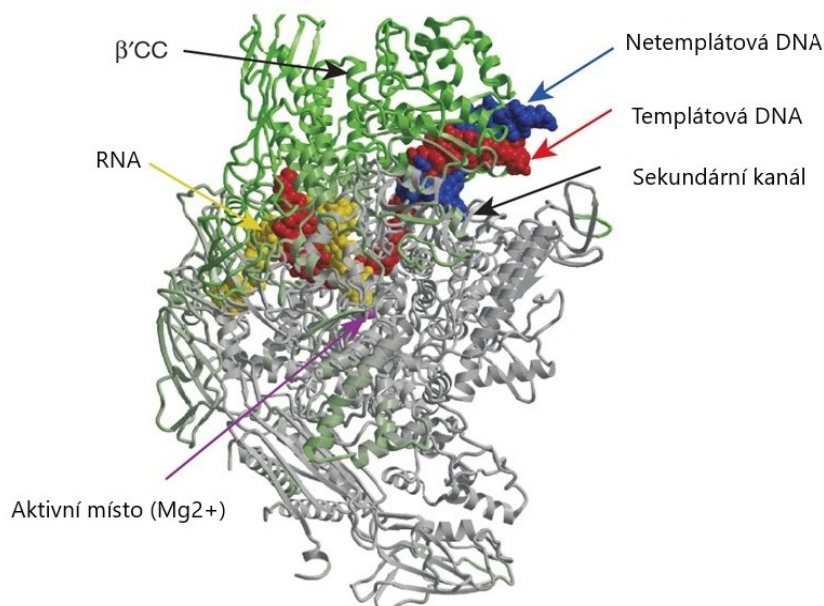
Před přechodem do elongační fáze může docházet k předčasné terminaci iniciační fáze procesem zvaným abortivní iniciace. Během tohoto procesu dochází k opakované syntéze krátkých RNA transkriptů (většinou dlouhých 2-15 nukleotidů). Abortivní iniciace může hrát roli v regulaci genové

exprese *in vivo* (Goldman *et al.*, 2009). Když je vznikající RNA transkript dlouhý 12-15 nukleotidů, faktor  $\sigma$  je obvykle uvolněn z komplexu a vzniká elongační komplex.

## 2.5. Elongace transkripce

Po uvolnění faktoru  $\sigma$  z komplexu dochází k výrazným konformačním změnám ve strukturních doménách, které v iniciačním komplexu interagovaly s faktorem  $\sigma$  a v elongačním komplexu interagují s nukleovými kyselinami. Zároveň dochází k zúžení primárního kanálu, což podporuje vysokou stabilitu a procesivitu elongačního komplexu (Vassilyev *et al.*, 2007).

V elongační fázi se RNAP pohybuje podél templátového vlákna DNA a syntetizuje RNA transkript (**Obr. 3**). Rychlost elongace se udává průměrně cca 90 nt/sec (Dennis *et al.*, 2009). Vznikající RNA interaguje s DNA za vzniku hybridu DNA:RNA. Netemplátové vlákno se postupně od templátového odděluje, na opačném konci dochází k jejich opětovnému spojování. Dochází tak k posunu transkripční bubliny. Translokace RNAP podél vlákna DNA je klíčovým aspektem elongace. Syntéza RNA nemůže pokračovat, pokud nedojde k přemístění (translokaci) 3' konce RNA a není uvolněno aktivní místo pro nově přichozí NTP. Proces translokace vyžaduje rozpletení jednoho páru DNA po směru transkripce, obnovení párování bází proti směru transkripce a zkrácení hybridu DNA:RNA (shrnuje Mustaeu *et al.*, 2017).



**Obrázek 3. Struktura elongačního komplexu**

RNAP tvoří elongační komplex spolu s molekulou DNA a nově vznikající molekulou RNA. Netemplátové vlákno DNA je označeno modrou barvou, templátové vlákno červenou barvou a vznikající RNA je označena žlutou barvou. Jádro RNAP je označeno šedě, přičemž podjednotky, které prodělaly největší konformační změnu po přechodu do elongační fáze, jsou označeny zelenou barvou. Upraveno z (Vassilyev *et al.*, 2007).

## 2.6. Terminace transkripce

Během procesu terminace dochází k sérii kroků, které vedou k disociaci RNAP a uvolnění nové RNA. U bakterií nacházíme několik různých terminačních mechanismů, mezi ty nejzásadnější patří terminace vnitřní (nezávislá na faktoru Rho) a terminace závislá na faktoru Rho.

Vnitřní terminace závisí na signálech přímo zakódovaných v DNA. Je charakteristická tvorbou terminační vlásenky a segmentu bohatého na U (tzv. *U-trakt*) o délce 7-8 nukleotidů, přičemž nejvíce konzervované jsou první tři U (Carafa *et al.*, 1990). Když RNAP přepisuje poslední nukleotidy, zastaví se na 3' konci, což umožní vytvoření terminační vlásenky bohaté na GC páry následované U-traktem. Díky tomu je elongační komplex RNAP ireverzibilně zachycen. Za fyziologických podmínek zachycený komplex rychle disociuje v důsledku přerušení všech stabilních kontaktů s RNA (Gusarov and Nudler, 1999).

Terminace závislá na faktoru Rho vyžaduje translokační aktivitu RNA-dependentního hexameru Rho. Tento mechanismus zahrnuje rozpoznání a vazbu na vznikající transkript RNA. Faktor Rho má nejvyšší afinitu k poly-C sekvencím (Lowery-Goldhammer and Richardson, 1974; Epshtein *et al.*, 2010). Tyto sekvence jsou známé jako místa využití Rho (tzv. *rut sites*) a bývají G-chudé, aby nedocházelo ke vzniku sekundárních struktur, které vazbu faktoru Rho inhibují (Allfano *et al.*, 1991). Po navázání se faktor Rho přemisťuje podél RNA a odvíjí duplex RNA-DNA ve směru 5' → 3'. S faktorem Rho interaguje další transkripční faktor zvaný NusG, který mění konformaci faktoru Rho a pomáhá RNA se protáhnout centrálním pórem Rho. Následující translokační aktivita využívá energii z hydrolýzy adenosin trifosfátu (ATP). K disociaci RNAP od transkriptu dochází poté, co faktor Rho přemístí přes pór veškerou RNA (shrnutí v Ray-Soni *et al.*, 2016; Molodtsov *et al.*, 2023).

U některých organismů se může faktor Rho, svojí přirozeně nestrukturovanou doménou, podílet na fázové separaci (*liquid-liquid phase separation*, LLPS) – fenoménu známého z Eukaryot ale dosud málo prozkoumaného u bakterií. LLPS pak napomáhá účinnosti terminace a životaschopnosti bakterie *Bacteroides thetaiotaomicron* v prostředí hostitele (Kryptou *et al.*, 2023).

### 3. Regulace transkripce

Regulace genové exprese na úrovni transkripce umožňuje bakteriím reagovat na podněty z prostředí. Tento regulační mechanismus umožňuje šetřit energii a je klíčový pro přežití a evoluci bakterií. Energeticky nejefektivnější je z hlediska genové exprese regulace na úrovni iniciace transkripce. Rozmístění RNAP v buňce je kontrolována několika rozdílnými mechanismy, mezi něž patří výše popsaná sekvence promotoru a faktory  $\sigma$ . V následující kapitole bude popsána regulace transkripce pomocí faktorů anti- $\sigma$ , malých molekul a vybraných proteinových faktorů.

#### 3.1. Faktory anti- $\sigma$

Faktory anti- $\sigma$  se váží na alternativní faktory  $\sigma$ , a tím inhibují jejich interakci s RNAP. Faktory anti- $\sigma$  jsou sestavené z vazebné a senzorické domény, která reaguje na intra- nebo extracelulární signál. Bývají součástí kotranskribovaných operonů faktorů  $\sigma$ , což pravděpodobně pomáhá s udržením stechiometrické hladiny (shrnutí v Paget, 2015).

Faktory anti- $\sigma$  využívají různé mechanismy k uvolnění faktorů  $\sigma$  v reakci na specifické podněty. Mezi dva takové klíčové mechanismy patří sekvence a disociace holoenzymu. Během sekvence faktory anti- $\sigma$  blokují klíčové vazebné domény faktorů  $\sigma$  a tím jim brání v asociaci s RNAP a zahájení transkripce (Sorenson *et al.*, 2004). Tato vazba může být regulována faktorem anti-anti- $\sigma$ , který se naváže na faktor anti- $\sigma$  a uvolní faktor  $\sigma$ .

Naopak, disociace holoenzymu zahrnuje oddělení holoenzymu RNAP na jeho jádro a složky faktoru  $\sigma$ . Toto oddělení může být spuštěno vazbou faktoru anti- $\sigma$  na faktor  $\sigma$ , což destabilizuje holoenzym. Po disociaci holoenzymu může faktor  $\sigma$  volně interagovat s jiným jádrovým enzymem RNAP a iniciovat transkripci na jiném promotoru (shrnutí v Helmann, 1999).

#### 3.2. Malé molekuly

Regulace pomocí malých molekul představuje mechanismus, který RNAP umožňuje efektivně a rychle reagovat na environmentální změny. Mezi nejvýznamnější regulační malé molekuly patří iNTP a guanosin-3,5bisfosfát (ppGpp). Regulace pomocí iNTP je spjata především s regulací ribozomálních promotorů a dostupnost iNTP ovlivňuje expresi v reakci na rychlost růstu. Naopak ppGpp je syntetizován ve stresových podmínkách jako je nedostatek živin, kdy v buňce není dostatek aminokyselin pro následnou translaci (shrnutí v Browning and Busby, 2004). Účinky iNTP a ppGpp se však vzájemně doplňují a jejich vliv na transkripci je komplementární. K poklesu transkripce rRNA ve

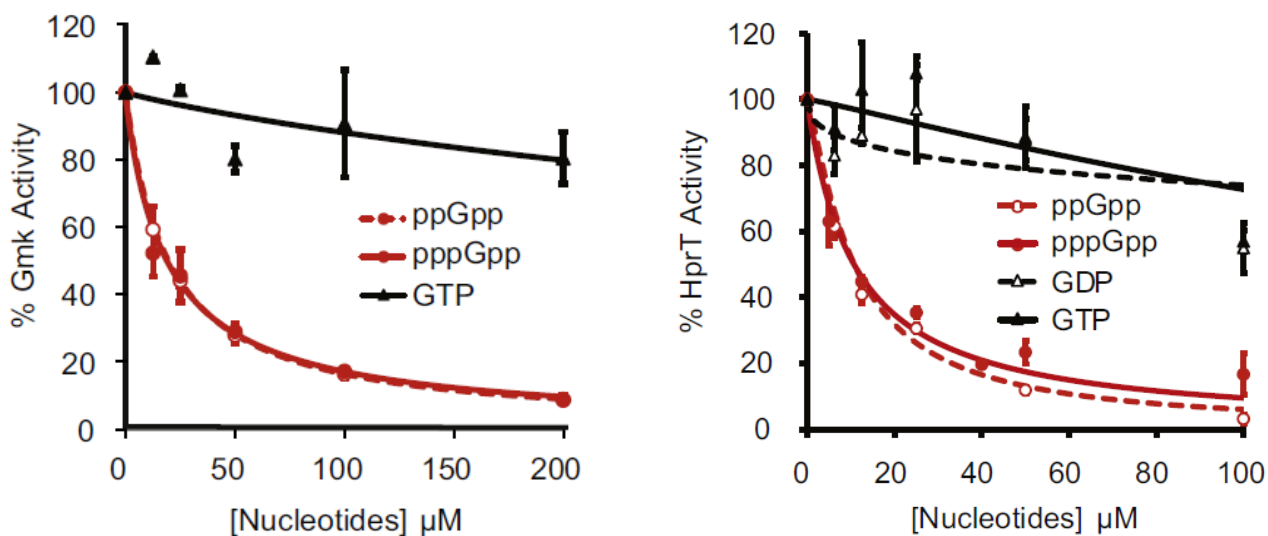
stacionární fázi přispívá jak zvýšení koncentrace ppGpp, tak i snížení koncentrace iNTP (Murray *et al.*, 2003).

Mezi základní NTP patří ATP, guanin trifosfát (GTP), cytidin trifosfát (CTP) a uracil trifosfát (UTP). Iniciační NTP se liší mezi promotory, nicméně u většiny bakterií převládá jako iNTP ATP nebo GTP (Krásný *et al.*, 2008). Promotory ribozomální RNA (rRNA) vyžadují pro efektivní transkripci relativně vysoké koncentrace iNTP, jelikož tvoří nestabilní komplexy s RNAP. ATP a GTP hrají klíčovou roli ve stabilizaci otevřeného komplexu, který je nezbytný pro úspěšnou iniciaci transkripce (Gaal *et al.*, 1997).

Alarmon ppGpp působí jako signální molekula, která mění regulaci transkripce v bakteriální buňce. Syntéza ppGpp je indukována stresem, např. nedostatkem aminokyselin. Když se hladina ppGpp zvýší, naváže se na RNAP, což způsobí destabilizaci otevřeného komplexu, která sníží rychlost transkripce. To má za následek snížení exprese rychle rostoucích genů a zároveň zvýšení exprese genů podílejících se na biosyntéze aminokyselin a strategiích přežití. Kromě toho může ppGpp interagovat s dalšími transkripčními faktory nebo faktory  $\sigma$ , jako je RpoS, což dále ovlivňuje expresi genů reagujících na stres (Brown *et al.*, 2002).

Přestože se ppGpp váže na RNAP bez ohledu na promotor, inhibuje transkripci pouze u promotorů, které tvoří relativně nestabilní otevřené komplexy. Tyto promotory s krátkými úseky bohatými na GC páry v blízkosti pozice +1 (tzv. diskriminátor), řídí transkripci genů potřebných pro translaci. Takové promotory se vyznačují i tím, že vykazují nízkou aktivitu při nízkých koncentracích iniciačního nukleotidu, obvykle ATP (shrnutí v Browning and Busby, 2004).

ppGpp se na RNAP může vázat přímo, jako je tomu u *E. coli*, kde se váže na dvě různá místa na RNAP, často ve spojení s transkripčním faktorem DksA (Paul *et al.*, 2004). U *B. subtilis* však ppGpp transkripci ovlivňuje nepřímo změnou hladiny GTP v buňce a na RNAP se nenaváže (Krásný and Gourse, 2004). GTP je spotřebováno pro biosyntézu ppGpp, a když jeho hladina stoupá, inhibuje *in vitro* enzymy biosyntézy GTP, jako jsou Gmk a HprT (**Obr. 4**), což vede k dalšímu poklesu hladiny GTP. Tato regulace zajišťuje, že hladiny GTP zůstávají v optimálním rozmezí pro růst, zabraňuje toxické akumulaci GTP a udržuje buněčnou homeostázu (Kriel *et al.*, 2012). Nízká hladina GTP způsobuje nízkou transkripci z promotorů vyžadující GTP jako iniciační nukleotid, mezi něž patří geny pro rRNA (Krásný and Gourse, 2004; Natori *et al.*, 2009).



**Obrázek 4.** (p)ppGpp inhibuje *in vitro* aktivitu Gmk a HprT

Enzymatický experiment *in vitro* s vyčištěnými komponenty ukazující, že (p)ppGpp, ale ne GTP, inhibuje aktivitu Gmk a HprT a dosahuje 50% inhibice při 20 μM (p)ppGpp pro Gmk a 11 μM (p)ppGpp pro HprT. Na ose x je znázorněna koncentrace (p)ppGpp a GTP v μM. Na ose y je znázorněna aktivita Gmk/HprT v %. GTP je vyznačeno černě a (p)ppGpp červeně. Převzato z (Kriel *et al.*, 2012).

### 3.3. Transkripční faktory

Transkripční faktory hrají klíčovou roli při regulaci exprese genů tím, že interagují s DNA v blízkosti promotorů a ovlivňují, zda a jak často bude gen přepisován. Sekvenční specifita DNA vazebných proteinů je dána jejich strukturou, která umožňuje rozpoznání a vazbu na specifické DNA sekvence v promotorových oblastech. V *E. coli* bylo identifikováno přes 300 regulačních proteinů interagujících s DNA, z nichž 35 % jsou aktivátory, přes 40 % represory a přes 20 % proteinů může zastávat obě funkce. Zhruba 8 % všech známých otevřených čtecích rámců (ORF) *E. coli* tedy kóduje transkripční faktory a podílí se na efektivní regulaci genové exprese (Perez-Rueda, 2000).

Zajímavé je, že pouze sedm transkripčních faktorů (CRP, IHF, FNR, FIS, ArcA, Lrp a H-NS) je zodpovědných za regulaci 50 % všech regulovaných genů. To ukazuje, jak efektivně je regulována exprese genů. V polovině případů se ovšem jedná o regulaci několika transkripčními faktory zároveň a globální regulátor pak působí společně s lokálními více specifickými regulátory. Oproti tomu zhruba 60 faktorů reguluje pouze jeden promotor (Martínez-Antonio and Collado-Vides, 2003).

V kapitole o topologii DNA budou popsány faktory FIS (*factor for inversion stimulation*), H-NS (*Histone-like nucleoid structuring protein*) a IHF (*integration host factor*), jelikož regulují transkripci genů modulací topologie DNA a řadí se mezi proteiny asociované s nukleoidem.



## 4. Topologie DNA

Molekula DNA se skládá ze dvou komplementárních vláken, které se spolu párují pomocí vodíkových můstků mezi jednotlivými bázemi. Purinová báze adenin (A) se váže s pyrimidinem thyminem (T) a purin guanin (G) se váže s pyrimidinem cytosinem (C). Vlákna DNA jsou antiparalelní a vytvářejí dvoušroubovici (Watson and Crick, 1953).

Nejčastější forma DNA v živých buňkách je B-forma, která se vyznačuje pravotočivou strukturou dvojitě šroubovice s velkým a malým žlábkem. B-DNA je stabilnější a běžně se vyskytuje za přirozených fyziologických podmínek v buňkách. Má stejnou šířku pro každý pár bází. Velký žlábek B-DNA je široký a hluboký, zatímco malý žlábek je úzký a hluboký a poskytuje specifická vazebná místa pro proteiny a jiné molekuly (shrnuto v Bates and Maxwell, 2005). DNA může zaujímat i A-formu, která vzniká v dehydratačních podmínkách, kdy tvoří pravotočivou dvojitou šroubovici s kratší a kompaktnější strukturou ve srovnání s B-DNA (Franklin and Gosling, 1953). U A-DNA jsou páry bází skloněny k ose šroubovice. Velký žlábek A-DNA je hluboký a úzký, zatímco malý žlábek je široký a mělký, což přispívá k její jedinečné geometrii (shrnuto v Bates and Maxwell, 2005). Naopak relativně vzácná levotočivá Z-DNA vzniká pouze ve specifických podmínkách jako jsou vysoké koncentrace solí. Každý druhý pár bází Z-DNA má opakující se strukturu a její velký a malý žlábek se od sebe v šířce liší pouze minimálně (Mitsui *et al.*, 1970; Ravichandran *et al.*, 2019).

Topologie uzavřené kruhové molekuly DNA je definována pomocí celkového počtu vinutí (*linking number*, Lk). To popisuje, kolikrát jsou dvě vlákna DNA vzájemně propojena. Lk zůstává pro uzavřenou kruhovou DNA konstantní a může se změnit pouze přerušením vláken a jejich následným spojením. Celkový počet vinutí je dán součtem nadšroubovicového čísla (*writhe*, Wr) a dvoušroubovicového čísla (*twist*, Tw). Nadšroubovicové číslo představuje míru zkroucení nebo stočení osy DNA v trojrozměrném prostoru. Dvoušroubovicové číslo označuje počet obtočení dvojitě šroubovice kolem své osy na jednotku délky. Je určeno místním sklonem šroubovice a je ovlivněno počtem párů bází a opakováním šroubovice.

$$Lk = Tw + Wr$$

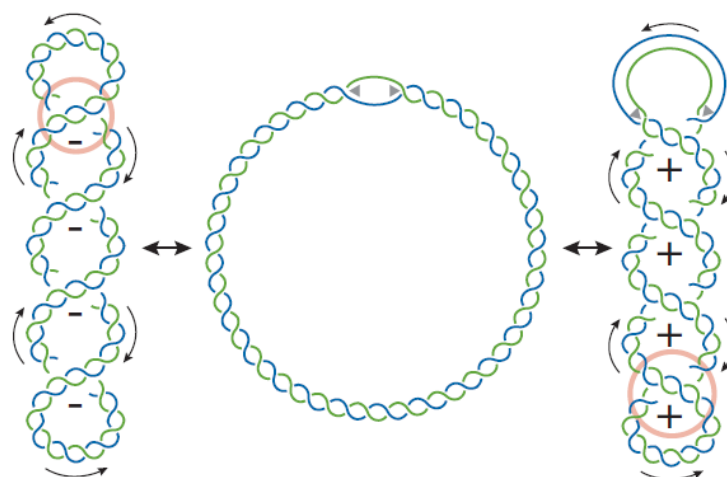
Změny jednoho z těchto parametrů jsou kompenzovány úpravami ostatních, aby se zachoval celkový počet vinutí. Když se celkový počet vinutí změní v důsledku nadšroubovicového vinutí (*supercoiling*) nebo jiných faktorů, složky Tw a Wr se přizpůsobí, aby se zachovalo celkové Lk. Například u negativně stočené DNA se složka Wr zvyšuje, aby kompenzovala pokles Tw a zajistila, že celkové Lk zůstane konstantní (Maxwell and Gellert, 1986).

## 4.1. Nadšroubovicové vinutí

Nadšroubovicové vinutí (*supercoiling*) je jev, při kterém dochází k dodatečnému vinutí molekuly DNA nad rámec běžné dvoušroubovicové struktury. Dochází k němu, když je šroubovice DNA nadměrně nebo nedostatečně navinutá, což vede ke vzniku superhelikální molekuly DNA (shrnutí v Wang, 1986). Nadšroubovicové vinutí může být pozitivní nebo negativní. Při pozitivním je molekula DNA v porovnání s uvolněným stavem nadměrně stočená nebo převinutá. Výsledkem je těsnější vinutí šroubovice DNA, díky čemuž je DNA kompaktnější. To může ovlivnit iniciaci transkripce a replikace. Při negativním vinutí je DNA v porovnání s relaxovaným stavem nedostatečně stočená nebo navinutá. To vede k méně těsnému vinutí šroubovice DNA, přičemž mezi řetězci je méně propojení než v uvolněném stavu (shrnutí v Schwartzman and Stasiak, 2004). Negativní vinutí může usnadnit iniciaci procesů, jako je replikace DNA, transkripce a rekombinace, protože zpřístupňuje DNA a usnadňuje její odvíjení (Marians *et al.*, 1986; Vologodskii and Cozzarelli, 1994).

## 4.2. Topoizomerázy

V regulaci topologie DNA hrají klíčovou roli topoizomerázy, které katalyzují změny v celkovém počtu vinutí. Topoizomerázy mohou štěpit vlákna DNA, a tím vytvářet přechodné zlomy, čímž zmírňují torzní napětí a udržují správnou topologii DNA. Během štěpení topoizomerázami dochází ke vzniku přechodné fosfodiesterové vazby mezi tyrosinem v proteinu a jedním z konců přerušeno vlákna. Topoizomerázy jsou nezbytné pro replikaci, protože pomáhají odvíjet vlákna DNA a uvolňovat torzní napětí, které vzniká před replikační vidličkou. První fáze lokálního oddělení vláken pomocí DNA helikázy u negativní nadšroubovice molekuly DNA vede k redukci negativní nadšroubovice, avšak další oddělení způsobuje nárůst pozitivní nadšroubovice (**Obr. 5**). Toto vznikající torzní napětí brání další aktivitě helikázy (shrnutí v Schwartzman and Stasiak, 2004). Topoizomerázy se podílejí i na transkripci tím, že usnadňují pohyb RNAP podél templátové DNA (shrnutí v Champoux, 2001).



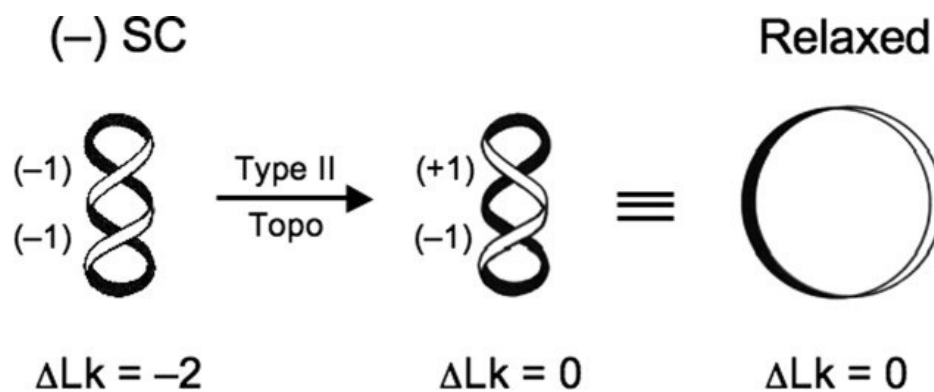
**Obrázek 5.** Změna vinutí molekuly DNA působením DNA helikázy

Z negativní pravotočivé nadšroubovice DNA (vlevo) se stává pozitivní levotočivá nadšroubovice (vpravo) v důsledku lokálního odvíjení vláken pomocí DNA helikáz (šedé šipky). Převzato z (Schvartzman and Stasiak, 2004).

Topoizomerázy se rozdělují na typ I a typ II. Topoizomerázy typu I štěpí pouze jedno vlákno, zatímco topoizomerázy typu II mohou štěpit obě vlákna DNA. V *E. coli* byly nalezeny dvě topoizomerázy typu I a to topoizomeráza I a III. Topoizomeráza I uvolňuje negativně svinutou DNA tím, že vytváří jednovláknové zlomy, které umožňují druhému vláknu rotovat kolem zlomu před jeho opětovným uzavřením. Tento proces vede k relaxaci zavinuté DNA bez nutnosti hydrolýzy ATP (Wang, 1971; Zechiedrich *et al.*, 2000). Topoizomeráza III hraje roli v procesech opravy DNA a rekombinace. Přestože není schopna uvolňovat pozitivní superzávity, působí na struktury DNA, které obsahují dvouřetězcové zlomy nebo oblasti zapletené DNA. Tato topoizomeráza dokáže oddělovat kruhy DNA tím, že zavádí přechodné zlomy a umožňuje řetězcům DNA projít zlomy před opětovným uzavřením (Hiasa and Mariani, 1994).

Další dvě topoizomerázy v *E. coli* patří mezi typ II a jsou to DNA gyráza a topoizomeráza IV. Topoizomerázy typu II fungují tak, že vytvoří dvouřetězcový zlom v jednom úseku DNA, provedou tímto zlomem další segment DNA a poté zlom znovu uzavřou (Obr. 6). Tento proces umožňuje uvolnění pozitivních i negativních superzávitů v DNA (shrnutí v Dewese *et al.*, 2009).

DNA gyráza je jedinou známou topoizomerázou schopnou vytvářet negativní nadšroubovici na úkor hydrolyzy ATP (Gellert *et al.*, 1976; Reece and Maxwell, 1991). DNA gyráza se nejprve naváže na úsek DNA, známý jako G-segment, a obtočí kolem sebe DNA. Poté dojde ke konformační změně gyrázy, což vede k otevření brány DNA. To umožní dalšímu segmentu DNA (T-segment) být transportován přes tuto bránu za spotřeby ATP. Při protahování T-segmentu zavádí DNA gyráza do molekuly DNA negativní superzávit. Následně je zlom v DNA ligován a jsou uvolněny produkty hydrolyzy ATP (shrnutí v Champoux, 2001). Role topoizomerázy IV se částečně překrývá s topoizomerázou III, jelikož topoizomeráza IV je primárně zodpovědná za dekatenzaci (oddělování) molekul DNA. Topoizomeráza IV štěpí a znovu spojuje vlákna DNA, čímž zajišťuje správné oddělení replikovaných chromozomů (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995).



**Obrázek 6.** Relaxace DNA katalyzovaná topoizomerázou typu II

Topoizomeráza typu II uvolňuje DNA, negativní vinutí se mění na pozitivní a díky tomu se mění i číslo celkového počtu vinutí z -2 na 0. Převzato z (Deweese *et al.*, 2009).

### 4.3. Proteiny asociované s nukleoidem

Proteiny asociované s nukleoidem (*nucleoid-associated proteins*, NAP) jsou bakteriální proteiny vázající DNA, které hrají klíčovou roli při udržování struktury a dynamiky nukleoidu a při vytváření kompaktní DNA. Jsou velmi hojné a mají schopnost ovlivňovat transkripci, replikaci DNA, rekombinaci a opravy specifických genů. Mezi hlavní NAPs v *E. coli* patří faktory FIS, H-NS a IHF, které mohou zároveň fungovat jako transkripční faktory.

#### 4.3.1. Faktor FIS

Faktor FIS je protein ohýbající DNA, který se hojně vyskytuje v exponenciální fázi. Jeho exprese však rychle klesá, když buňka dosáhne stacionární fáze, což naznačuje klíčovou roli při přechodu mezi těmito fázemi (Schneider *et al.*, 1997). FIS reguluje mnoho genů a ovlivňuje i procesy replikace, rekombinace a DNA transpozice. Většina genů regulovaných FIS je řízena nepřímo, jelikož FIS ovlivňuje syntézu

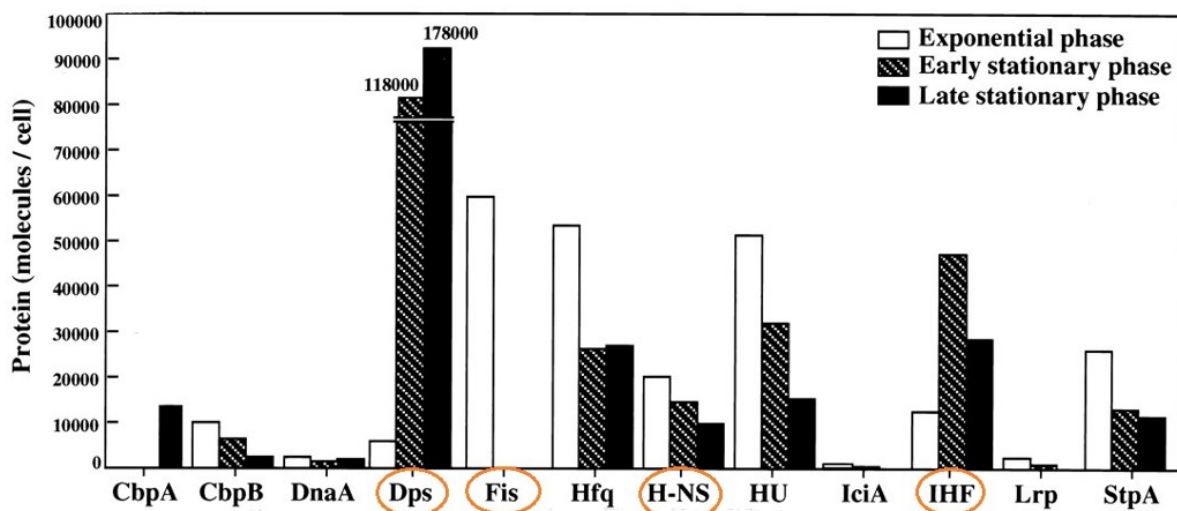
příslušných represorových proteinů. FIS přímo interaguje s C-terminální doménou podjednotky  $\alpha$  RNAP a rekrutuje tak RNAP k zahájení transkripce (Bokal, 1997).

FIS interaguje s DNA tak, že ji ohýbá a vytváří komplexní struktury, které tvoří v podstatě oddělené úseky DNA spojené alespoň jedním zákrutem. Tyto struktury mohou být spojeny s oblastmi s vysokou transkripční aktivitou (Schneider, 2001). U genů vázaných na FIS byla zjištěna vyšší hladina genové exprese, a FIS tak působí převážně jako aktivátor (Kahramanoglou *et al.*, 2011). Aktivita FIS není ovlivněna vazbou malých molekul, ani není regulována posttranslačními modifikacemi, ale závisí pouze na jeho koncentraci v buňce. FIS se váže převážně na AT bohaté sekvence a jeho interakce s DNA je ovlivněna šířkou malého žlábků. Naváže se pouze do velmi úzkého malého žlábků (dáno právě sekvencí AT), což mu umožní pomocí  $\alpha$ -helixů interagovat s přilehlým velkým žlábkem, kde vzniká nová vazba vedoucí k ohnutí a stabilizaci DNA (Stella *et al.*, 2010).

#### 4.3.2. Faktor H-NS

Faktor H-NS ovlivňuje expresi zhruba 5 % genů v *E. coli* (Hommais *et al.*, 2001) a oproti faktoru FIS působí převážně jako represor transkripce. U genů vázaných na H-NS byla zjištěna nižší míra genové exprese než u genů, které na něj vázané nejsou (Kahramanoglou *et al.*, 2011). Bylo popsáno několik mechanismů, kterými H-NS ovlivňuje iniciaci transkripci. H-NS se váže na AT bohaté oblasti a mění organizaci chromozomu tak, že vytváří DNA-H-NS-DNA mosty, které udržují těsnou kondenzaci chromozomu (Dame *et al.*, 2006). H-NS ale může vytvářet i represivní smyčky, ve kterých zůstane uvězněna RNAP, aniž by mohla přejít do elongační fáze. V tomto případě vznikají pouze krátké neúplné transkripty (Dame *et al.*, 2002).

Pravděpodobně vzácnějším mechanismem je tzv. vyloučení RNAP. V této situaci dochází k oligomerizaci H-NS a vytvoření dlouhých úseků DNA s navázaným H-NS, který interaguje s C-terminální doménou RNAP. Promotor se tedy stává pro RNAP nedostupný (Shin *et al.*, 2012). H-NS se také může vázat přímo na konkrétní promotor (např. pro gen *dps*), a tím zabránit vazbě faktoru  $\sigma$ , a tedy i iniciaci transkripce. Promotor *dps* je regulován také faktorem FIS. V tomto případě působí FIS jako represor, který uvězní RNAP na promotoru, a tudíž nedojde k iniciaci (Grainger *et al.*, 2008). Oba faktory FIS a H-NS jsou nejhojnější v exponenciální fázi, zatímco ve stacionární fázi klesá hladina H-NS o 60 % a hladina FIS je prakticky nulová (**Obr. 7**). Díky tomu je hladina *Dps* (*DNA-binding protein from starved cells*) v exponenciální fázi velmi nízká, ale ve stacionární fázi se zvýší přibližně 30x (Ali Azam *et al.*, 1999). *Dps* se ve stresových podmínkách podílí na kondenzaci DNA do velmi kompaktního nukleoidu, čímž ji pomáhá chránit před poškozením oxidativním stresem (Martinez and Kolter, 1997).



**Obrázek 7.** Koncentrace proteinů v závislosti na růstové fázi

Graf znázorňuje koncentraci vybraných proteinů vázajících DNA jako počet molekul proteinu v jedné buňce. Proteiny zmiňované v této práci jsou označeny oranžově. Exponenciální fáze je označena bíle, brzká stacionární fáze šrafovane a pozdní stacionární fáze černě. Převzato z (Ali Azam *et al.*, 1999)

H-NS může transkripci negativně ovlivňovat, i když dojde k úspěšné iniciaci. Pokud se RNAP během elongace dostane do místa DNA-H-NS-DNA mostu, dojde k pozastavení elongace, která vede k Rho-závislé terminaci. Naopak lineární DNA-H-NS vlákna elongační komplex nijak neovlivňují (Kotljach *et al.*, 2015).

Tyto mechanismy slouží převážně k potlačení transkripce horizontálně přenesených genů a transkripce nekódujících sekvencí. H-NS pravděpodobně rozeznává nepůvodní sekvence díky rozdílnému obsahu AT párů v genomu (Navarre *et al.*, 2007).

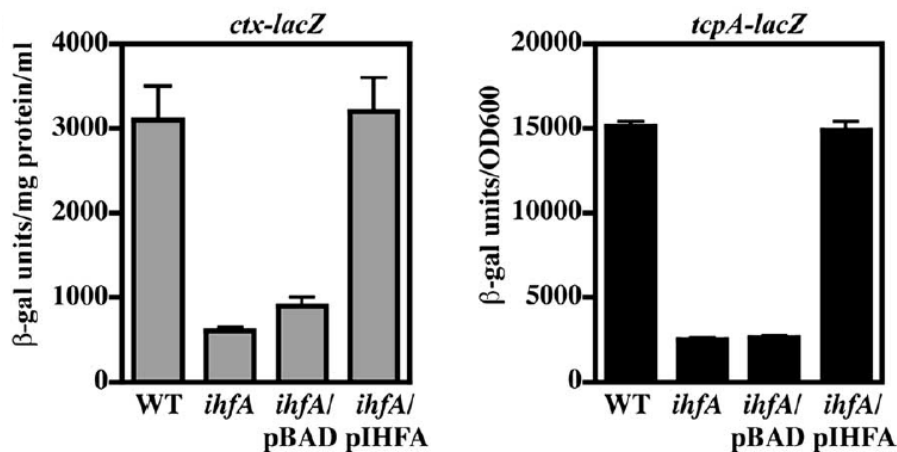
#### 4.3.3. Faktor IHF

Faktor IHF je jeden z nejvíce zastoupených proteinů ohýbajících DNA v *E. coli* a ovlivňuje různé buněčné mechanismy od replikace a transkripce až po místně-specifickou rekombinaci. Právě díky své roli v mechanismu rekombinace fága  $\lambda$  byl prvně izolován (Miller and Friedman, 1980). IHF se váže na specifickou sekvenci o délce 13 bází (Craig and Nash, 1984), vytváří na DNA ohyby o velikosti až 180°, a tím se výrazně podílí na lokální struktuře DNA i na celkové organizaci genomu (Rice *et al.*, 1996). Ohyb, který IHF vytváří, umožňuje přímou interakci vzdáleného transkripčního regulátoru s RNAP. Úhel ohybu je ovšem klíčový pro efektivní iniciaci. Ukazuje se, že k vytvoření optimálních interakcí dochází, pokud je úhel menší než 180° (Engelhorn and Geiselman, 1998). Druhý mechanismus iniciace transkripce pomocí IHF spočívá ve zvýhodnění interakce C-koncové domény  $\alpha$  podjednotky RNAP s UP elementy na ohýbané DNA (Bertoni *et al.*, 1998). IHF může také pomáhat s vytvořením otevřeného komplexu na

promotoru pomocí destabilizace DNA duplexu proti směru transkripce, což vede ke snížení potřebné aktivační energie pro tvorbu komplexu (Parekh and Hatfield, 1996).

Nejvyšších koncentrací IHF dosahuje v brzké stacionární fázi (Ali Azam *et al.*, 1999), a hraje tedy klíčovou roli v organizaci genomu při přechodu z exponenciální fáze a zastavení růstu. Pokud bakterie nemá dostatek IHF při přechodu do stacionární fáze, nedochází k umlčení energeticky náročných buněčných procesů. To způsobí horší přizpůsobení se nedostatku zdrojů a představuje to nevýhodu oproti ostatním bakteriím (Mangan *et al.*, 2006).

IHF také aktivuje expresi genů virulence u několika patogenních druhů bakterií, např. *Salmonella* (Mangan *et al.*, 2006) a *Vibrio*. Inaktivace IHF u *Vibrio cholerae* vede ke snížení exprese dvou hlavních faktorů virulence: pilu regulovaného toxinem (TCP) kódovaného genem *tcpA* a cholerového toxinu (CT) kódovaného genem *ctx* (Obr. 8). Inaktivace IHF tak brání produkci pilu a cholera toxinu. IHF se přímo váže na promotor genu *tcpA*, kde vytváří ohyb a usnadňuje tak iniciaci transkripce. IHF tady působí proti faktoru H-NS, který naopak na tento promotor působí jako represor (Stonehouse *et al.*, 2008). Vazba IHF a ohyb DNA, který vyvolává, destabilizuje dlouhé úseky DNA interagující s H-NS. Tento mechanismus představuje alternativní způsob aktivace exprese genů pomocí IHF (Van Ulsen *et al.*, 1996).



**Obrázek 8.** Vliv IHF na expresi *ctx-lacZ* a *tcpA-lacZ*

Snížené hladiny exprese pozorované u promotorů *ctx* a *tcpA* jsou způsobeny nedostatkem funkčního IHF. WT značí kmen divokého typu, *ihfA* značí mutanty v genu *ctx-lacZ*, pBAD značí prázdný vektor a pIHFA značí expresní vektor IHFα. Na ose y jsou znázorněny jednotky β-galaktosidázy. Převzato z (Stonehouse *et al.*, 2008).

## 5. Regulace transkripce pomocí topologie DNA

Topologie DNA ovlivňuje transkripci dvěma mechanismy. Prvním je vliv topologie na prostorové uspořádání promotorů a jejich vazebných míst, čímž mění jejich dostupnost pro transkripční faktory a RNAP. Vytváření smyček a závitů na DNA může tato místa přiblížit nebo oddálit, a tím podpořit nebo potlačit tvorbu iniciačního otevřeného komplexu (Yan *et al.*, 2018; Dorman, 2019).

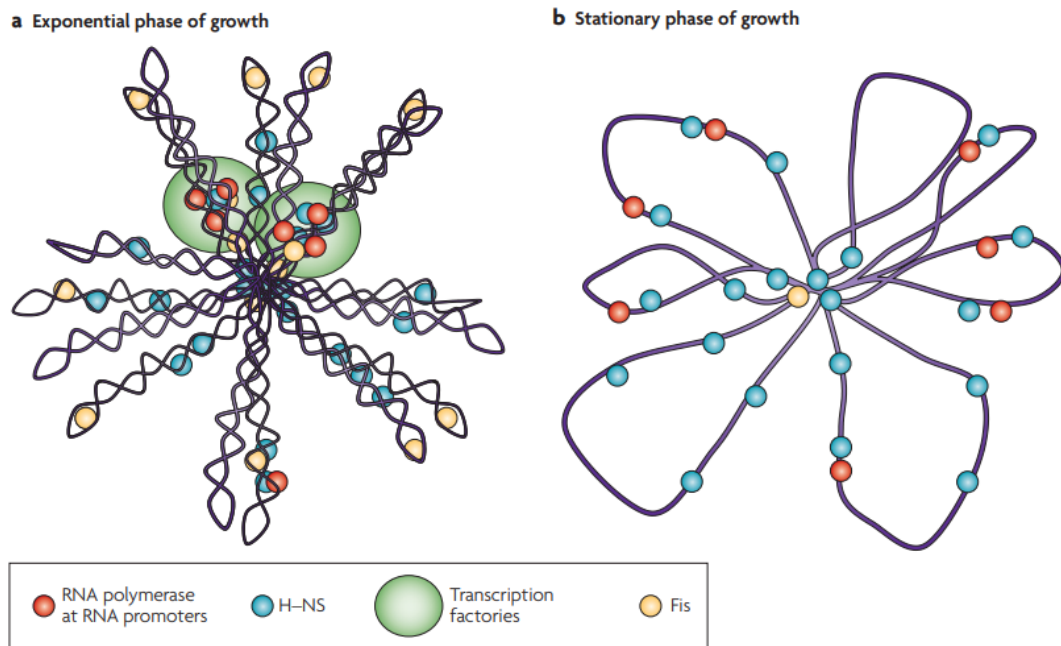
Druhým mechanismem je vliv na interakci s RNAP a regulačními faktory. Ustálené negativní nadšroubovicové vinutí vytváří rovnoměrná aktivita DNA gyrázy a topoizomeráz, které odstraňují topologické změny způsobené přemísťující se RNAP. Negativní nadšroubovicové vinutí obecně podporuje transkripci, kdy snižuje potřebnou energii pro iniciaci a pomáhá RNAP oddělit vlákna DNA. Nicméně, jsou známy i případy kdy má efekt inhibiční (Vologodskii and Cozzarelli, 1994).

Dobře prostudovaným příkladem regulace iniciace transkripce topologií DNA je změna exprese genů DNA gyrázy a topoizomeráz pomocí mechanismu zpětnovazebné kontroly. Zvýšená relaxace ovlivňuje geny topoizomeráz negativně, zatímco aktivita promotoru *gyrA* v *E. coli* se zvyšuje (Menzel and Gellert, 1987; Tse-Dinh and Beran, 1988). Promotor *gyrA* je inhibován také negativním nadšroubovicovým vinutím DNA, které vzniká za transkribující RNAP (*transcription-coupled DNA supercoiling*, TCDS). K této inhibici dochází prostřednictvím přechodného a lokalizovaného negativního vinutí, které vyvolává transkripční aktivita v blízkosti promotorové oblasti. Iniciující RNAP tak může být inhibována na promotoru skrze RNAP, která iniciovala dříve (Dages *et al.*, 2018).

Bakterie používají změnu topologie DNA také k adaptaci na změny prostředí jako je změna teploty a osmotického tlaku. Transkripce velké skupiny genů reagujících na osmotický stres u bakterie *E. coli* je vázaná na zvýšení negativního vinutí. K iniciaci transkripce dochází v podmínkách vysokého obsahu solí ve spojení s několika antibiotiky (Cheung *et al.*, 2003). Zhruba 7 % (306) genů bakterie *E. coli* je ovlivněno změnou vinutí DNA. Exprese 106 genů se zvyšuje v důsledku relaxace chromozomu, zatímco u 200 genů se exprese snižuje. Tyto geny se mezi sebou liší především počtem AT párů v kódující sekvenci a v sekvenci proti směru transkripce. Geny, jejichž exprese se zvyšuje díky relaxaci chromozomu, jsou bohatší na AT páry, zatímco geny, jejichž exprese se snižuje, jsou více GC bohaté. Potřebná energie pro vytvoření otevřeného komplexu je vyšší, pokud je DNA relaxována, nicméně AT bohaté sekvence jeho vytvoření usnadňují (Peter *et al.*, 2004).



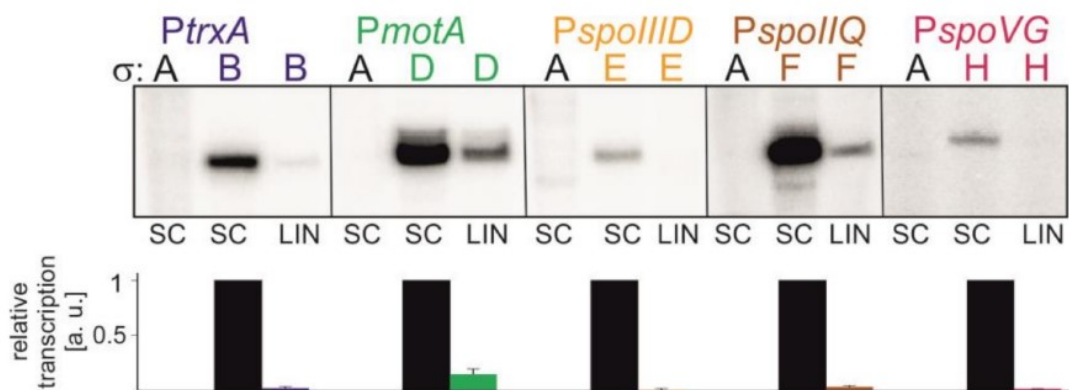
Rychle rostoucí bakterie v exponenciální fázi potřebují exprimovat velké množství genů, jejich chromozom je tedy negativně vinutý a obsahuje větší množství smyček na DNA (**Obr.9**). Ve stacionární fázi se chromozom stává více relaxovaným a transkripční aktivita se zpomalí (shrnutí v Dillon and Dorman, 2010). Ve stacionární fázi je pro *E. coli* esenciální faktor  $\sigma$  RpoS, který účinně iniciuje transkripci z relaxované DNA (Bordes *et al.*, 2003).



**Obrázek 9. Nadšroubovicové vinutí chromozomu ovlivněné NAPs v exponenciální a stacionární fázi**

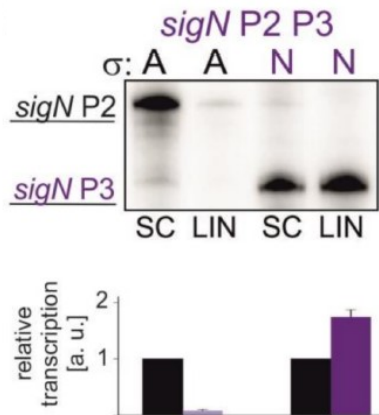
V exponenciální fázi (a) je chromozom uspořádán do smyčkových domén, které jsou negativně vinuty. S chromozomem hojně asociují faktory H-NS (modře) a FIS (žlutě) v místech RNA promotorů (červeně). Dohromady můžou vytvářet tzv. transkripční továrny (zeleně). Ve stacionární fázi (b) je chromozom relaxovaný a má méně smyčkových domén, koncentrace FIS výrazně klesla. Převzato z (Dillon and Dorman, 2010).

DNA v bakteriální buňce je však většinou ve více (exponenciální fáze) či méně (stacionární fáze) superzávitové (*supercoilované*) formě. Lineární forma DNA se u většiny druhů bakterií objevuje pouze zřídka. Díky negativnímu nadšroubovicovému vinutí je pro holoenzym RNAP snazší rozplétat vlákna DNA. Efektivita iniciace transkripce u většiny testovaných alternativních faktorů  $\sigma$  v *B. subtilis* ( $\sigma^B$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$  a  $\sigma^H$ ) je výrazně vyšší na templátech s negativní nadšroubovicí DNA, zatímco na lineární (relaxované) DNA je téměř nulová (**Obr. 9**). Toto platí i pro faktory  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ , které jsou aktivní ve stacionární fázi. Jedinou výjimku tvoří faktor  $\sigma^N$ , který vykazuje vyšší aktivitu na lineárním templátu DNA (**Obr. 10**). Faktor  $\sigma^N$  je exprimován po vystavení buněk antibiotiku mitomycin C. Toto antibiotikum vyvolává alkylaci DNA a její štěpení, což vede ke vzniku lineárních fragmentů DNA (Lee *et al.*, 2006). Je tedy pravděpodobné, že z toho důvodu je  $\sigma^N$  aktivnější v podobných podmínkách, nicméně molekulární podstata tohoto jevu zůstává neobjasněna (Sudzinová *et al.*, 2021).



**Obrázek 9.** Transkripce *in vitro* s alternativními faktory  $\sigma$  na topologicky rozdílných templátech DNA

Písmena nad primárními daty (radioaktivně značené transkripty rozdělené elektroforézou v polyakrylamidovém gelu) označují použitý faktor  $\sigma$  a jeho dependentní promotor. Faktor  $\sigma^A$  je znázorněn černou barvou,  $\sigma^B$  tmavě modrou,  $\sigma^D$  zelenou,  $\sigma^E$  žlutou,  $\sigma^F$  hnědou a  $\sigma^H$  červenou. SC značí templát s negativní nadšroubovicí DNA a LIN lineární (relaxovanou) DNA. Grafy ukazují relativní kvantifikaci, kdy aktivita na SC byla nastavena jako 1. Přidání faktoru  $\sigma^A$  slouží jako kontrola, že pozorovaná transkripce byla způsobena přidáním specifických faktorů  $\sigma$ , a ne možnou kontaminací jádra RNAP  $\sigma^A$ . Převzato z (Sudzinová *et al.*, 2021).

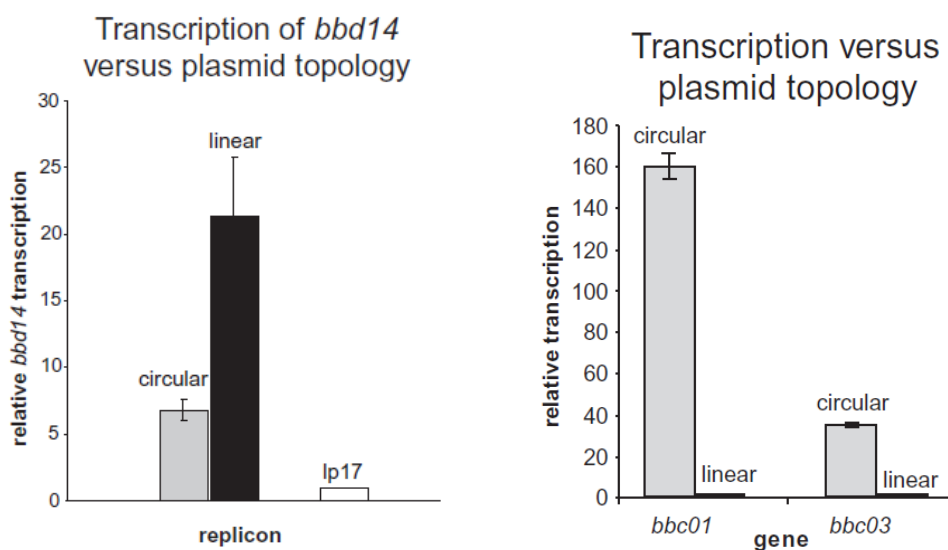


**Obrázek 10.** Transkripce *in vitro* s alternativním faktorem  $\sigma^N$  a faktorem  $\sigma^A$  na topologicky rozdílných templátech DNA

Transkripce *in vitro* pomocí delšího konstruktů *sigN* P2+P3, který obsahuje P2 promotor pro  $\sigma^A$  a P3 promotor pro  $\sigma^N$ . Písmena nad primárními daty (radioaktivně značené transkripty rozdělené elektroforézou v polyakrylamidovém gelu) označují použitý faktor  $\sigma$ , jeho dependentní promotor je označen vlevo. Graf ukazuje relativní kvantifikaci, kdy aktivita na SC byla nastavena jako 1. Faktor  $\sigma^A$  je znázorněn černou barvou a  $\sigma^N$  fialovou. SC značí templát s negativní nadšroubovicí DNA a LIN lineární (relaxovanou) DNA. Převzato z (Sudzinová *et al.*, 2021).

Patogenní bakterie *Borrelia burgdorferi* se během svého životního cyklu přesouvá z klíštěte do savčího hostitele a musí se přizpůsobit drastické změně prostředí (shrnutí v Samuels, 2011). Rychlou reakci umožňuje právě změna topologie DNA, jelikož úroveň negativního nadšroubovicového vinutí se snižuje se zvyšující se teplotou (López-García and Forterre, 2000). Právě prostřednictvím environmentálně indukovaných změn v nadšroubovicové struktuře DNA je u *B. burgdorferi* regulována exprese lipoproteinů OspA, OspB a OspC. Zvýšená teplota, a tedy nižší úroveň negativního nadšroubovicového vinutí, vede ke snížení aktivity promotoru *OspAB* a ke zvýšení aktivity promotoru *OspC* (Alverson *et al.*, 2003). OspA hraje důležitou roli v interakci mezi bakterií a přenašečem, zatímco OspC hraje roli při přenosu z přenašeče do savčího hostitele (shrnutí v Samuels, 2011).

Genom *B. burgdorferi* obsahuje přes 20 lineárních a cirkulárních plazmidů. Přestože dochází k iniciaci transkripce z obou typů plazmidů, transkripce je závislá na topologii. Pokud jsou plazmidy obsahující geny pro replikaci převedeny do nenativního topologického stavu, dochází ke snížení hladiny transkriptu (Obr. 11) (Beaurepaire and Chaconas, 2007).



**Obrázek 11.** Transkripce plazmidů s nativní a nenativní topologií

Nativní topologie *bbd14*, iniciátoru replikace lp17, je lineární. Po změně topologie *bbd14* byla na lineárním plazmidu pozorována 7,4x vyšší exprese než na cirkulárním plazmidu. Nativní topologie *bbc01* a *bbc03*, genů pro replikaci plazmidů, je cirkulární. Po změně topologie se sníží úroveň jejich transkripce. Konkrétně hladiny transkriptu na kopii genu *bbc01* a *bbc03* vykazují 10,7x a 2,4x nižší expresi, pokud jsou exprimovány z lineárního vektoru ve srovnání s cirkulární formou. Na ose y je znázorněna úroveň relativní transkripce. Převzato z (Beaurepaire and Chaconas, 2007).

Topologie DNA nemá vliv pouze na iniciaci transkripce, ale může ovlivňovat i její elongaci. Během probíhající transkripce se DNA po směru transkripce stává nadměrně navinutá, zatímco DNA proti směru transkripce se stává nedostatečně navinutá. Tento jev může vést k vytvoření tzv. R-smyčky, kdy se vznikající transkript RNA páruje s templátovou DNA. V tomto případě RNAP nemůže pokračovat v elongaci a zastaví se. Eliminace superzávitů pomocí topoizomeráz je tedy klíčová pro úspěšné dokončení transkripce (Nudler, 2012; Dorman, 2019).

Elongace transkripce má zvýšený vliv na lokální topologii DNA, zejména pokud vznikají dlouhé transkripty, jako jsou ty, které se vyskytují v operonech kódujících ribozomální RNA a další prvky translačního aparátu. Části DNA bakterie *Caulobacter crescentus*, které jsou vysoce exprimované, vytvářejí topologické hranice mezi jednotlivými doménami. Aktivní oblasti transkripce způsobují lokální narušení nadšroubovicového vinutí, což vede k vytvoření prostorových mezer mezi doménami a vzniku kontaktní bariéry. K obnovení kontaktu a plektonemické struktury dochází pouze při zastavení transkripce v této oblasti (Le and Laub, 2016).

## 6. Závěr

V této bakalářské práci je popsán vzájemný vztah mezi bakteriální transkripcí a topologií DNA. Většina molekuly DNA je v buňce uspořádána do negativní nadšroubovice, která snižuje potřebnou energii pro iniciaci transkripce a pomáhá RNAP oddělit vlákna DNA (Vologodskii and Cozzarelli, 1994). Během transkripce dochází ke změně nadšroubovicového vinutí, DNA po směru transkripce se stává nadměrně navinutá, zatímco DNA proti směru transkripce se stává nedostatečně navinutá. Tento problém pomáhají řešit topoizomerázy, které katalyzují změny v celkovém počtu vinutí.

Změny v topologii DNA mohou vytvářet také proteiny asociované s nukleoidem, které hrají klíčovou roli v udržování struktury a dynamiky nukleoidu. Působí také jako transkripční faktory a navázáním se do specifického regionu DNA mohou podpořit nebo inhibovat iniciaci transkripce. NAPs také usnadňují tvorbu smyček na DNA, které mohou přiblížit původně vzdálené regulační prvky k promotoru. Naopak Faktor H-NS může vytvářet tzv. represivní smyčky, ve kterých zůstane uvězněna RNAP, aniž by mohla přejít do elongační fáze (Dame et al., 2002).

Topologie DNA se mění v závislosti na fázi růstu bakterie. V exponenciální fázi bakterie potřebují exprimovat velké množství genů, jejich chromozom je tedy více negativně vinutý a obsahuje větší množství smyček na DNA. Ve stacionární fázi se chromozom stává více relaxovaným a transkripční aktivita se zpomalí (shrnuto v Dillon and Dorman, 2010). Nicméně, jsou známy příklady, kdy může být efektivnější transkripce z více relaxovaných templátů, příkladem jsou lineární plazmidy v *B. burgdorferii* (Beaurepaire and Chaconas, 2007) či transkripce závislá na faktoru  $\sigma^N$  u *B. subtilis* (Sudzinová et al., 2021).

Iniciace transkripce v *B. subtilis* je u primárního a většiny alternativních faktorů  $\sigma$  efektivnější na templátech s negativní nadšroubovicí DNA. Výjimku představuje faktor  $\sigma^N$ , který je exprimován po vystavení buněk antibiotiku mitomycin C (Sudzinová et al., 2021). Mitomycin C způsobuje linearizaci DNA, aktivaci exprese  $\sigma^N$  a smrt buněk dosud neznámým mechanismem (Myagmarjav et al., 2016). Vlivem faktoru  $\sigma^N$  na bakteriální transkripci se budu experimentálně zabývat ve své budoucí diplomové práci.

Celkově lze říci, že topologie DNA slouží jako kritický faktor ovlivňující různé aspekty transkripce, včetně dostupnosti promotoru nebo procesu elongace. Vzájemné působení mezi topologií DNA a transkripční regulací umožňuje adaptaci bakterií na různé podmínky prostředí. Studium tohoto fenoménu je zásadní pro posun našeho porozumění základním biologickým procesům.

## 7. Použitá literatura

(\*Sekundární citace)

Ali Azam, T. *et al.* (1999) 'Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid', *Journal of Bacteriology*, 181(20), pp. 6361–6370

Allfano, P. *et al.* (1991) 'A consensus motif common to all rho-dependent prokaryotic transcription terminators', *Cell*, 64(3), pp. 553–563

Alverson, J. *et al.* (2003) 'Transcriptional regulation of the ospAB and ospC promoters from *Borrelia burgdorferi*', *Molecular microbiology*, 48(6), pp. 1665–1677.

Bae, B. *et al.* (2015) 'Structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme open promoter complex', *eLife*, 4, p. e08504.

Barker and Gourse (2001) 'Regulation of rRNA Transcription Correlates with Nucleoside Triphosphate Sensing', *Journal of Bacteriology*, 183(21), pp. 6315–6323.

Barker, M.M. *et al.* (2001) 'Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro' Edited by R. Ebright', *Journal of Molecular Biology*, 305(4), pp. 673–688.

\*Bates, A. D., & Maxwell, A. (2005). DNA topology. *Oxford University Press*.

Beaurepaire, C. and Chaconas, G. (2007) 'Topology-dependent transcription in linear and circular plasmids of the segmented genome of *Borrelia burgdorferi*', *Molecular microbiology*, 63(2), pp. 443–453.

Bertoni, G. *et al.* (1998) 'Active recruitment of  $\sigma^{54}$ -RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and  $\alpha$ CTD', *The EMBO Journal*, 17(17), pp. 5120–5128.

Bokal, A.J. (1997) 'Molecular anatomy of a transcription activation patch: FIS-RNA polymerase interactions at the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter', *The EMBO Journal*, 16(1), pp. 154–162.

Bordes, P. *et al.* (2003) 'DNA supercoiling contributes to disconnect  $\sigma^S$  accumulation from  $\sigma^S$ -dependent transcription in *Escherichia coli*', *Molecular microbiology*, 48(2), pp. 561–571.

Brown, L. *et al.* (2002) 'DksA Affects ppGpp Induction of RpoS at a Translational Level', *Journal of Bacteriology*, 184(16), pp. 4455–4465

\*Browning, D.F. and Busby, S.J.W. (2004) 'The regulation of bacterial transcription initiation', *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), pp. 57–65.

Burgess, R., Travers, A., Dunn, J. *et al.* (1969) 'Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase', *Nature* 221, 43–46.

\*Buskila, A.A., Kannaiah, S. and Amster-Choder, O. (2014) 'RNA localization in bacteria', *RNA Biology*, 11(8), pp. 1051–1060.

Campbell, E.A. *et al.* (2002) 'Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity  $\sigma$  subunit', *Molecular cell*, 9(3), pp. 527–539.

- Carafa, Y. d'Aubenton, Brody, E. and Thermes, C. (1990) 'Prediction of rho-independent Escherichia coli transcription terminators', *Journal of Molecular Biology*, 216(4), pp. 835–858.
- Craig, N.L. and Nash, H.A. (1984) 'E. coli integration host factor binds to specific sites in DNA', *Cell*, 39(3), pp. 707–716.
- Dages, S. et al. (2018) 'Inhibition of the gyrA promoter by transcription-coupled DNA supercoiling in Escherichia coli', *Scientific reports*, 8(1), p. 14759.
- Dame, R.T. et al. (2002) 'Structural Basis for H-NS-mediated Trapping of RNA Polymerase in the Open Initiation Complex at the rrnB P1', *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), pp. 2146–2150.
- Dame, R.T., Noom, M.C. and Wuite, G.J.L. (2006) 'Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation', *Nature*, 444(7117), pp. 387–390.
- Dennis, P. et al. (2009) 'Varying rate of RNA chain elongation during rrn transcription in Escherichia coli', *Journal of bacteriology*, 191(11), pp. 3740–3746.
- \*Deweese, J.E., Osheroff, M.A. and Osheroff, N. (2009) 'DNA topology and topoisomerases: Teaching a "knotty" subject', *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 37(1), pp. 2–10.
- \*Dillon, S.C. and Dorman, C.J. (2010) 'Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression', *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), pp. 185–195.
- \*Dorman, C.J. (2019) 'DNA supercoiling and transcription in bacteria: a two-way street', *BMC Molecular and Cell Biology*, 20(1), p. 26.
- \*Ebright, R.H. (2000) 'RNA Polymerase: Structural Similarities Between Bacterial RNA Polymerase and Eukaryotic RNA Polymerase II', *Journal of Molecular Biology*, 304(5), pp. 687–698.
- Engelhorn, M. and Geiselman, J. (1998) 'Maximal transcriptional activation by the IHF protein of Escherichia coli depends on optimal DNA bending by the activator', *Molecular Microbiology*, 30(2), pp. 431–441.
- Epshtein, V. et al. (2010) 'An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination', *Nature*, 463(7278), pp. 245–249.
- Franklin, R. E., & Gosling, R. G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171(4356), pp.740-741.
- Gaal, T. et al. (1997) 'Transcription Regulation by Initiating NTP Concentration: rRNA Synthesis in Bacteria', *Science*, 278(5346), pp. 2092–2097.
- Gellert, M. et al. (1976) 'DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), pp. 3872–3876.
- Gentry, D. et al. (1991) 'The omega subunit of Escherichia coli K-12 RNA polymerase is not required for stringent RNA control in vivo', *Journal of Bacteriology*, 173(12), pp. 3901–3903.
- Goldman, S.R., Ebright, R.H. and Nickels, B.E. (2009) 'Direct Detection of Abortive RNA Transcripts in Vivo', *Science*, 324(5929), pp. 927–928.
- Grainger, D. C., Goldberg, M. D., Lee, D. J., & Busby, S. J. (2008). Selective repression by Fis and H-NS at the Escherichia coli dps promoter. *Molecular microbiology*, 68(6), pp.1366-1377.

Gusarov, I. and Nudler, E. (1999) 'The Mechanism of Intrinsic Transcription Termination', *Molecular Cell*, 3(4), pp. 495–504.

\*Helmann, J.D. (1999) 'Anti- $\sigma$  factors', *Current Opinion in Microbiology*, pp.135-141.

Hiasa, H. and Marians, K.J. (1994) 'Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication.', *Journal of Biological Chemistry*, 269(51), pp. 32655–32659.

Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A. and Bertin, P. (2001), Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Molecular microbiology*, 40(1), pp.20-36.

\*Champoux, J.J. (2001) 'DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism', *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), pp. 369–413.

Cheung, K.J. *et al.* (2003) 'A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*', *Genome research*, 13(2), pp. 206–215.

\*Ishihama, A. (1992) 'Role of the RNA polymerase  $\alpha$  subunit in transcription activation', *Molecular Microbiology*, 6(22), pp. 3283–3288.

Juang, Y.-L., Helmann, J. D. (1994a) 'The  $\delta$  Subunit of *Bacillus subtilis* RNA Polymerase: An Allosteric Effector of the Initiation and Core-recycling Phases of Transcription', *Journal of Molecular Biology*, 231 (1), pp. 1-14.

Juang, Y.-L., Helmann, J. D. (1994b) 'A Promoter Melting Region in the Primary  $\sigma$  Factor of *Bacillus subtilis*: Identification of Functionally Important Aromatic Amino Acids', *Journal of Molecular Biology*, 235 (5), pp. 1470-1488.

Kahramanoglou, C. *et al.* (2011) 'Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*', *Nucleic Acids Research*, 39(6), pp. 2073–2091.

Keller *et al.* (2014) ' $\epsilon$ , a New Subunit of RNA Polymerase Found in Gram-Positive Bacteria', *Journal of Bacteriology*, 196(20), pp. 3622–3632.

Kotlajich, M.V. *et al.* (2015) 'Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria', *eLife*, 4, p. e04970.

Krásný, L. and Gourse, R.L. (2004) 'An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation', *The EMBO Journal*, 23(22), pp. 4473–4483.

Krásný, L. *et al.* (2008) 'The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*', *Molecular Microbiology*, 69(1), pp. 42–54.

Kriel, A. *et al.* (2012) 'Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)ppGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance', *Molecular Cell*, 48(2), pp. 231–241.

Kryptou, E. *et al.* (2023) 'Bacteria require phase separation for fitness in the mammalian gut', *Science*, 379(6637), pp. 1149–1156.

Le, T.B. and Laub, M.T. (2016) 'Transcription rate and transcript length drive formation of chromosomal interaction domain boundaries', *The EMBO Journal*, 35(14), pp. 1582–1595.



- Lee, Y.-J. *et al.* (2006) 'An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage and its repair', *Carcinogenesis*, 27(3), pp. 446–453.
- López-García, P. and Forterre, P. (2000) 'DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles', *Bioessays*, 22(8), pp. 738–746.
- Lowery-Goldhammer, C. and Richardson, J.P. (1974) 'An RNA-Dependent Nucleoside Triphosphate Phosphohydrolase (ATPase) Associated with Rho Termination Factor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(5), pp. 2003–2007.
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T. Ó., Hinton, J. C., & Dorman, C. J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology*, 59(6), pp.1831-1847.
- Marians, K.J., Minden, J.S. and Parada, C. (1986) 'Replication of Superhelical DNAs in Vitro', in W.E. Cohn and K. Moldave (eds) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 111–140.
- Martinez, A. and Kolter, R. (1997) 'Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps', *Journal of Bacteriology*, 179(16), pp. 5188–5194.
- Martínez-Antonio, A. and Collado-Vides, J. (2003) 'Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria', *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), pp. 482–489.
- Maxwell, A. and Gellert, M. (1986) 'Mechanistic Aspects of DNA Topoisomerases', in C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, and F.M. Richards (eds) *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, pp. 69–107.
- Menzel, R. and Gellert, M. (1987) 'Fusions of the *Escherichia coli* gyrA and gyrB control regions to the galactokinase gene are inducible by coumermycin treatment', *Journal of bacteriology*, 169(3), pp. 1272–1278.
- Miller, H. I., & Friedman, D. I. (1980). An *E. coli* gene product required for  $\lambda$  site-specific recombination. *Cell*, 20(3), pp.711-719.
- Minakhin, L. *et al.* (2001) 'Bacterial RNA polymerase subunit  $\omega$  and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly', *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(3).
- Mitsui, Y. *et al.* (1970) 'Physical and Enzymatic Studies on Poly d(I–C).Poly d(I–C), an Unusual Double-helical DNA', *Nature*, 228(5277), pp. 1166–1169.
- \*Molodtsov, V. *et al.* (2023) 'Structural basis of Rho-dependent transcription termination', *Nature*, 614(7947), pp. 367–374
- Mukherjee, K. and Chatterji, D. (1997) 'Studies on the  $\omega$  Subunit of *Escherichia Coli* RNA Polymerase: Its Role in the Recovery of Denatured Enzyme Activity', *European Journal of Biochemistry*, 247(3), pp. 884–889.
- Murakami, K.S. *et al.* (2002) 'Structural Basis of Transcription Initiation: An RNA Polymerase Holoenzyme-DNA Complex', *Science*, 296(5571), pp. 1285–1290.
- Murray, H.D., Schneider, D.A. and Gourse, R.L. (2003) 'Control of rRNA Expression by Small Molecules Is Dynamic and Nonredundant', *Molecular Cell*, 12(1), pp. 125–134.

- \*Mustaev, A., Roberts, J. and Gottesman, M. (2017) 'Transcription elongation', *Transcription*, 8(3), pp. 150–161. Available at: <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1289294>.
- Myagmarjav, B.-E. *et al.* (2016) 'ZpdN, a Plasmid-Encoded Sigma Factor Homolog, Induces pBS32-Dependent Cell Death in *Bacillus subtilis*', *Journal of Bacteriology*. Edited by P. De Boer, 198(21), pp. 2975–2984.
- Natori, Y. *et al.* (2009) 'Transcription activity of individual *rrn* operons in *Bacillus subtilis* mutants deficient in (p) ppGpp synthetase genes, *relA*, *yjbM*, and *ywaC*', *Journal of bacteriology*, 191(14), pp. 4555–4561.
- Navarre, W.W. *et al.* (2007) 'Silencing of xenogeneic DNA by H-NS—facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA', *Genes & Development*, 21(12), pp. 1456–1471.
- Nudler, E. (2012) 'RNA polymerase backtracking in gene regulation and genome instability', *Cell*, 149(7), pp. 1438–1445.
- \*Paget, M. (2015) 'Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution', *Biomolecules*, 5(3), pp. 1245–1265.
- \*Paget, M.S., Helmann, J.D. (2003) 'The  $\sigma 70$  family of  $\sigma$  factors', *Genome Biol* 4, 203
- Parekh, B.S. and Hatfield, G.W. (1996) 'Transcriptional activation by protein-induced DNA bending: evidence for a DNA structural transmission model.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), pp. 1173–1177.
- Paul, B.J. *et al.* (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), pp. 311–322
- Perez-Rueda, E. (2000) 'The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12', *Nucleic Acids Research*, 28(8), pp. 1838–1847.
- Peter, B.J. *et al.* (2004) 'Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*', *Genome Biology*, 5(11), p. R87.
- Rabatinová A. *et al.* (2013) 'The  $\delta$  Subunit of RNA Polymerase Is Required for Rapid Changes in Gene Expression and Competitive Fitness of the Cell', *Journal of Bacteriology*, 195(11), pp. 2603–2611.
- \*Ravichandran, S., Subramani, V.K. and Kim, K.K. (2019) 'Z-DNA in the genome: from structure to disease', *Biophysical Reviews*, 11(3), pp. 383–387.
- \*Ray-Soni, A., Bellecourt, M.J. and Landick, R. (2016) 'Mechanisms of Bacterial Transcription Termination: All Good Things Must End', *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), pp. 319–347.
- Reece, R.J. and Maxwell, A. (1991) 'DNA gyrase: structure and function', *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 26(3–4), pp. 335–375.
- Rice, P.A. *et al.* (1996) 'Crystal Structure of an IHF-DNA Complex: A Protein-Induced DNA U-Turn', *Cell*, 87(7), pp. 1295–1306.

- \*Saecker, R.M., Record, M.T. and deHaseth, P.L. (2011) 'Mechanism of Bacterial Transcription Initiation: RNA Polymerase - Promoter Binding, Isomerization to Initiation-Competent Open Complexes, and Initiation of RNA Synthesis', *Journal of Molecular Biology*, 412(5), pp. 754–771.
- \*Samuels, D.S. (2011) 'Gene regulation in *Borrelia burgdorferi*', *Annual review of microbiology*, 65, pp. 479–499.
- Shin, M., Lagda, A. C., Lee, J. W., Bhat, A., Rhee, J. H., Kim, J. S., ... & Choy, H. E. (2012). Gene silencing by H-NS from distal DNA site. *Molecular microbiology*, 86(3), pp.707-719.
- Schneider, R. (2001) 'An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA', *Nucleic Acids Research*, 29(24), pp. 5107–5114.
- Schneider, R., Travers, A. and Muskhelishvili, G. (1997), FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 26: pp.519-530.
- \*Schvartzman, J.B. and Stasiak, A. (2004) 'A topological view of the replicon', *EMBO reports*, 5(3), pp. 256–261.
- Sorenson, M.K., Ray, S.S. and Darst, S.A. (2004) 'Crystal Structure of the Flagellar  $\sigma$ /Anti-  $\sigma$  Complex  $\sigma$ 28/FlgM Reveals an Intact', *Molecular Cell*, 14, pp. 127–138.
- Stella, S., Cascio, D. and Johnson, R.C. (2010) 'The shape of the DNA minor groove directs binding by the DNA-bending protein Fis', *Genes & Development*, 24(8), pp. 814–826.
- Stonehouse, E. *et al.* (2008) 'Integration Host Factor Positively Regulates Virulence Gene Expression in *Vibrio cholerae*', *Journal of Bacteriology*, 190(13), pp. 4736–4748.
- Sudzinová, P. *et al.* (2021) 'Effects of DNA Topology on Transcription from rRNA Promoters in *Bacillus subtilis*', *Microorganisms*, 9(1), p. 87.
- Tse-Dinh, Y.-C. and Beran, R.K. (1988) 'Multiple promoters for transcription of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling', *Journal of molecular biology*, 202(4), pp. 735–742.
- Van Ulsen, P. *et al.* (1996) 'Integration host factor alleviates the H-NS-mediated repression of the early promoter of bacteriophage Mu', *Molecular Microbiology*, 21(3), pp. 567–578.
- Vassilyev, D.G. *et al.* (2007) 'Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase', *Nature*, 448(7150), pp. 157–162.
- Vologodskii, A.V. and Cozzarelli, N.R. (1994) 'Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA', *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23(1), pp. 609–643.
- Wang, J.C. (1971) 'Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein  $\omega$ ', *Journal of Molecular Biology*, 55(3), pp. 523-IN16.
- \*Wang, J.C. (1986) 'Circular DNA', in J.A. Semlyen (ed.) *Cyclic Polymers*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 225–260.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. (1953) 'Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid', *Nature*, 171(4356), pp. 737–738.

Yan, Y. *et al.* (2018) 'Protein-mediated loops in supercoiled DNA create large topological domains', *Nucleic Acids Research*, 46(9), pp. 4417–4424.

Zaychikov, E. *et al.* (1996) 'Mapping of Catalytic Residues in the RNA Polymerase Active Center', *Science, New Series*, 273(5271), pp. 107–109.

Zechiedrich, E.L. and Cozzarelli, N.R. (1995) 'Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*.', *Genes & development*, 9(22), pp. 2859–2869.

Zechiedrich, E.L. *et al.* (2000) 'Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), pp. 8103–8113.

Zhang, G. *et al.* (1999) 'Crystal Structure of *Thermus aquaticus* Core RNA Polymerase at 3.3 Å Resolution', *Cell*, pp. 811–824.