

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

Studijní program: Mikrobiologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Mgr. Jan Blumenstein**

**Překryvy regulonů stresových sigma faktorů RNA polymerázy korynebakterií  
a rhodokoků**

Overlaps of regulons of stress sigma factors of RNA polymerase in corynebacteria  
and rhodococci

Disertační práce

Vedoucí práce:  
Ing. Miroslav Pátek, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

V Praze, 17. 3. 2024

Podpis: .....

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat především svému školiteli Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. za jeho čas, podporu, užitečné rady a vstřícný přístup při mém vypracovávání této disertační práce.

Dále bych chtěl poděkovat všem členům *Laboratoře modulace genové exprese* MBÚ AV ČR, v.v.i. za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za veškerou podporu po celou dobu mého studia.

Práce byla vypracována v Laboratoři modulace genové exprese Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. v období 2019-2024 za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekty GAUK 452120 a 338321), Grantové agentury České republiky (projekt 18-13254S) a Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. (projekt RVO61388971).

# Podíl autora na publikační činnosti

**Blumenstein, J.**, Rädisch, R., Štěpánek, V., Grulich, M., Dostálová, H., Pátek, M., 2022. Identification of *Rhodococcus erythropolis* promoters controlled by alternative sigma factors using *in vivo* and *in vitro* systems and heterologous RNA polymerase. *Curr. Microbiol.* 79, 55.

Blumenstein J., podíl na publikaci: 80 % (plán experimentů, klonování, analýza aktivity promotorů, bioinformatika, editace manuskriptu)

Štěpánek, V., Dostálová, H., Busche, T., **Blumenstein, J.**, Grulich, M., Plašil, L., Rucká, L., Nešvera, J., Pátek, M., 2022. Sigma regulatory network in *Rhodococcus erythropolis* CCM2595. *FEMS Microbiol. Lett.* 369, 1-10.

Blumenstein J., podíl na publikaci: 35 % (klonování, analýza aktivity promotorů, bioinformatika)

# Abstrakt

Bakterie rodu *Rhodococcus* a *Corynebacterium* jsou biotechnologicky významné mikroorganismy. Práce se zabývá analýzou funkcí sigma ( $\sigma$ ) faktorů RNA polymerázy při regulaci exprese genů u těchto bakterií. V genomu *C. glutamicum* se nachází 7 genů kódujících faktory:  $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ,  $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ . S výjimkou faktoru  $\sigma^M$  byly tyto faktory a jejich funkce dobře popsány. Genom *R. erythropolis* kóduje 21 předpokládaných genů pro  $\sigma$  faktory, ale žádný nebyl doposud hlouběji studován. To platí i pro příbuznou, také biotechnologicky významnou, bakterii *R. opacus*. Skupina genů, jejíž exprese je zprostředkována jedním  $\sigma$  faktorem, se nazývá  $\sigma$  regulon. Překryvy  $\sigma$  regulonů jsou dány hlavně překryvem rekogniční specifity  $\sigma$  faktorů, kdy dva nebo více  $\sigma$  faktorů rozpoznává stejný promotor. Tato práce byla zaměřena na  $\sigma$  faktory skupiny 4 (též ECF) a jejich regulony:  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  (*C. glutamicum*, *R. erythropolis*, *R. opacus*) a  $\sigma^M$  (*C. glutamicum*).

K dosažení cílů byly využity metody sekvenování RNA, *in vivo* (dvouplazmidové systémy v *C. glutamicum*), *in vitro* (transkripce *in vitro*) a *in silico* (homologní modelování a simulace molekulární dynamiky). Překryv  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$ -regulonů *C. glutamicum* byl demonstrován na přirozeném hybridním promotoru *Pcg0441*. Kombinací *in vivo* a *in silico* metod se podařilo nalézt interakce zodpovědné za rozpoznání oblasti -35 *Pcg0441* faktorem  $\sigma^D$ . Cílenou mutagenezí oblasti -35 (GGGAACC) a -10 (GTCAAA)  $\sigma^M/\sigma^H$ -dependentního promotoru *Pcg0668* jsme vytvořili mutantní varianty analyzované pomocí *in vivo* a *in silico* metod. Nalezli jsme důvod překryvu rekogniční specifity faktorů  $\sigma^H/\sigma^M$  pro promotor *Pcg0668* ( $Y^{101}$  faktoru  $\sigma^H$ -G<sub>21</sub> promotoru, robustnost faktoru  $\sigma^H$  v blízkosti aktivního centra RNA polymerázy). S využitím metod *in vivo* a *in vitro* se nám podařilo stanovit konsenzuální sekvence  $\sigma^D$ -dependentních promotorů (GTAAC pro -35 a GAT pro -10 oblast),  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -dependentních promotorů (GGAA<sup>A</sup>/<sub>T</sub> pro -35 a GTT pro -10 oblast) *R. erythropolis* a *R. opacus*. Byla charakterizována funkce  $\sigma^D$  (integrita buněčné stěny, odpověď na přítomnost sloučenin telluru) a  $\sigma^H/\sigma^E$  (odpověď na oxidativní a teplotní stres a na toxické působení sloučenin telluru) rhodokoků. Byl prokázán a popsán překryv  $\sigma^H/\sigma^E$ -regulonů u *R. erythropolis*. U *C. glutamicum* a částečně i u *R. erythropolis* a *R. opacus* byla popsána vysoce integrovaná regulační síť řízená  $\sigma$  faktory.

Klíčová slova: *Rhodococcus erythropolis*, *Corynebacterium glutamicum*, sigma faktor, promotor, regulon, RNA polymeráza

# Abstract

Bacteria of the genera *Rhodococcus* and *Corynebacterium* are biotechnologically important microorganisms. This dissertation thesis focuses on the role of sigma ( $\sigma$ ) factors of RNA polymerase in the regulation of gene expression in these bacteria. The *C. glutamicum* genome harbors 7 genes encoding  $\sigma$  factors, namely  $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ,  $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  and  $\sigma^M$ . With the exception of  $\sigma^M$ , these factors and their functions have been well described. The *R. erythropolis* genome encodes 21 putative genes for  $\sigma$  factors, but none of them has been analyzed in detail. The same holds for another biotechnologically useful bacterium, *R. opacus*. A group of genes whose expression is mediated by a single  $\sigma$  factor is called  $\sigma$  regulon. Overlaps of  $\sigma$  regulons are mainly caused by overlaps of recognition specificity of  $\sigma$  factors, i.e. when two or more  $\sigma$  factors recognize the same promoter. This thesis is focused on  $\sigma$  factors of group 4 (ECF) and their regulons:  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  (*C. glutamicum*, *R. erythropolis*, *R. opacus*) and  $\sigma^M$  (*C. glutamicum*).

We used RNA-sequencing, *in vivo*, *in vitro* and *in silico* methods (homology modeling and molecular dynamics simulations) to achieve the intended aims. The overlap of  $\sigma^D$  and  $\sigma^H$  regulons was demonstrated in the natural hybrid promoter *Pcg0441*. Using the combination of *in vivo* and *in silico* methods, we were able to find interactions with  $\sigma^D$  responsible for the recognition of -35 region of *Pcg0441*. We created mutant variants of  $\sigma^M/\sigma^H$ -dependent promoter *Pcg0668* by site-directed mutagenesis of -35 (GGGAACC) and -10 (GTCAAA) region. We found the cause of the recognition specificity overlap of  $\sigma^M/\sigma^H$  factors for the *Pcg0668* promoter ( $Y^{101}$  of the  $\sigma^H$ -G<sub>-21</sub> promoter, robustness of the  $\sigma^H$  factor near the RNA polymerase active site). Using *in vivo* and *in vitro* methods we managed to determine the consensus sequences of  $\sigma^D$ -dependent promoters (GTAAC for -35 region and GAT for -10 region),  $\sigma^E$ - and  $\sigma^H$ -dependent promoters (GGAA<sup>A/T</sup> for -35 region and GTT for -10 region) of *R. erythropolis* and *R. opacus*. The functions of  $\sigma^D$  (cell wall integrity, response to the presence of tellurium compounds) and  $\sigma^H/\sigma^E$  (oxidative stress response, response to the presence of tellurium compounds) were characterized. An overlap of  $\sigma^H/\sigma^E$ -regulons of *R. erythropolis* was demonstrated and described. The highly integrated regulatory network controlled by  $\sigma$  factors has been described in *C. glutamicum* and partially also in *R. erythropolis* and *R. opacus*.

Key words: *Rhodococcus erythropolis*, *Corynebacterium glutamicum*, sigma factor, promoter, regulon, RNA polymerase

# Seznam zkratek

A – adenin

AA – aminokyselina

AcnR – represor exprese genu pro akonitázu

anti- $\sigma$  – anti sigma faktor

APS – peroxodisíran amonný

AraC – arabinózový regulátor C

ArsR (*Arsenical resistance operon repressor*) – represor operonu rezistence k arsenu

AT páry – páry adeninu a thyminu

ATP – adenosintrifosfát

AU (*arbitrary unit*) – bezrozměrná arbitrární jednotka

bEBP (*bacterial enhancer binding protein*) – protein vážící se na enhancer

bp (*base pair*) – pár bází

BSA (*bovine serum albumin*) – hovězí sérový albumin

BSM (*Basal Salt Medium*) – minimální médium pro kultivaci *Rhodococcus erythropolis*

C – cytosin

ClgR – regulátor exprese genů pro Clp

Clp – Crp-like protein

ClpXP – Crp-like protein XP

cryoEM – kryoelektronová mikroskopie

CseA (*cold shock protein A*) – protein uplatňující se při chladovém šoku A

CTP – cytidintrifosfát

ddH<sub>2</sub>O – destilovaná a deionizovaná voda

DEPC – diethylpyrokarbonát

dH<sub>2</sub>O – destilovaná voda

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxynukleosidtrifosfát

Dps (*DNA protection proteins*) – proteiny chránící DNA

dsDNA – dvouřetězcová DNA

DTT – dithiotreitol

ECF (*extracytoplasmatic factor*) –  $\sigma$  faktor s extracytoplasmatickou funkcí

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová

EPS (*extracellular polymeric substances*) – extracelulární polysacharidy

FlgM (*flagellar synthesis modulator*) – modulátor syntézy bičíku

FtsK (*Filamenting temperature-sensitive mutant K*) – protein procesu buněčného dělení K

G – guanin

GC pár – pár bohatý na guanin a cytosin  
GFP (*green fluorescent protein*) – zelený fluorescenční protein  
GNAT (*Gcn5-related N-acetyltransferase*) – N-acetyltransferáza příbuzná Gcn5  
GRAS (*generally recognised as a safe*) – obecně považován za bezpečný  
GTP – guanosintrifosfát  
HSP (*heat shock protein*) – protein teplotního šoku (chaperon)  
ChrR (*chromosome condensation regulator*) – regulátor kondenzace chromozomu  
IHF (*integration host factor*) – integrační hostitelský faktor  
IP – indukční poměr (poměr aktivity promotoru v indukovaném/neindukovaném stavu)  
IPTG – izopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid  
IS – inzerční sekvence  
kbp – tisíc párů bází  
kDa – tisíc daltonů  
*lpd* – gen pro dihydrolipoamid dehydrogenázu  
MAP – komplex mykolových kyselin, arabinogalaktanu a peptidoglykanu  
Mbp – milion párů bází  
MD – molekulární dynamika  
MPT70 (*mycobacterial protein target 70*) – antigen mykobakteriální protein 70  
MPT83 (*mycobacterial protein target 83*) – antigen mykobakteriální protein 83  
Mw (*molecularr weight*) – molekulová hmotnost  
N – pozice pro jakýkoliv nukleotid v sekvenci nukleové kyseliny  
NADP – nikotinamidadeninnukleotid fosfát  
NCR (*non-conserved region*) – nekonzervovaná oblast  
nt – nukleotid  
OD<sub>600</sub> – optická denzita při vlnové délce 600 nm  
OM (*outer membrane*) – vnější membrána  
OmpR (*outer membrane protein regulator*) – regulátor exprese genů pro OM  
PBS (*phosphate buffered saline*) – fosfátový pufr  
PCB – polychlorované bifenyly  
PCR (*polymerase chain reaction*) – polymerázová řetězová reakce  
PMSF – fenylmetylsulfonyl fluorid  
PPOX – protoporfyrinogen oxidáza  
R – adenin/guanin  
RNA – ribonukleová kyselina  
RNAP – RNA polymeráza  
ROSE (*run-off transcription (RNA sequencing)*) – RNA sekvenování *in vitro* transkriptů  
rRNA – ribosomální RNA



SDS – dodecylsírán sodný

sRNA – malá nekódující RNA

T – thymin

TBE – pufr obsahující Tris, borát a EDTU

TetR – represor genů pro rezistenci k tetracyklinu

Tris – tris-hydroxymetylaminoetan

TSS (*transcription start site*) – transkripční start

tRNA – transferová RNA

UP (*upstream promoter element*) – element nacházející se v upstream oblasti promotoru

UTP – uridintrifosfát

*uvrD3 (UV resistance D3)* – gen kódující UvrD3 helikázu

VBNC (*viable but non-culturable state*) – živé, ale nekultivovatelné buňky

W – adenin/thymin

x g – násobek tíhového zrychlení

Y – cytosin/thymin

YT (*yeast trypton*) – médium obsahující kvasničný extrakt a trypton

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární přehled</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Mycolata</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2 Rod <i>Corynebacterium</i></b> .....	<b>4</b>
3.2.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	4
3.2.1.1 Genom <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	5
3.2.1.2 Využití kmenů <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	6
3.2.1.3 Transkripční regulace <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	7
<b>3.3 Rod <i>Rhodococcus</i></b> .....	<b>8</b>
3.3.1 Antistresový a biotechnologický potenciál rhodokoků .....	8
3.3.2 Transkripční regulace bakterií rodu <i>Rhodococcus</i> .....	10
<b>3.4 Bakteriální RNA polymeráza</b> .....	<b>11</b>
<b>3.5 Bakteriální promotor</b> .....	<b>12</b>
<b>3.6 Sigma (<math>\sigma</math>) faktory</b> .....	<b>13</b>
3.6.1 Rodina $\sigma^{70}$ .....	13
3.6.2 Rodina $\sigma^{54}$ .....	14
3.6.3 Anti- $\sigma$ faktory.....	14
3.6.4 $\sigma$ faktory u <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	15
3.6.4.1 $\sigma^A$ .....	15
3.6.4.2 $\sigma^B$ .....	16
3.6.4.3 $\sigma^C$ .....	16
3.6.4.4 $\sigma^D$ .....	16
3.6.4.5 $\sigma^E$ .....	17
3.6.4.6 $\sigma^H$ .....	17
3.6.4.7 $\sigma^M$ .....	18
3.6.5 $\sigma$ faktory rodu <i>Rhodococcus</i> .....	18
<b>3.7 Překryvy <math>\sigma</math> regulonů u bakterií</b> .....	<b>19</b>
<b>4 Materiál a metody</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Bakteriální kmeny</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2 Pufry a kultivační média</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3 Plazmidy</b> .....	<b>23</b>
4.3.1 pEPR1 .....	23
4.3.2 pEC-XT99A .....	24

4.3.3 pRLG770.....	25
<b>4.4 Syntetické oligonukleotidy.....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 DNA markery.....</b>	<b>29</b>
<b>4.6 Chemikálie.....</b>	<b>29</b>
<b>4.7 Komerční soupravy.....</b>	<b>31</b>
<b>4.8 Přístrojové vybavení.....</b>	<b>31</b>
<b>4.9 Software.....</b>	<b>32</b>
<b>4.10 Metody.....</b>	<b>32</b>
4.10.1 Elektroforéza DNA v agarózových gelech.....	32
4.10.2 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu.....	33
4.10.3 Miniizolace plazmidové DNA.....	33
4.10.4 Příprava plazmidu na sekvenování.....	34
4.10.5 PCR z bakteriální kolonie.....	34
4.10.6 Amplifikace strukturního genu pomocí PCR.....	35
4.10.7 Asociace syntetických komplementárních oligonukleotidů.....	36
4.10.8 Štěpení DNA restričními endonukleázami.....	37
4.10.9 Přečištění lineární DNA pomocí komerční soupravy.....	37
4.10.10 Ligace DNA.....	37
4.10.11 Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10.....	38
4.10.12 Transformace <i>E. coli</i> (Hanahan, 1983).....	38
4.10.13 Cílená mutageneze pomocí PCR.....	38
4.10.14 Příprava kompetentních buněk <i>C. glutamicum</i> .....	40
4.10.15 Transformace <i>C. glutamicum</i> pomocí elektroporace.....	40
4.10.16 Měření fluorescence v bezbuněčném extraktu <i>C. glutamicum</i> .....	41
4.10.17 Transkripční reakce <i>in vitro</i> .....	43
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Překryvy stresových <math>\sigma</math> regulonů u <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>46</b>
5.1.1 Překryvy regulonů faktorů $\sigma^D$ a $\sigma^H$ u <i>C. glutamicum</i> .....	46
5.1.1.1 Mutantní varianty faktoru $\sigma^H$ <i>C. glutamicum</i> .....	47
5.1.1.1.1 $\sigma^H$ _4AA.....	48
5.1.1.1.2 $\sigma^H$ _4AA + K.....	49
5.1.1.1.3 $\sigma^H$ _6AA.....	49
5.1.1.1.4 $\sigma^H$ _6AA + K.....	49
5.1.1.2 Měření aktivity promotorů <i>in vivo</i> ve dvouplazmidovém systému <i>C. glutamicum</i> .....	49
5.1.1.3 Homologní modelování a simulace interakce mezi promotorem a faktory $\sigma^D$ a $\sigma^H$ u <i>C. glutamicum</i> pomocí molekulární dynamiky ..	53

5.1.1.3.1 Nukleotidy uplatňující se v interakci mezi doménou $\sigma_4$ a promotorem.....	53
5.1.1.3.2 Aminokyseliny domény $\sigma_4$ odpovídající za interakci s promotorem.....	55
5.1.1.3.3 Stabilita komplexu domény $\sigma_4$ faktoru $\sigma^H$ -promotor v MD simulacích.....	58
5.1.1.3.4 Stabilita komplexu domény $\sigma_4$ faktoru $\sigma^D$ -promotor v MD simulacích.....	58
5.1.1.3.5 Stabilita komplexu domény $\sigma_4$ mutantních variant faktoru $\sigma^H$ -promotor v MD simulacích.....	59
5.1.1.4 Integrace výsledků experimentálního měření aktivity promotorů <i>in</i> <i>vivo</i> a dat získaných metodami <i>in silico</i> .....	59
5.1.1.4.1 Přirozený hybridní promotor <i>Pcg0441</i> .....	59
5.1.1.4.2 $\sigma^H$ -dependentní promotor <i>PuvrD3</i> .....	61
5.1.1.4.3 $\sigma^D$ -dependentní promotor <i>PrsdA</i> .....	61
5.1.1.4.4 Syntetický hybridní promotor <i>PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub></i> .....	61
5.1.2 Překryvy rekogniční specifity faktorů $\sigma^M$ , $\sigma^E$ , $\sigma^H$ u <i>C. glutamicum</i> .....	62
5.1.2.1 Mutantní varianty promotoru <i>Pcg0668</i> .....	63
5.1.2.2 Tvorba konstruktů pEPR1 nesoucí mutantní varianty promotoru <i>Pcg0668</i> .....	63
5.1.2.3 Měření aktivity mutantních variant promotoru <i>Pcg0668</i> ve dvouplazmidovém systému <i>C. glutamicum</i> .....	64
<b>5.2 Stresové <math>\sigma</math> regulony bakterií rodu <i>Rhodococcus</i>.....</b>	<b>69</b>
5.2.1 Identifikace $\sigma^D$ -dependentních promotorů <i>Rhodococcus erythropolis</i> pomocí heterologního <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> systému .....	69
5.2.1.1 Sledování aktivity promotorů ve dvouplazmidových systémech <i>C. glutamicum</i> .....	70
5.2.1.1.1 Konstrukce plazmidů s potenciálními $\sigma^D$ -dependentními promotory <i>R. erythropolis PfrmB1<sub>R.e.</sub></i> a <i>PfrmB2<sub>R.e.</sub></i> .....	71
5.2.1.1.2 Konstrukce expresních vektorů s geny $\sigma$ faktorů <i>R. erythropolis</i> <i>sigD<sub>R.e.</sub></i> a <i>sigH<sub>R.e.</sub></i> .....	71
5.2.1.1.3 Příprava heterologního dvouplazmidového systému <i>C. glutamicum</i> pro promotory rhodokoků.....	71
5.2.1.1.4 Měření aktivity promotoru <i>PfrmB1<sub>R.e.</sub></i> <i>in vivo</i> .....	72
5.2.1.1.5 Měření aktivity promotoru <i>PfrmB2<sub>R.e.</sub></i> <i>in vivo</i> .....	73
5.2.1.2 Sledování aktivity promotorů pomocí transkripce <i>in vitro</i> .....	74
5.2.1.2.1 Konstrukce plazmidů pro transkripci <i>in vitro</i> nesoucích promotory <i>PfrmB1<sub>R.e.</sub></i> a <i>PfrmB2<sub>R.e.</sub></i> .....	74
5.2.1.2.2 Analýza aktivity promotorů <i>PfrmB1<sub>R.e.</sub></i> a <i>PfrmB2<sub>R.e.</sub></i> pomocí transkripce <i>in vitro</i> .....	75

5.2.2 Regulační síť $\sigma$ faktorů RNA polymerázy <i>R. erythropolis</i> .....	76
5.2.2.1 Konstrukce plazmidů s promotory P1sigB <sub>R.e.</sub> , P1sigD <sub>R.e.</sub> , P1sigE <sub>R.e.</sub> a P2sigH <sub>R.e.</sub> pro měření aktivity <i>in vivo</i> .....	78
5.2.2.2 Konstrukce plazmidů s geny $\sigma$ faktorů sigA <sub>R.e.</sub> , sigB <sub>R.e.</sub> a sigE <sub>R.e.</sub> z <i>R. erythropolis</i> .....	79
5.2.2.3 Konstrukce plazmidů s promotory P1sigB <sub>R.e.</sub> , P1sigD <sub>R.e.</sub> , P1sigE <sub>R.e.</sub> a P2sigH <sub>R.e.</sub> pro <i>in vitro</i> analýzu aktivity promotorů .....	80
5.2.2.4 Měření aktivity promotorů P1sigB <sub>R.e.</sub> , P1sigD <sub>R.e.</sub> , P1sigE <sub>R.e.</sub> a P2sigH <sub>R.e.</sub> v heterologních systémech <i>in vivo</i> .....	80
5.2.2.5 Analýza aktivity promotorů P1sigB <sub>R.e.</sub> , P1sigD <sub>R.e.</sub> , P1sigE <sub>R.e.</sub> a P2sigH <sub>R.e.</sub> pomocí <i>in vitro</i> transkripce .....	81
5.2.3 $\sigma^H$ - (a $\sigma^E$ -) dependentní promotory <i>R. erythropolis</i> .....	82
5.2.3.1 Identifikace $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentních promotorů v přítomnosti nadprodukovaného faktoru $\sigma^H$ .....	83
5.2.3.2 Příprava konstruktů s potenciálními $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentními promotory z <i>R. erythropolis</i> .....	84
5.2.3.3 Měření aktivity potenciálních $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentních promotorů ve dvouplazmidovém systému <i>C. glutamicum</i> .....	84
5.2.4 Analýza překryvu rekogniční specifity faktorů $\sigma^E$ a $\sigma^H$ <i>R. erythropolis</i> .....	86
5.2.4.1 Mutantní varianty promotorů P1sigB <sub>R.e.</sub> a P1RS07285 <sub>R.e.</sub> .....	87
5.2.4.2 Tvorba konstruktů nesoucích mutantní varianty promotorů P1sigB <sub>R.e.</sub> a P1RS07285 <sub>R.e.</sub> .....	88
5.2.4.3 Měření aktivity mutantních variant promotorů P1sigB <sub>R.e.</sub> a P1RS07285 <sub>R.e.</sub> ve dvouplazmidovém systému <i>C. glutamicum</i> .....	89
5.2.5 Stresové $\sigma$ regulony <i>R. opacus</i> PD630 v přítomnosti telluričitanu draselného .....	93
5.2.5.1 Identifikace ECF-dependentních promotorů genů <i>R. opacus</i> PD630 se zvýšenou expresí v přítomnosti telluričitanu draselného .....	93
5.2.5.2 Konstrukce expresních vektorů s geny $\sigma$ faktorů <i>R. opacus</i> .....	94
5.2.5.3 Příprava konstruktů s potenciálními ECF-dependentními promotory z <i>R. opacus</i> .....	95
5.2.5.4 Měření aktivity ECF-dependentních promotorů z <i>R. opacus</i> v <i>C. glutamicum</i> .....	96
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>101</b>
<b>6.1 Překryvy stresových <math>\sigma</math> regulonů u <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>102</b>
6.1.1 Překryvy rekogniční specifity faktorů $\sigma^D$ a $\sigma^H$ .....	102
6.1.2 Překryvy regulonů faktorů $\sigma^M$ , $\sigma^E$ , $\sigma^H$ u <i>C. glutamicum</i> .....	105
<b>6.2 Stresové <math>\sigma</math> regulony bakterií rodu <i>Rhodococcus</i> .....</b>	<b>110</b>
6.2.1 Faktor $\sigma^D$ a jeho regulon u <i>R. erythropolis</i> a <i>R. opacus</i> .....	111
6.2.2 Faktor $\sigma^E$ a jeho regulon u <i>R. erythropolis</i> a <i>R. opacus</i> .....	114

6.2.3 Faktor $\sigma^H$ a jeho regulon u <i>R. erythropolis</i> a <i>R. opacus</i> .....	116
6.2.4 Překryv rekogniční specifity faktorů $\sigma^E$ a $\sigma^H$ <i>R. erythropolis</i> .....	118
<b>6.3 Porovnání transkripčních regulačních sítí řízených <math>\sigma</math> faktory <i>C. glutamicum</i> a <i>R. erythropolis</i> .....</b>	<b>121</b>
<b>6.4 Hierarchie, modularita a integrace stresových regulonů <i>C. glutamicum</i> a <i>R. erythropolis</i> .....</b>	<b>124</b>
<b>7 Souhrn .....</b>	<b>130</b>
<b>8 Seznam citované literatury .....</b>	<b>131</b>

# 1 Úvod

Bakterie rodu *Corynebacterium* a *Rhodococcus* jsou hojně využívány v biotechnologiích. V této práci jsem se zaměřil na druhy *C. glutamicum*, *R. erythropolis* a *R. opacus*. Při biotechnologických procesech, kde jsou využívány (např. při průmyslové produkci prakticky využitelných látek nebo při ekologické degradaci toxických látek), se tyto bakterie často dostávají do stresových situací. To vede ke změně genové exprese, na které se podílí řada transkripčních regulátorů. Důležitými transkripčními regulátory zvláštního typu jsou  $\sigma$  podjednotky (faktory) RNA polymerázy, které se v komplexu s jádrem RNA polymerázy váží do oblasti promotoru a umožňují iniciaci transkripce. Tyto faktory můžeme dle jejich struktury a funkce rozdělit do čtyř skupin. Do skupiny 1 patří  $\sigma$  faktory, které umožňují expresi genů nezbytných pro exponenciální růst (vegetativní, *housekeeping*). Faktory skupiny 2 se uplatňují při stacionární fázi růstu nebo obecně při stresech a jsou často i záložními faktory pro vegetativní geny. Skupina 3 zahrnuje faktory umožňující expresi genů potřebných pro pohyb buňky (biosyntéza bičíku a fimbrií) a další zvláštní funkce. Strukturně nejjednodušší skupina 4 (ECF faktory) je zodpovědná za expresi genů aktivních především během stresové odpovědi. Právě skupině 4 byla věnována pozornost v této práci. ECF faktory a jejich regulony se podařilo charakterizovat u *C. glutamicum*, avšak ne u *R. erythropolis* či *R. opacus*. Předpokládáme, že stejně jako u *C. glutamicum* mají tyto faktory podobné funkce: vliv při odpovědi na povrchový stres ( $\sigma^E$ ), oxidativní stres ( $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ ), teplotní šok ( $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ ) či poškození buněčné stěny ( $\sigma^D$ ).

Skupina genů, jejichž exprese je zajišťována konkrétním  $\sigma$  faktorem, se nazývá  $\sigma$  regulon (též sigmulon). Pokud se rekogniční specifity  $\sigma$  faktorů překrývají, tedy v případě, že různé  $\sigma$  faktory iniciují transkripci ze stejného promotoru, dojde i k překryvu  $\sigma$  regulonů. Tento jev se objevuje zejména u ECF faktorů. U *C. glutamicum* se již prokázal překryv mezi rekogničními specifitami faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ . Dle posledních výsledků však předpokládáme, že k překryvu dochází i u  $\sigma^H$  a dalších  $\sigma$  faktorů, např. ECF faktorů *C. glutamicum*  $\sigma^D$  a  $\sigma^M$ . U zástupců *R. erythropolis* a *R. opacus* předpokládáme přítomnost překryvů regulonů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ .

Tato práce se zabývá analýzou promotorů rozeznávaných různými  $\sigma$  faktory, zařazením genů do  $\sigma$  regulonů, detailní analýzou aktivity promotorů a důvody aktivity promotoru s určitým  $\sigma$  faktorem prokázanými na úrovni molekulární interakce mezi aminokyselinami  $\sigma$  faktorů a konzervovanými nukleotidy v promotorech. Poznatky jsou integrovány do schémat překryvu regulonů a základních regulačních sítí  $\sigma$  faktorů.

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo charakterizovat doposud nepopsané regulony stresových (ECF)  $\sigma$  faktorů RNA polymerázy u vybraných zástupců rodu *Rhodococcus*: *R. erythropolis* a *R. opacus*. Zásadní bylo porovnání výsledků týkajících se těchto rhodokoků s výsledky dříve získanými u příbuzné a lépe prozkoumané bakterie *C. glutamicum*. Důležité bylo zaměřit se především na interpretaci výsledků souvisejících s překryvy stresových regulonů faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ . Zároveň pro finální obraz představy o  $\sigma$  regulonech korynebakterií bylo třeba doplnit chybějící poznatky o překryvech stresových faktorů  $\sigma^D$  a  $\sigma^M$  s ostatními  $\sigma$  faktory.

K dosažení cílů práce bylo využito *in vitro* a *in vivo* metod zavedených v *Laboratoři modulace genové exprese*. K výsledkům dopomohlo i stanovení transkriptomu pomocí RNA sekvenování provedené ve spolupráci s *Laboratoří mikrobiální genomiky a biotechnologií* (Univerzita Bielefeld, Německo).

Dílčí cíle této práce:

1. Analýza překryvů regulonů  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  *C. glutamicum*
2. Studium překryvu faktoru  $\sigma^M$  s ostatními ECF faktory *C. glutamicum*
3. Charakterizace regulonů a rekogničních specifit faktorů  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  *R. erythropolis* a *R. opacus*
4. Porovnání transkripční regulační sítě řízené  $\sigma$  faktory *C. glutamicum* a *R. erythropolis*



# 3 Literární přehled

## 3.1 Mycolata

Mycolata je umělá skupina grampozitivních nesporulujících bakterií zahrnující aktinobakterie, které se vyznačují přítomností mykolových kyselin ve svém buněčném obalu. Do této skupiny patří rody *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* a *Nocardia*. K zájmu o zkoumání této skupiny přispívá i to, že se mezi zástupce řadí druhy patogenní (zejména rod *Mycobacterium*) či biotechnologicky významné (rody *Corynebacterium* a *Rhodococcus*).

Charakteristickým znakem skupiny Mycolata je přítomnost membrány tvořené mykolovými kyselinami (tzv. mykomembrány). Ačkoliv se jedná o grampozitivní bakterie, přítomností další membrány umístěné nad vrstvou peptidoglykanu připomíná jejich struktura buněčného obalu bakterie gramnegativní. Buněčný obal je tvořen složitým komplexem peptidoglykanu, arabinogalaktanu a mykolových kyselin (MAP) (Bayan *et al.*, 2003). Polymer peptidoglykanu korynebakterií obsahuje meso-diaminopimelovou kyselinu a je kovalentně vázán ke struktuře arabinogalaktanu, který je dále esterifikován mykolovými kyselinami. Mykolové kyseliny jsou dlouhé  $\alpha$ -větvené  $\beta$ -hydroxylované mastné kyseliny o délce 20-90 uhlíkových atomů (Bayan *et al.*, 2003). Délka mykolových kyselin se v závislosti na druhu bakterie liší, např. v případě mykobakterií se pohybuje v rozmezí C<sub>60</sub>-C<sub>90</sub>, zatímco u korynebakterií je v rozmezí C<sub>22</sub>-C<sub>36</sub> (Collins *et al.*, 1982). O důležitosti mykolových kyselin u mykobakterií vypovídá i to, že tvoří 30-40 % všech lipidů buňky (Puech *et al.*, 2000) a u patogenních druhů hrají dokonce významnou úlohu i ve virulenci (Daffé and Draper, 1998). Další lipidy podílející se na struktuře buněčného obalu jsou tzv. "volné lipidy", které jsou nekovalentně spojené s MAP. V případě korynebakterií se jedná především o trehalosové mono-/di-mykoláty a fosfolipidy (Bayan *et al.*, 2003). Buněčný obal u bakterií skupiny Mycolata je kvůli přítomnosti mykolových kyselin téměř nepropustný pro hydrofilní látky, což je jeden z důvodů, proč tyto bakterie jsou citlivé pouze na určitá antibiotika (Hui *et al.*, 1977; Jarlier *et al.*, 1991; Jarlier a Nikaido, 1990; Trias a Benz, 1994). Navíc je známo, že po mutaci v genech pro mykolyltransferázy PS1 u *Corynebacterium glutamicum* a pro antigen-85C u *Mycobacterium tuberculosis*, došlo až k 50% úbytku mykolových kyselin a tím zvýšení propustnosti pro glycerol (Jackson *et al.*, 1999; Puech *et al.*, 2000). Vnější povrch mykomembrány tvoří krystalická vrstva S-proteinů, která se nachází i téměř u všech bakterií a archaea (Bahl *et al.*, 1997; Sára a Sleytr, 2000), ale její funkce není dosud zcela objasněna.

## 3.2 Rod *Corynebacterium*

Rod *Corynebacterium* v současnosti zahrnuje 85 druhů podle databáze sekvenovaných kompletních genomů KEGG [[https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_organism?category=Bacteria](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?category=Bacteria)]. Jde o aktinobakterie kyjovitého tvaru, v jejichž genomu je vyšší zastoupení GC párů (52-72,5 %). Genomy těchto bakterií utvářejí kruhové chromosomy střední velikosti (2-3,5 Mbp).

Rod *Corynebacterium* zahrnuje jak patogenní, tak nepatogenní druhy. Nejznámějším patogenem je *C. diphtheriae*, který je zodpovědný za respirační onemocnění záškrt. Napadá hostitelské buňky exotoxinem (difterický toxin) kódovaným genem *tox*. Tento gen je součástí profága, který se do genomu bakterie integroval pomocí místně specifické rekombinace (Sharma *et al.*, 2019). Mechanismus účinku difterického toxinu spočívá v ADP-ribosylaci translačního elongačního faktoru EF-2. Tím dojde k zabránění jeho translokační aktivity, což vede k zastavení proteosyntézy a smrti hostitelské buňky (Holbourn *et al.*, 2006; Honjo *et al.*, 1968). Dalším patogenním druhem je bakterie *C. ulcerans*, která je původcem řady respiračních onemocnění a kožní formy záškrtu (Hacker *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2015). Jiný z patogenů, *C. pseudotuberculosis*, způsobuje záněty mizních uzlin u krav a ovcí (Dorella *et al.*, 2006). S infekcí močových cest je spojován druh *C. aurimucosum* (Lo *et al.*, 2015). Velmi problémovým druhem je lidský kožní patogen *C. jeikeium*, a to především kvůli své rezistenci k velkému množství antibiotik (Tauch *et al.*, 2005). Multirezistence byla popsána rovněž u *C. resistens* (Otsuka *et al.*, 2005) a u poměrně vzácné bakterie *C. urealyticum*, která způsobuje vážná onemocnění urogenitálního traktu (Costales *et al.*, 2019). Další zajímavý patogen *C. amycolatum* je původcem řady kožních onemocnění, zánětů endokardu a vaginálních infekcí (Chen *et al.*, 2015; Knox a Holmes, 2002). Tento druh se od ostatních zástupců rodu *Corynebacterium* liší tím, že neobsahuje ve svém buněčném obalu mykolové kyseliny (Collins *et al.*, 1988).

Bakterie rodu *Corynebacterium* jsou kromě lidských a zvířecích hostitelů schopné obývat např. mořská dna (*C. maris*), solné doly (*C. halotolerans*) a půdu (Ben-Dov *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2004). Zejména půdní bakterie tohoto rodu jsou v popředí zájmu díky svému biotechnologickému potenciálu. Půdní bakterie *C. efficiens* a *C. glutamicum* se mimo jiné uplatňují v průmyslové produkci aminokyselin (Fudou *et al.*, 2002; Nishio *et al.*, 2003).

### 3.2.1 *Corynebacterium glutamicum*

Tato nepatogenní bakterie byla poprvé izolována v roce 1957 a pozornost si získala díky své nadprodukci kyseliny L-glutamové při limitaci biotinem (Kinoshita *et al.*, 1957), čehož se brzy využilo v průmyslovém měřítku. Jelikož se jedná o snadno kultivovatelný

nepatogenní druh, stala se tato aktinobakterie velmi oblíbeným modelem pro studium vlastností bakterií rodu *Corynebacterium*.

Hojně používaný kmen *C. glutamicum* ATCC 13032 (tehdy klasifikován jako *Micrococcus glutamicus*) byl izolován z půdního vzorku v tokijské zoo Ueno (Kinoshita *et al.*, 1957). Bylo zjištěno, že jeho schopnost produkovat kyselinu L-glutamovou stoupá nejen při nedostatku biotinu (Shiio *et al.*, 1962), ale i v přítomnosti detergentu tween a penicilinu (Nunheimer *et al.*, 1970; Takinami *et al.*, 1965). Navíc se podařilo úspěšně vyšlechtit kmeny, které produkovaly další aminokyseliny jako L-lysin či L-threonin. Díky rozvoji metod molekulární biologie a zavedení PCR bylo v 80. a 90. letech vytvořeno množství vektorů a expresních systémů pro produkci heterologních proteinů v *C. glutamicum* (Katsumata *et al.*, 1984; Santamaría *et al.*, 1984). Vývoj transkriptomických metod (DNA mikročipy) a především stanovení kompletní sekvence genomu kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 dále rozšířilo možnosti využití této bakterie v biotechnologiích (Kalinowski *et al.*, 2003), k čemuž dále přispělo zavedení sekvenování RNA a metody editace genomu pomocí CRISPR/cas9 systému (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018).

### 3.2.1.1 Genom *Corynebacterium glutamicum*

Chromosom kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 je kruhový o velikosti cca 3,3 Mbp a jeho obsah GC párů činí 53,8 %. Podle anotace jeho kompletní sekvence z roku 2003 obsahuje 3002 kódujících sekvencí, z toho přibližně 2600 předpokládaných genů kóduje proteiny. Další 60 genů determinuje 42 různých tRNA, zatímco geny pro rRNA jsou transkribovány z 6 operonů (Kalinowski *et al.*, 2003).

Kromě vlastního chromosomu může genom *C. glutamicum* zahrnovat i další genetické elementy, a to např. přirozené plazmidy pTET3 (Tauch *et al.*, 2002) a pGA1 (Nešvera *et al.*, 1997). Plazmid pTET3 je 27,8 kbp velký R-plazmid kódující geny pro rezistenci ke streptomycinu, spektinomycinu a tetracyklinu (Tauch *et al.*, 2002). pGA1 je o poznání menší (4,8 kbp) kryptický plazmid (Nešvera *et al.*, 1997). Stejně jako u většiny dalších bakterií nalezneme u *C. glutamicum* bakteriofágy. Lytické fágy  $\phi 673$  a  $\phi 674$  mají lineární dsDNA o velikosti 44 kbp a Cos-sekvence fága  $\phi 674$  se využívají při konstrukci kosmidů pro *C. glutamicum* (Yomantas *et al.*, 2018). Dalšími lineárními dsDNA fágy infikujícími *C. glutamicum* jsou BFK20 (Koptides *et al.*, 1992), P1201 (Chen *et al.*, 2008),  $\phi 16$  (Lobanova *et al.*, 2017) či CL31 (Hünnefeld *et al.*, 2021). Kromě plazmidů a bakteriofágů byly v genomu *C. glutamicum* rovněž nalezeny IS elementy, jejichž inserce však obvykle nemají vliv na funkci genů *C. glutamicum*. Výjimkou jsou pouze 2 IS sekvence a to ISCg13, která se vkládá do genu kódujícího sarkosinoxidázu, a ISCg1, která svou insercí inaktivuje gen kódující chaperon GroEL (Kalinowski *et al.*, 2003).

### 3.2.1.2 Využití kmenů *Corynebacterium glutamicum*

První kmen *C. glutamicum* byl izolován roku 1957 výzkumným týmem společnosti Kyowa Hakko při určování přirozených producentů kyseliny L- glutamové (Kinoshita *et al.*, 1957). Díky snadné kultivaci a růstu do vysokých hustot kultury byl průmyslový potenciál *C. glutamicum* postupně značně rozšířen. Kromě kyseliny L-glutamové začaly být fermentativně produkovány i další aminokyseliny, jako jsou L-lysin (Becker *et al.*, 2011; Nakayama *et al.*, 1966), L-threonin (Eikmanns *et al.*, 1991), L-fenylalanin, L-tyrosin (Ikeda a Katsumata, 1992), L-histidin (Mizukami *et al.*, 1994), L-izoleucin (Kelle *et al.*, 1996), L-tryptofan (Ikeda a Katsumata, 1999), L-cystein (Wada *et al.*, 2002), L-methionin (Park *et al.*, 2007), L-alanin (Jojima *et al.*, 2010), L-prolin (Jensen a Wendisch, 2013), L-valin (Hasegawa *et al.*, 2013), L-arginin (Park *et al.*, 2014), L-leucin (Vogt *et al.*, 2014) či L-serin (Zhu *et al.*, 2015). Kromě L-aminokyselin jsou průmyslové kmeny *C. glutamicum* schopné i fermentativní produkce D-aminokyselin, a to konkrétně D-argininu, D-lysinu, D-ornitinu a D-serinu (Stäbler *et al.*, 2011).

Mezi další významné látky, které jsou průmyslově produkovány kmeny *C. glutamicum*, patří různé alkoholy, a to izobutanol (Yamamoto *et al.*, 2013), etanol (Jojima *et al.*, 2015), 1-propanol či 1,2-propandiol (Siebert a Wendisch, 2015). Kyseliny mléčná (Okino *et al.*, 2008) a pyrohroznová (Wieschalka *et al.*, 2013) jsou také velice oblíbenými produkty průmyslové produkce *C. glutamicum*. Navíc se *C. glutamicum* v posledních letech hojně využívá i k výrobě biopolymerů, např. polyhydroxybutyrátu (Liu *et al.*, 2007), polyhydroxyalkanoátu (Matsumoto *et al.*, 2011) či ektoinu (Becker *et al.*, 2013).

Díky uznání kmenů *C. glutamicum* za bezpečné pro použití v biotechnologiích (*generally recognised as a safe*, GRAS), slabé aktivitě jejich proteáz i restriktivně modifikačních systémů se expresní systémy založené na *C. glutamicum* uplatňují při produkci heterologních proteinů. Mezi takové bakteriální proteiny spadá  $\alpha$ -amyláza z *Bacillus amyloliquefaciens* (Smith *et al.*, 1986), endoglukanáza i exoglukanáza z *Cellulomonas fimi* (Paradis *et al.*, 1987), antigen 85A z *Mycobacterium tuberculosis* (Salim *et al.*, 1997), celulóza ze *Streptomyces halstedii* (Adham *et al.*, 2001), transglutamináza ze *S. mobaraensis* (Date *et al.*, 2003) či endoxylanáza ze *S. coelicolor* (An *et al.*, 2013). V *C. glutamicum* jsou navíc produkovány i eukaryotní proteiny jako ovčí interferon  $\gamma$  (Billman-Jacobe *et al.*, 1994), lidský epidermální růstový faktor (Date *et al.*, 2006) či GFP z medúzy *Aequorea victoria* (Teramoto *et al.*, 2011).

### 3.2.1.3 Transkripční regulace *Corynebacterium glutamicum*

Sekvenací genomu a jeho následnou analýzou bylo u kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 nalezeno 144 genů transkripčních DNA-vazebných regulátorů nebo dvousložkových systémů (podle databáze MiST 4.0). Proteinové transkripční regulátory zahrnují aktivátory, represory, duální regulátory či podjednotky sigma (faktory  $\sigma$ ) RNA polymerázy (RNAP) (Schröder a Tauch, 2010).

Podle struktury klasifikujeme regulační proteiny jednosložkových systémů do rodin. V genomu kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 převládají geny regulátorů z rodiny TetR (celkový počet 16), jak uvádí databáze MiST 4.0. Tyto regulátory jsou běžné ve většině bakteriálních druhů a fungují převážně jako represory transkripce (Ramos *et al.*, 2005). Jedná se o  $\alpha$ -helikální proteiny fungující jako dimery skládající se z DNA-vazebné N-koncové domény a C-koncové domény vázající ligand (Cuthbertson a Nodwell, 2013). Prvním zástupcem, podle kterého nese tato rodina svůj název, je tetracyklinový represor TetR z *E. coli*. V případě, že není v prostředí přítomen tetracyklin, TetR blokuje pomocí svojí N-koncové domény oblast mezi geny *tetR* a *tetA*, čímž znemožňuje jak svoji vlastní expresi, tak i expresi genu pro efluxní tetracyklinovou pumpu. Je-li však tetracyklin přítomen, dojde ke konformační změně TetR za jeho uvolnění z vazebného místa na DNA, což umožní expresi genu *tetA* kódujícího efluxní pumpu, která secernuje tetracyklin ven z buňky (Cuthbertson a Nodwell, 2013). Příkladem represorů z rodiny TetR u *C. glutamicum* jsou AcnR (represor genu pro akonitázu) či McbR (regulátor biosyntézy S-adenosylhomocysteinu) (Krug *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2005).

Druhé nejvíce zastoupené regulátory jednosložkových systémů *C. glutamicum* zahrnuje rodina ArsR (celkem 12 genů podle MiST 4.0). Jedná se převážně o represory, které jsou vázány v oblasti operátoru. Po navázání ligandu (nejčastěji iont arsenu, zinku či antimonu) dochází ke konformační změně represoru, která způsobí jeho uvolnění a spuštění transkripce (Osman a Cavet, 2010). I přes četné zastoupení u *C. glutamicum* je velmi málo takových regulátorů s ujasněným mechanismem a funkcí. Příkladem prozkoumaného regulátoru je ArsR, který řídí expresi genů, jejichž produkty se podílejí na redukci arseničnanů. Tato schopnost buněk *C. glutamicum* se uplatňuje při eliminaci toxicity arsenu, který je v životním prostředí velmi rozšířený (Ordóñez *et al.*, 2005).

Kromě dalších 27 rodin regulátorů jednosložkových systémů jsou u bakterií významně zastoupeny regulační proteiny systémů dvousložkových. Dvousložkové systémy bakterií se zpravidla skládají z membránových kináz a regulátorů odpovědi, které fungují jako transkripční regulátory. V genomu *C. glutamicum* ATCC 13032 je kódováno celkem 13 histidinkináz a 13 regulátorů odpovědi. Popsané dvousložkové systémy se podílejí např. na utilizaci kyseliny citrónové, adaptaci k hladovění na fosfát či homeostázi železa (Bott and Bocker, 2012).

Samostatnou skupinu proteinových transkripčních regulátorů tvoří podjednotky RNAP zvané  $\sigma$  faktory. Těmto faktorům se budu více věnovat v kapitole „ $\sigma$  faktory u *Corynebacterium glutamicum*“.

Kromě proteinových transkripčních regulátorů může být bakteriální transkripce regulována pomocí malých regulačních RNA (sRNA). V genomu *C. glutamicum* ATCC 13032 bylo nalezeno celkem 805 predikovaných genů pro sRNA (Mentz *et al.*, 2013). Nicméně k potvrzení jejich role v konkrétních regulacích genové exprese a signalizačních drahách dosud chybí experimentální data (Parise *et al.*, 2021).

### 3.3 Rod *Rhodococcus*

Bakterie rodu *Rhodococcus* patří stejně jako druhy rodu *Corynebacterium* do skupiny Mycolata a jedná se taktéž o nepohyblivé bakterie kyjovitého tvaru. V současné době zahrnuje tento rod 36 druhů. Osekvenované genomy bohaté na GC (60-70 %) velikostně oscilují v rozmezí 4-11 Mbp (databáze NCBI). Lze je tedy zařadit mezi bakteriální druhy s velkými genomy. Kromě chromosomu jsou součástí genetické informace bakterií rodu *Rhodococcus* také plazmidy, jejichž velikost často čítá stovky kbp.

Tento rod zahrnuje jak patogenní, tak nepatogenní druhy. Do první skupiny patří rostlinný patogen *R. fascians*, který způsobuje závažné poškození výhonků okrasných rostlin projevující se vznikem listových hálek (Pertry *et al.*, 2010). Živočišným patogenem řadícím se do tohoto rodu je *R. equi*, který vyvolává onemocnění respiračního traktu koní a vzácně i respirační onemocnění u imunosuprimovaných osob (Yamshchikov *et al.*, 2010).

Bakterie rodu *Rhodococcus* obývají řadu zcela různorodých a často extrémních ekologických nik, a tak se je podařilo izolovat mimo jiné i ze zamrzlých antarktických půd (Bej *et al.*, 2000), říčních kalů v Německu (Tomás-Gallardo *et al.*, 2012), industriálních zón v Jižní Koreji (Veeranagouda *et al.*, 2009), vysokohorských slaných jezer v Andách (Bequer Urbano *et al.*, 2013), ropných polí v Indii (Aggarwal *et al.*, 2016) či pouští v Saudské Arábii (Röttig *et al.*, 2016). Jedná se tedy o velmi odolné bakterie, u nichž lze modelově studovat odpovědi na řadu stresů.

#### 3.3.1 Antistresový a biotechnologický potenciál rhodokoků

Častým objektem studia biotechnologů a genetiků jsou různé kmeny *R. erythropolis*. Jedná se o nepatogenní bakterii, která je schopná růst v širokém rozmezí teplot (4-37 °C) a odolávat celé řadě stresů. S teplotním šokem se úspěšně vyrovnává změnou složení mastných kyselin v membráně. Přitom se zvyšuje poměr nasycených vůči nenasyceným mastným kyselinám a zároveň snižuje podíl nasycených větvených a cyklopropanových mastných kyselin, což vede k poklesu fluidity membrány (de Carvalho, 2012). Ukázalo se,

že v podmínkách osmotického stresu syntetizuje kmen *R. erythropolis* DSM1069 větvené a polynenasycené mastné kyseliny. Kmen *R. erythropolis* DCL14 je dále schopen přežít ve vysokém rozmezí pH 3-11 (při pH 4 přežilo 72% adaptovaných buněk) a to díky dvěma mechanismům, kterými udržuje rovnováhu pH: a) obnovením protonmotivní síly pomocí redoxních pump v plazmatické membráně; b) zvětšením zastoupení nasycených mastných kyselin v plazmatické membráně (De Carvalho, 2012). Biotechnologický význam *R. erythropolis* spočívá především ve schopnosti degradovat škodlivé látky, jako jsou PCB (Maeda *et al.*, 1995), fenol (Prieto *et al.*, 2002), terpeny (De Carvalho a Da Fonseca, 2005a), alkoholy (De Carvalho a Da Fonseca, 2005b), alkany (De Carvalho, 2012) či různá xenobiotika (Khairy *et al.*, 2016) přímo v místě výskytu a metabolizovat je na méně toxické formy. Zároveň mají kmeny *R. erythropolis* biotechnologické uplatnění jako producenti biosurfaktantů (Luong *et al.*, 2018).

Dalším významným zástupcem rodu je *R. opacus*. Stejně jako *R. erythropolis* je i *R. opacus* mikroorganismem, který je schopen odolávat celé řadě stresů. U kmene *R. opacus* PD630 bylo zjištěno, že zvládá vysychání hromaděním tuků pro syntézu mykolových kyselin, takže jeho buňky přežívají až 400 dní na suchém povrchu, přičemž dochází k tvorbě kompaktních buněčných shluků a extracelulárního slizu, který zadržuje poslední zbytky vody. Adaptace *R. opacus* PD630 na vysychání navíc vede k lepší odolnosti vůči hladovění a osmotickému stresu, což naznačuje, že stresové odpovědi na osmotický stres a vysychání se překrývají. Dostane-li se *R. opacus* do situace, kdy je vystaven osmotickému stresu, spustí produkci EPS (extracelulárních polysacharidů) a kompatibilních osmolytů (ektoin, hydroxyektoin a trehalóza) (Alvarez *et al.*, 2004). Stejně jako *R. erythropolis*, je i tento druh schopen odolávat nízkému pH (4,5), a to tím, že produkuje alkalické sloučeniny, které neutralizují přebytek protonů v okolí (Cappelletti *et al.*, 2016). Biotechnologické využití *R. opacus* spočívá v jeho schopnosti biodegradace organických sloučenin, např. fenolu, 2-chlorofenolu, 4-chlorofenolu (Kolomytseva *et al.*, 2005; Yoneda *et al.*, 2016) či ligninu (Henson *et al.*, 2018). Popsáno bylo i uplatnění *R. opacus* při biokonverzi topolového dřeva v lipidy (Li *et al.*, 2019).

Genom *R. jostii* tvoří chromosom (7,8 Mbp) a 3 velké plazmidy, které zajišťují bakterii katabolickou rozmanitost. U kmene *R. jostii* RHA 1 byla provedena průlomová transkriptomická studie odpovědi na teplotní šok. Bylo zjištěno, že tento kmen je poměrně citlivý na změny kultivačních teplot a při vzrůstu teploty z 30 °C na 35 °C došlo k silnému stresu a poklesu počtu životaschopných buněk. Z globální analýzy transkriptomu vyplynulo, že při teplotě 35 °C bylo 438 genů nadexprimovaných a 114 genů podexprimovaných oproti 30 °C. Je pravděpodobné, že exprese genů byla postupně spouštěna v závislosti na délce stresu, neboť většina genů byla nadexprimována ještě po 3 hodinách od aplikování šoku, tedy krátce před poklesem počtu životaschopných buněk. Nejvíce byly nadexprimovány

geny kódující HSP (*heat shock proteins*), transkripční regulátory a přechodně i různé geny pro enzymy buněčného metabolismu. Nadexprese 64 genů se v průběhu kultivace dokonce zvyšovala. Jednalo se o geny kódující  $\sigma$  faktor  $\sigma^B$ , ATPázy podílející se na buněčném dělení, DNA polymerázu a ligázy. Naopak nižší transkripce byla zaznamenána u genů pro  $\alpha$ -podjednotku RNAP a ribozomální proteiny (Ekpanyaskun, 2006). Transkriptomická analýza byla provedena i po vyvolání osmotického stresu pomocí NaCl, kdy došlo ke zvýšení exprese 91 genů a snížení exprese 106 genů, přičemž mezi geny se zvýšenou expresí patřily geny pro Dps (*DNA protection proteins*), L-ektoinsyntázu, DNA polymerázu IV či katechol-1,2-dioxygenázu. Mezi kompatibilní osmolyty, které buňky *R. jostii* produkovaly během osmotického stresu, patřily ektoin a trehalóza (Ekpanyaskun, 2006). Analyzována byla i stresová odpověď v podmínkách 20% vlhkosti a výsledkem bylo 380 nadexprimovaných a 371 podexprimovaných genů během vysychání. Produkty diferenciatně exprimovaných genů zahrnovaly proteiny zapojené do metabolismu lipidů, modifikace buněčného obalu, buněčného dělení, opravy DNA a chaperony/chaperoniny (LeBlanc *et al.*, 2008). Biotechnologický potenciál *R. jostii* spočívá hlavně ve schopnosti degradovat nitrily (Martínková *et al.*, 2010) a PCB (Takeda *et al.*, 2010) a produkovat lipidy (Li *et al.*, 2019).

### 3.3.2 Transkripční regulace bakterií rodu *Rhodococcus*

V sekvenovaných genomech bakterií rodu *Rhodococcus* nalezneme až 800 genů kódujících DNA vazebné transkripční regulátory. Stejně jako u korynebakterií převažují u tohoto rodu regulátory z rodiny TetR (databáze MiST 4.0). Avšak oproti příbuzné bakterii *C. glutamicum* nejsou téměř vůbec funkce a dráhy jednotlivých regulátorů prozkoumány.

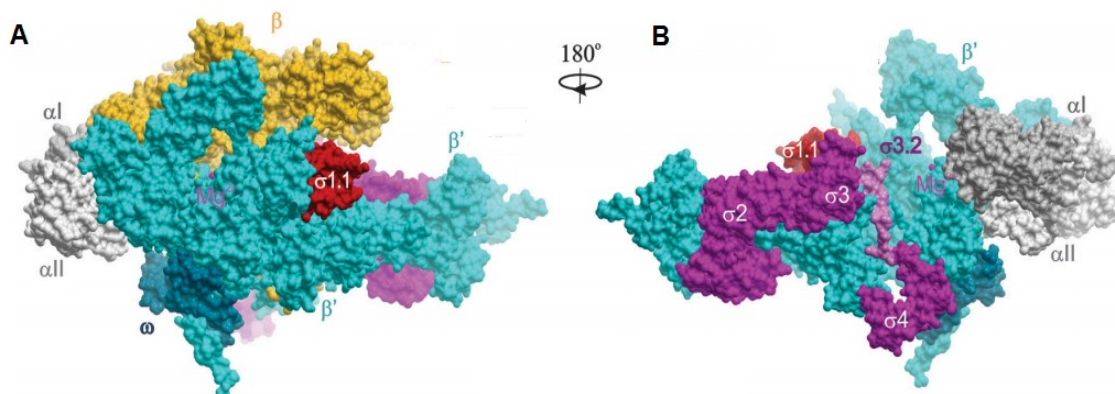
Příkladem dvousložkových systémů regulujících transkripci jsou systémy BphS1-BphT1 a BphS2-BphT2 kmene *R. jostii* RHA1. Geny kódující součásti těchto systémů jsou lokalizovány na lineárních plazmidech pRHL1 a pRHL2. BphS1 a BphS2 jsou histidinkinázy, které předávají signál regulátorům odpovědi BphT1 a BphT2. Ty pak aktivují transkripci genů podílejících se na degradaci bifenyly a PCB. Jsou tedy důležitým nástrojem pro přežití bakterie ve znečištěném prostředí, čímž podtrhují význam *R. jostii* v biodegradčních procesech (Takeda *et al.*, 2010).

Přesto však hlavní význam pro přežití rhodokoků ve stresových situacích mají  $\sigma$  faktory RNAP, jimž se budu dále věnovat v kapitole „ $\sigma$  faktory rodu *Rhodococcus*“.



### 3.4 Bakteriální RNA polymeráza

Bakterie využívají k transkripci podjednotkový enzym RNA polymerázu (RNAP), pro jehož funkčnost je nezbytné katalytické jádro ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ) (Obr. 1A) a podjednotka  $\sigma$  (Obr. 1B). Proteiny jádra, které jsou silně konzervovány u bakterií i archaea, mají celkově molekulovou hmotnost (Mw) cca 370 kDa. Jsou nepostradatelné pro samotnou syntézu RNA.



**Obrázek 1. Struktura bakteriální RNAP.** Na obrázku vlevo (A) jsou znázorněny především podjednotky katalytického jádra RNAP, tedy podjednotky  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  (obě šedou barvou),  $\beta$  (žlutou barvou),  $\beta'$  (světle modrou barvou) a  $\omega$  (tmavě modrou barvou). Zároveň je uprostřed jádra znázorněn fialovou barvou kationt  $Mg^{2+}$ . Na obrázku vpravo (B) je celý holoenzym otočen o  $180^\circ$  kolem vertikální osy, kde po odstranění  $\beta$  podjednotky můžeme vidět navázanou podjednotku  $\sigma$ , tvořenou doménami  $\sigma_{1.1}$  (červená barva),  $\sigma_2$  (fialová barva),  $\sigma_3$  (fialová barva) a  $\sigma_4$  (fialová barva). Převzato (Lee a Borukhov, 2016); upraveno.

Podjednotka  $\alpha$  (Obr. 1A) se vyskytuje ve formě homodimeru a má Mw 36,5 kDa. Skládá se z N-koncové domény (235 aminokyselinových zbytků), která se uplatňuje při sestavení katalytického jádra, čímž umožňuje interakci s podjednotkami  $\beta$  a  $\beta'$ , a C-koncové domény (248-329 aminokyselinových zbytků), která umožňuje interakci s řadou transkripčních aktivátorů (Sutherland a Murakami, 2018). Další funkcí C-koncové domény  $\alpha$  je interakce s UP elementem promotoru (Ross *et al.*, 1993).

Podjednotky  $\beta$  a  $\beta'$  mají Mw 150 a 155 kDa, díky čemuž tvoří 80 % katalytického jádra enzymu (Obr. 1A). Tyto dvě podjednotky spolu s N-koncovou doménou  $\alpha$  dimeru mají tvar krabího klepeta, ve kterém se nachází kanál, kde probíhá syntéza RNA (Zhang *et al.*, 1999). Není proto překvapením, že podjednotky  $\beta$  a  $\beta'$  jsou častým cílem antibiotik, např. rifampicinu (Aristoff *et al.*, 2010).

Funkce nejmenší podjednotky jádra RNAP  $\omega$  (Mw = 10,5 kDa) není doposud objasněna (Obr. 1A). Předpokládá se, že plní funkci chaperonu podjednotky  $\beta'$ , čímž umožňuje efektivnější skládání RNAP (Sutherland a Murakami, 2018).

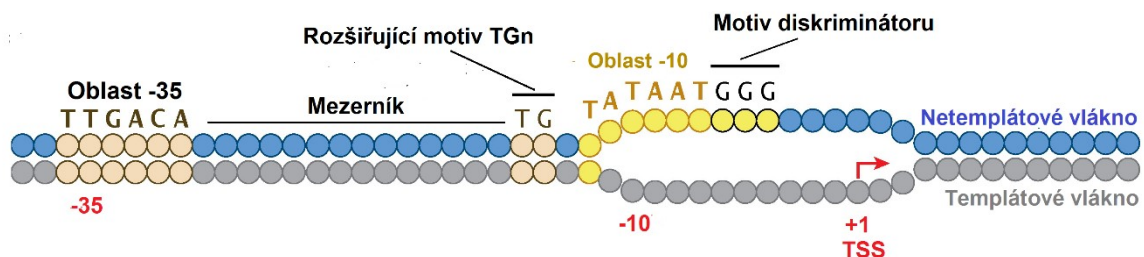
U některých grampozitivních bakterií můžeme nalézt také podjednotky  $\delta$  (Mw = 21,5 kDa) a  $\epsilon$  (Mw = 9 kDa), které však nejsou pro fungování RNAP krucální. Bylo zjištěno, že u patogenních kmenů *Staphylococcus aureus* podjednotka  $\delta$  přímo interaguje

s podjednotkou  $\beta'$ . Zároveň se ukázalo, že hraje roli ve virulenci, neboť kmeny s delecí v genu pro podjednotku  $\delta$  vykazovaly horší schopnost přežití v hostiteli a sníženou expresi virulenčních faktorů (Lin *et al.*, 2021; Weiss *et al.*, 2014). V případě bakterie *Bacillus subtilis* má podjednotka  $\delta$  roli v recyklaci RNAP (Pei *et al.*, 2020). Význam podjednotky  $\varepsilon$  pravděpodobně spočívá v ochraně před bakteriofágovou infekcí (Keller *et al.*, 2014).

### 3.5 Bakteriální promotor

Promotor je oblast DNA, která je signálem k zahájení transkripce. Pro většinu bakteriálních promotorů platí, že obsahuje oblasti -35 a -10 (Obr. 2), které jsou rozpoznány podjednotkou RNAP zvanou  $\sigma$  faktor. Jako modelový příklad se používá promotor vegetativních genů rozpoznávaný faktorem  $\sigma^{70}$  bakterie *E. coli* (Obr. 2). Konsenzuální sekvence pro tyto dvě oblasti je TTGACA (-35) a TATAAT (-10). Díky tomu, že je oblast -10 bohatá na AT páry, dochází zde po rozpoznání  $\sigma$  faktorem k rozplétání dvoušroubovice DNA. Tyto dvě základní promotorové oblasti jsou oddělené mezeríkem (*spacer*) o délce 16-18 nukleotidů. První prepisovaný nukleotid se nachází 6-9 nt po směru transkripce (*downstream*; zde dále "za") od -10 oblasti a je označován jako transkripční start +1 (TSS) (Obr. 2).

Dále jsou součástí promotoru oblasti, kterou nejsou pro jeho fungování nezbytné, avšak mohou ovlivnit sílu promotoru (síla promotoru je dána frekvencí iniciace transkripce). UP element se nachází v pozici -40 až -60 nukleotidů proti směru transkripce (*upstream*; zde dále "před") a díky interakci s C-koncovou doménou  $\alpha$  podjednotky RNAP zvyšuje sílu promotoru (Ross *et al.*, 1993). V pozici nukleotidů -14 a -15 před TSS se také může nacházet rozšiřující motiv TGn (Obr. 2), který interaguje s doménou  $\sigma_3$  podjednotky  $\sigma$  faktoru (Barne *et al.*, 1997). U některých bakteriálních promotorů se mezi oblastí -10 a TSS nachází motiv diskriminátoru (Obr. 2). Jedná se o GC bohatou oblast, která ovlivňuje stabilitu otevřeného komplexu během transkripce (Haugen *et al.*, 2006; Ruff *et al.*, 2015).



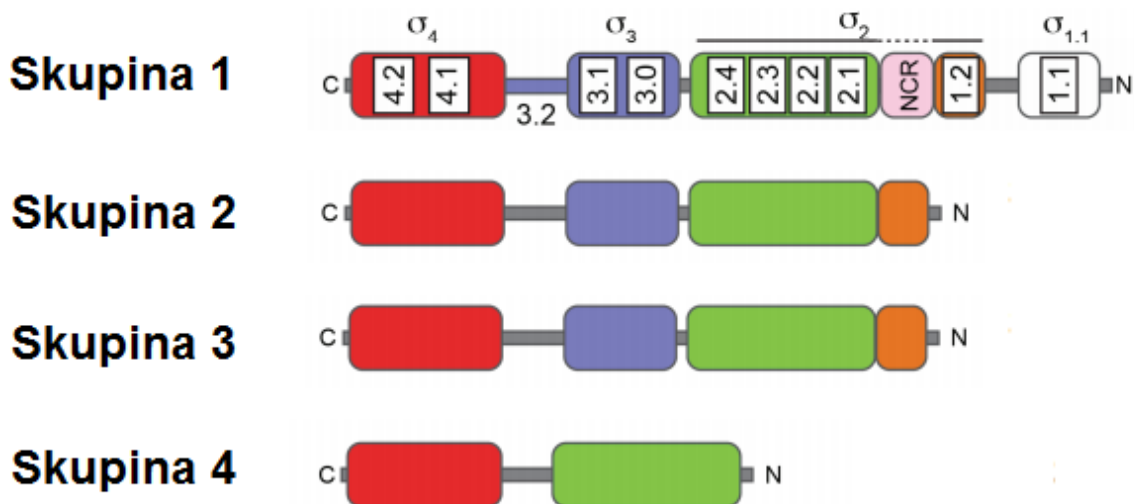
**Obrázek 2. Schéma vegetativního bakteriálního promotoru.** Na obrázku vlevo se nachází promotorová oblast -35, následuje mezeríkem, -10 rozšiřující motiv tvořený sekvencí TGn, promotorová oblast -10, GC bohatý motiv diskriminátoru a TSS (transkripční start). Modrou barvou je znázorněno netemplátové vlákno DNA a šedou barvou vlákno templátové. Převzato (Feklístov *et al.*, 2014); upraveno.

## 3.6 Sigma ( $\sigma$ ) faktory

Sigma faktory jsou podjednotky bakteriální RNAP zodpovědné za rozpoznání promotoru RNAP, její interakci s DNA a vznik transkripční bubliny při iniciaci transkripce. Kromě  $\sigma$  faktorů, které zodpovídají za rozpoznání promotorů vegetativních (*housekeeping*) genů využívaných za podmínek exponenciálního růstu, existují i alternativní faktory, které se uplatňují během reakcí buněk na nepříznivé podmínky. Jedná se tak o důležitý prvek regulace genové exprese na úrovni iniciace transkripce. Podjednotky  $\sigma$  faktorů dělíme na dvě rodiny, a to  $\sigma^{70}$  a  $\sigma^{54}$ .

### 3.6.1 Rodina $\sigma^{70}$

Tato rodina nese pojmenování podle molekulové hmotnosti prvního objeveného  $\sigma$  faktoru u *E. coli*, která činila 70 kDa (Burgess *et al.*, 1969). Dělíme ji do 4 skupin (Obr. 3) dle zastoupení jednotlivých konzervovaných domén ( $\sigma_{1.1}$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$  či  $\sigma_4$ ) (Paget, 2015). N-koncová doména  $\sigma_{1.1}$  je doména inhibiční, neboť zabraňuje interakci faktoru s DNA dříve, než dojde k úspěšnému složení kompletního holoenzymu RNAP (Schwartz *et al.*, 2008). Evolučně nejkonzervovanější doména  $\sigma_2$  zodpovídá za interakci s promotorovou oblastí -10. Tato interakce je zásadní pro tání dvoušroubovice DNA (Feklistov a Darst, 2011; Young *et al.*, 2004). Rozšiřující motiv -10 interaguje s podjednotkou  $\sigma_3$  a napomáhá tak tání dvoušroubovice (Mitchell *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2004). C-koncová doména  $\sigma_4$  interaguje s oblastí -35 (Lane a Darst, 2006).



**Obrázek 3. Doménové uspořádání faktorů rodiny  $\sigma^{70}$ .** Doména  $\sigma_{1.1}$  je označena bílou barvou, doména  $\sigma_2$  oranžovou (region  $\sigma_{R1.2}$ ) a zelenou barvou ( $\sigma_{R2.1}$ - $\sigma_{R2.4}$ ), doména  $\sigma_3$  modrou barvou ( $\sigma_{R3.0}$ - $\sigma_{R3.1}$ ) a doména  $\sigma_4$  červenou barvou ( $\sigma_{R4.1}$ - $\sigma_{R4.2}$ ). V doméně  $\sigma_2$  se nachází nekonzervativní region (NCR), který je označen růžově. Převzato z (Paget, 2015); upraveno.

Faktory skupiny 1 obsahují všechny 4 domény  $\sigma$  podjednotky (Obr. 3). Tyto  $\sigma$  faktory (zde: vegetativní  $\sigma$  faktory), které řídí transkripci vegetativních (tzv. *housekeeping*) genů se uplatňují hlavně během exponenciálního růstu. Jsou pro buňku esenciální a je nemožné vytvořit deleční kmeny postrádající tyto faktory (Paget a Helmann, 2003). Skupina 2 zahrnuje faktory, které nemají doménu  $\sigma_{1.1}$  (Obr. 3) a hrají roli během odpovědi na stresy spojené zejména s přechodem do stacionární fáze růstu. Na rozdíl od skupiny 1 nejsou tyto faktory pro přežití buňky za nestresových podmínek nezbytné. Faktory skupiny 3, které se skládají z domén  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$  a  $\sigma_4$  (Obr. 3), jsou zodpovědné za expresi genů pro biosyntézu bičíku, sporulaci či obecnou stresovou odpověď (Paget, 2015). Strukturně nejjednodušší faktory skupiny 4 obsahující pouze domény  $\sigma_2$  a  $\sigma_4$  (Obr. 3) se někdy nazývají jako ECF faktory (faktory s extracytoplazmatickou funkcí). Tento název skupiny je odvozen od funkce faktoru  $\sigma^E$  *E. coli*, který zodpovídá za expresi genů, jejichž proteinové produkty zajišťují stresovou odpověď na stres v periplazmatickém prostoru. Grampozitivní bakterie bez periplazmatického prostoru však kódují jejich strukturní homology, a tak se název ECF užívá u všech bakterií. Tyto  $\sigma$  faktory jsou důležité pro buňky při stresových situacích (Staroň *et al.*, 2009).

### 3.6.2 Rodina $\sigma^{54}$

Tato rodina  $\sigma$  faktorů nesdílí žádnou strukturní homologii s rodinou faktoru  $\sigma^{70}$ . Odlišné jsou i promotory rozpoznávané těmito faktory, neboť zde dochází k interakci s promotorovou oblastí -24 a -12 místo -35 a -10. Samotný faktor s RNAP neutvoří otevřený komplex, ale k aktivaci potřebují ATPázu bEBP (*bacterial enhancer binding protein*), která se váže do oblasti vzdálené -80 až -150 nukleotidů před TSS. Po této vazbě za přispění proteinu IHF (*integration host factor*) dojde k ohnutí DNA a k následné aktivaci transkripce spojením bEBP s holoenzymem RNAP (Buck *et al.*, 1986; Bush a Dixon, 2012). Role  $\sigma$  faktorů rodiny  $\sigma^{54}$  spočívá ve stresové reakci na hladovění na dusík či infekci bakteriofágem (Bush a Dixon, 2012).

### 3.6.3 Anti- $\sigma$ faktory

Tyto faktory svou vazbou blokují  $\sigma_2$  a  $\sigma_4$  domény  $\sigma$  faktorů, čímž brání jejich interakci s promotorem a zahájení transkripce. Pokud má dojít k uvolnění  $\sigma$  faktoru, je zapotřebí signálu uvnitř nebo vně buňky. Proto se anti- $\sigma$  faktory skládají ze  $\sigma$ -vazebné domény a senzorické domény, která na signál reaguje. Geny pro anti- $\sigma$  faktory jsou většinou přepisovány ze stejného operonu jako geny pro příslušné  $\sigma$  faktory, které jsou jejich vazebným partnerem (Paget, 2015).

Anti- $\sigma$  faktory můžeme rozdělit podle vazby na  $\sigma$  faktor do dvou skupin. Do první skupiny patří anti- $\sigma$  faktory, které se včleňují mezi domény  $\sigma_2$  a  $\sigma_4$  ECF faktorů pomocí N-koncové domény. Anti- $\sigma$  faktor ChrR a faktor  $\sigma^E$  *Rhodobacter sphaeroides* poskytují výmluvný příklad takové interakce, kde dochází k uvolnění ChrR během fotosyntézy při hromadění singletového kyslíku (Campbell *et al.*, 2007). Dalším příkladem je  $\sigma^E$  a anti- $\sigma$  faktor RseA, což je transmembránový protein, jehož senzorká doména je umístěna v periplazmě, kde dochází po vyvolání stresu k proteolytickému štěpení RseA a k uvolnění  $\sigma^E$  (Ades *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2003).

Do druhé skupiny spadají anti- $\sigma$  faktory, které se omotávají kolem domén  $\sigma_2$  a  $\sigma_4$ . Takovým příkladem je anti- $\sigma$  faktor FlgM, který blokuje faktor  $\sigma^{28}$  zodpovědný za expresi genu pro biosyntézu bičíku u gramnegativní bakterie *Aquifex aeolicus* (Sorenson *et al.*, 2004). U bakterie *Cupriavidus metallidurans* takovou interakci utvářejí anti- $\sigma$  faktor CnrY a faktor  $\sigma^{CnrH}$ , který řídí expresi genů důležitých pro rezistenci ke kobaltu a niklu (Maillard *et al.*, 2014).

Jsou známy 3 mechanismy, pomocí kterých jsou anti- $\sigma$  faktory uvolňovány ze  $\sigma$  faktorů. Prvním z nich je regulovaná proteolýza, kdy při stresu je aktivována proteáza, která přeruší vazbu anti- $\sigma$  faktoru na  $\sigma$  faktor. Poté dojde k uvolnění  $\sigma$  faktoru a volný anti- $\sigma$  faktor je degradován proteolytickým systémem ClpXP (Ades *et al.*, 1999; Flynn *et al.*, 2004). Dalším mechanismem je změna konformace po detekci signálu. Takový mechanismus nastává u bakterie *Streptomyces coelicolor*, když po vyvolání oxidativního stresu dojde k tvorbě disulfidických můstků mezi cysteinovými zbytky anti- $\sigma$  faktoru RseA, čímž dojde k uvolnění faktoru  $\sigma^R$  (Li *et al.*, 2003). Třetím mechanismem je výměna interakčního partnera. Příkladem jsou faktor  $\sigma^B$  a jeho anti- $\sigma$  faktor RsbW u *Bacillus subtilis*. Za podmínek exponenciálního růstu je RsbW vázán na  $\sigma^B$  a anti-anti- $\sigma$  faktor RsbV je fosforylovaný. Po vyvolání stresu dojde k defosforylaci RsbV, který poté vyváže RsbW, čímž umožní uvolnění  $\sigma^B$  (Hecker *et al.*, 2007).

### 3.6.4 $\sigma$ faktory u *Corynebacterium glutamicum*

*C. glutamicum* má celkem 7  $\sigma$  faktorů, z nichž všechny náleží rodině  $\sigma^{70}$ . Jsou zastoupeny skupiny 1 ( $\sigma^A$ ), 2 ( $\sigma^B$ ) a 4 ( $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^M$ ).

#### 3.6.4.1 $\sigma^A$

Faktor  $\sigma^A$  je vegetativní  $\sigma$  faktor, který spadá do skupiny 1 rodiny  $\sigma^{70}$ . Zodpovídá za expresi genů, které se uplatňují během exponenciálního růstu *C. glutamicum*, a je pro buňku esenciální (Oguiza *et al.*, 1997). U  $\sigma^A$ -dependentních promotorů je konsenzuální sekvence pro oblast -35 ttgnca a pro oblast -10 TAnnnT (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

U některých vegetativních promotorů *C. glutamicum* byl před -10 oblastí nalezen i rozšiřující motiv TGn (Albersmeier *et al.*, 2017).

#### 3.6.4.2 $\sigma^B$

Tento faktor skupiny 2 se uplatňuje především během stacionární fáze růstu, kdy přejímá úlohu faktoru  $\sigma^A$  (Larisch *et al.*, 2007). O podobnosti těchto dvou faktorů vypovídá i fakt, že *in vitro* je schopen faktor  $\sigma^B$  spouštět transkripci ze  $\sigma^A$ -dependentních promotorů. Stejně tak i faktor  $\sigma^A$  spouští transkripci ze  $\sigma^B$ -dependentních promotorů (Šilar *et al.*, 2016).  $\sigma^B$ -dependentní promotory jsou podobné  $\sigma^A$ -dependentním promotorům. Rozdílem je preference G v pozici diskriminátoru u  $\sigma^B$ -dependentních promotorů (Albersmeier *et al.*, 2017). Zajímavostí je, že exprese genu *sigB*, který kóduje faktor  $\sigma^B$ , je řízena  $\sigma^E/\sigma^H$ -dependentním promotorem (Dostálová *et al.*, 2017; Holátko *et al.*, 2012).

#### 3.6.4.3 $\sigma^C$

Faktor  $\sigma^C$ , který patří do skupiny 4, se podílí na expresi genů, které mají úlohu v aerobní respiraci. Pozitivně reguluje syntézu cytochromů *bd* a *aa3*. Naopak negativně reguluje syntézu cytochromu *bc1* (Toyoda a Inui, 2016a). K aktivaci exprese genů spadajících do  $\sigma^C$ -regulonů dochází při nedostatku mědi. Jedná se o následek zhoršeného přenosu elektronů přes cytochromy, pro jejichž fungování je přítomnost mědi zásadní (Morosov *et al.*, 2018; Toyoda a Inui, 2016a).

V porovnání s ostatními ECF faktory *C. glutamicum* mají  $\sigma^C$ -dependentní promotory ojedinělé konsenzuální sekvence -35 (GGAAGT) a -10 (CGACWR) promotorových oblastí (Toyoda a Inui, 2016a).

#### 3.6.4.4 $\sigma^D$

Dalším významným ECF faktorem je  $\sigma^D$ , který je klíčovým regulátorem syntézy mykolových kyselin *C. glutamicum* (Taniguchi *et al.*, 2017; Toyoda a Inui, 2018). Bylo experimentálně prokázáno, že k aktivaci  $\sigma^D$ -regulonů dochází při kultivaci bakterie v přítomnosti lysozymu, což ukazuje, že proteiny genů řízených  $\sigma^D$  se uplatňují v zajištění integrity buněčné stěny při povrchovém stresu (Toyoda a Inui, 2018).

Aktivita faktoru  $\sigma^D$  je posttranslačně regulována pomocí jeho anti- $\sigma$  faktoru RsdA, který je lokalizován v cytoplazmatické membráně. Předpokládá se, že k uvolnění vazby RsdA- $\sigma^D$  dochází při vyvolání povrchového stresu, např. pomocí SDS či lysozymu. Gen *rsdA* se nachází ve stejném operonu jako gen faktoru  $\sigma^D$  *sigD* (Toyoda a Inui, 2018).

Pomocí sekvenování RNA byly porovnány transkriptomy kmenů s nadprodukcí faktoru  $\sigma^D$  a kmene s delecí v genu pro  $\sigma^D$ . Bylo tak nalezeno 29  $\sigma^D$ -dependentních

promotorů a určena konsenzuální sekvence pro oblast -35 (GTAAC<sup>A/G</sup>) a -10 (GAT) (Dostálová *et al.*, 2019).

#### 3.6.4.5 $\sigma^E$

Dalším z faktorů skupiny 4 u *C. glutamicum* je faktor  $\sigma^E$ , který umožňuje buňce odpovídat na stres vyvolaný teplotním šokem, SDS, EDTA, lysozymem či hladověním na dusík (Park *et al.*, 2008). Zodpovídá i za expresi genů chaperonů a metyltransferáz, které se podílejí na metylaci mykolových kyselin zajišťujících odolnost buněčného obalu během stresových situací (Dostálová *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2008). Důležitou roli v posttranslační regulaci faktoru  $\sigma^E$  hraje jeho anti- $\sigma$  faktor CseA (označovaný též CseE), který je součástí stejného operonu jako gen *sigE* (Park *et al.*, 2008). Zatímco operon *sigE-cseA* je přepisován ze tří  $\sigma^A$ -dependentních promotorů, gen *cseA* řídí další dva promotory, z nichž jeden je vegetativní a druhý je  $\sigma^E/\sigma^H$ -dependentní (Busche *et al.*, 2023).

Recentní experimenty ukazují, že promotory rozpoznávané faktory  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  jsou v některých případech totožné. Konsenzuální sekvence GGAAC pro -35 oblast a GTT pro -10 oblast je totiž rozpoznávána oběma faktory  $\sigma$ . Například promotor genu faktoru  $\sigma^B$  je rozpoznáván jak faktorem  $\sigma^E$ , tak  $\sigma^H$ , což naznačuje propojení mezi regulony těchto 3  $\sigma$  faktorů (Busche *et al.*, 2023; Dostálová *et al.*, 2017).

#### 3.6.4.6 $\sigma^H$

ECF faktor  $\sigma^H$  ovládá obrovský počet genů a zároveň spouští transkripci jiných *sig* genů (*sigB* a *sigM*), a je proto považován za globální regulátor (Busche *et al.*, 2012; Dostálová *et al.*, 2017; Schröder a Tauch, 2010). Řídí odpovědi na teplotní šok, oxidativní stres i na povrchový stres (Ehira *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005). Mezi geny, jejichž exprese je řízená tímto  $\sigma$  faktorem, patří zejména geny kódující proteázy a chaperony (Engels *et al.*, 2004). Zároveň je faktor  $\sigma^H$  zodpovědný za SOS odpověď způsobenou poškozením DNA, neboť spouští expresi genů kódujících proteiny reparačního aparátu (Busche *et al.*, 2012).

Ve stejném operonu jako gen faktoru  $\sigma^H$  se nachází i gen pro jeho anti- $\sigma$  faktor RshA, který je však přepisován společně se *sigH* ze tří vegetativních promotorů operonu i ze svého vlastního  $\sigma^H$ -dependentního promotoru (Busche *et al.*, 2012). Pod kontrolou  $\sigma^H$ -dependentního promotoru je i gen pro faktor  $\sigma^B$ , což potvrzuje důležitost faktoru  $\sigma^H$  i v přechodu z exponenciální fáze do stacionární fáze růstu (Dostálová *et al.*, 2017).

Konsenzuální sekvence pro -35 (gGGAA<sup>T/G</sup>) a -10 (GTT) promotorové oblasti byla odvozena ze 45 stanovených  $\sigma^H$ -dependentních promotorů (Busche *et al.*, 2012). Jedná se o  $\sigma$  faktor s vysoce konzervovanými promotory i u jiných bakterií, neboť stejné konsenzuální sekvence -35 a -10 promotorové oblasti má i faktor  $\sigma^H$  *Mycobacterium tuberculosis* (Raman

*et al.*, 2001) a homologní  $\sigma^R$  ze *Streptomyces coelicolor* (Paget *et al.*, 1998). V recentní publikaci byl navíc potvrzen překryv rekogniční (rozpoznávací) specifity mezi  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -dependentními promotory *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023).

#### 3.6.4.7 $\sigma^M$

Posledním ze stresových  $\sigma$  faktorů *C. glutamicum* je  $\sigma^M$ . Jeho role je podobná jako u faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ , tedy zprostředkování reakce buňky na teplotní, oxidativní či disulfidický stres (Nakunst *et al.*, 2007).

Původní konsenzuální sekvence pro -35 (gGGAAT) a -10 (YGTTGR) promotorovou oblast naznačovala, že většina  $\sigma^M$ -dependentních promotorů může být zároveň i  $\sigma^E/\sigma^H$  dependentní (Nakunst *et al.*, 2007). V pozdější práci kolegyně z *Laboratoře modulační genové exprese* však byla konsenzuální sekvence redefinována (GGGAACC pro oblast -35 a GTCNAA pro oblast -10) (Dostálová, 2020).

### 3.6.5 $\sigma$ faktory rodu *Rhodococcus*

Všechny doposud objevené  $\sigma$  faktory u různých kmenů tohoto rodu se řadí do rodiny  $\sigma^{70}$ . V porovnání s příbuznými rody *Corynebacterium* či *Mycobacterium* máme o  $\sigma$  faktorech rodu *Rhodococcus* daleko menší množství informací. Exprese genů umožňujících rhodokokům přežít v nepříznivých až extrémních podmínkách i degradovat rozmanité toxické sloučeniny je zajišťována podstatně větším množstvím stresových  $\sigma$  faktorů, než je tomu např. u *C. glutamicum*.

Stejně jako u *C. glutamicum* či *M. tuberculosis* je skupina 1 faktorů rodiny  $\sigma^{70}$  zastoupena jediným zástupcem, a to vegetativním faktorem  $\sigma^A$ . Identita aminokyselinové sekvence faktoru  $\sigma^A$  u kmenů *R. erythropolis* CCM2595, *R. jostii* RHA1, *R. opacus* PD630, *R. equi* 103S, *R. fascians* D188 se při srovnání s *M. tuberculosis* pohybuje v rozmezí 76-79 % (Pátek *et al.*, 2021). Předpokládáme tedy, že funkce faktoru  $\sigma^A$  u rhodokoků je stejná jako u *C. glutamicum* či *M. tuberculosis*, tedy transkripce genů nezbytných pro exponenciální růst bakterie (Oguiza *et al.*, 1997).

Gen *sigB* se vyskytuje ve všech anotovaných sekvencích genomů rhodokoků a i zde faktor  $\sigma^B$  spadá do skupiny 2 rodiny  $\sigma^{70}$ . Identita aminokyselinové sekvence faktoru  $\sigma^B$  u kmenů *R. erythropolis* CCM2595, *R. jostii* RHA1, *R. opacus* PD630, *R. equi* 103S, *R. fascians* D188 se při srovnání s *M. tuberculosis* pohybuje v rozmezí 83-85 % (Pátek *et al.*, 2021). Na základě vysoké sekvenční shody předpokládáme, že jeho role bude obdobná jako u *C. glutamicum* a *M. tuberculosis* (Larisch *et al.*, 2007), tedy indukce exprese genů během růstu kultury buněk v přechodu z exponenciální do stacionární fáze. V případě kmene *Rhodococcus* sp. TG13 došlo při vzniku buněčné formy VBNC (živé, ale



nekultivovatelné buňky) ke snížení exprese genu pro  $\sigma^A$ , což napovídá, že faktor  $\sigma^B$  přebírá jeho funkci v době hladovění (Su *et al.*, 2016). V buňkách kmene *R. opacus* B4 došlo ke zvýšení exprese *sigB* také během přechodu do stacionární fáze růstu. Navíc bylo prokázáno, že  $\sigma^B$  hraje roli při teplotním šoku a toleranci k etanolu, neboť u mutantů s delecí v genu *sigB* došlo ke zhoršení růstu při vystavení vysoké teplotě a etanolu během kultivace (Kita *et al.*, 2009). Homolog tohoto  $\sigma$  faktoru  $\sigma^{B1}$  byl nalezen u kmene *R. jostii* RHA1, kde hraje úlohu v odpovědi na teplotní šok (Ekpanyaskun, 2006).

Na rozdíl od *C. glutamicum* disponují někteří zástupci rodu *Rhodococcus*  $\sigma$  faktory skupiny 3, což jsou faktory příbuzné  $\sigma^F$  u *M. tuberculosis*. Kmen *R. jostii* RHA1 má dokonce tři takové faktory, a to  $\sigma^{F1}$ ,  $\sigma^{F2}$  a  $\sigma^{F3}$ . Analýza transkriptomu tohoto kmene v podmínkách vysychání při 20% relativní vlhkosti prokázala, že mezi 406 nadexprimovanými geny byly i geny pro faktory  $\sigma^{F1}$  a  $\sigma^{F3}$ . Zároveň bylo zjištěno, že tyto faktory hrají roli při v osmotickém stresu a teplotním šoku (Ekpanyaskun, 2006; LeBlanc *et al.*, 2008). Navíc u stejného kmene byla pozorována nadprodukce faktoru  $\sigma^{F3}$  po vystavení buněk perfluoralkylovaným kyselinám, při kterém došlo k masivní tvorbě buněčných agregátů (Weathers *et al.*, 2015).

Nejvíce  $\sigma$  faktorů kmenů rodu *Rhodococcus* zahrnují faktory skupiny 4. V první řadě zde najdeme faktory, které se nacházejí i u *C. glutamicum*, tedy faktory  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$ , u nichž lze předpokládat, že budou mít obdobnou funkci a vzájemnou regulaci jako v případě zmiňovaného příbuzného rodu a že regulony těchto faktorů budou vykazovat vzájemný překryv. Dalším ECF faktorem rhodokoků je  $\sigma^G$ . Proteomická analýza kmene *R. jostii* RHA1 prokázala zvýšenou přítomnost faktoru  $\sigma^G$  za podmínek hladovění, což naznačuje jeho možné zapojení do stresové odpovědi během stacionární fáze růstu (Patrauchan *et al.*, 2012). Informace o dalších faktorech skupiny 4 u kmenů rodu *Rhodococcus* ( $\sigma^J$ ,  $\sigma^K$ ,  $\sigma^L$ ,  $\sigma^M$ ,  $\sigma^W$ ,  $\sigma^Z$ ) máme pouze na základě znalosti sekvence jejich genů a její podobnosti se sekvencemi analogických genů příbuzných druhů bakterií. Jelikož se faktor  $\sigma^J$  *M. tuberculosis* podílí na zvýšení odolnosti k  $H_2O_2$  (Hu *et al.*, 2004), můžeme jeho podobnou roli předpokládat i v kmenech rodu *Rhodococcus*. Do regulonu faktoru  $\sigma^K$  *M. tuberculosis* spadají geny pro katalázu, peroxidázu a pro antigeny MPT70 a MPT83, (Sklar *et al.*, 2010; Veyrier *et al.*, 2008), což naznačuje možnou roli tohoto faktoru v oxidativním stresu. Předpokládaná funkce faktorů  $\sigma^L$  a  $\sigma^M$  *M. tuberculosis* je v zajištění exprese genů majících úlohu v syntéze lipidů a oxidativním stresu (Sklar *et al.*, 2010).

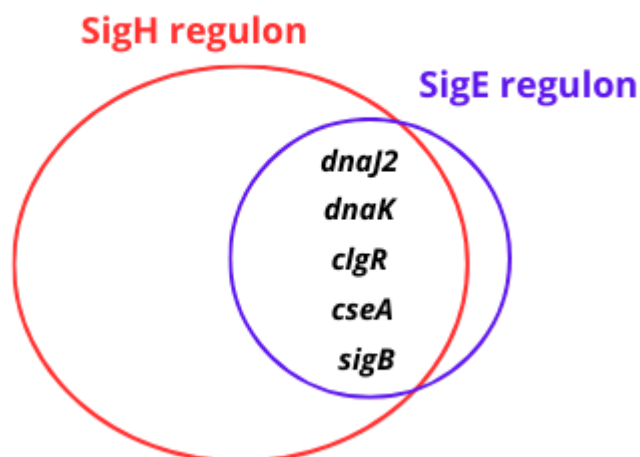
### 3.7 Překryvy $\sigma$ regulonů u bakterií

Řízení genové exprese je velice komplikovaný proces, při kterém se během života buňky zapojuje obrovské množství transkripčních proteinových aktivátorů či represorů, malých regulačních RNA a v neposlední řadě  $\sigma$  podjednotek RNAP. I přes to, že bakterie

využívají k uskutečnění svého genetického programu velké množství různých  $\sigma$  faktorů, neplatí, že by každá sada genů s určitou funkcí měla pro svou expresi pouze jeden konkrétní  $\sigma$  faktor. To je způsobeno jevem, který označujeme jako překryv rekogniční specifity  $\sigma$  faktorů při rozpoznání promotorů.

Jedním z příkladů je promotor genu kódujícího transkripční aktivátor exprese operonu pro biosyntézu sublancinu u *B. subtilis*. Transkripci genu *abh* z tohoto promotoru umožňují dva ECF faktory, a to  $\sigma^X$  a  $\sigma^M$ , což potvrdila transkriptomická analýza 7 mutantních kmenů (delece v genech pro různé stresové transkripční aktivátory) (Luo a Helmann, 2009). Podobně faktory  $\sigma^T$  a  $\sigma^U$  u bakterie *Caulobacter crescentus*, která slouží jako modelový organismus pro studium buněčného dělení, sdílejí identické konsenzuální sekvence pro jimi rozpoznávané promotory (-35 GGAAC a -10 CGTTG). Při teplotním šoku (48 °C) došlo ke zvýšení exprese jak genu *sigT*, tak i *sigU*, což poukazuje na pravděpodobný překryv rekogniční specifity těchto dvou ECF faktorů (Alvarez-Martinez *et al.*, 2007). Z analýzy transkriptomu kmenů s delecí v genech pro vybrané  $\sigma$  faktory ( $\sigma^B$ ,  $\sigma^C$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^L$ ) *Listeria monocytogenes* vyplynulo, že 39 genů je řízeno faktorem  $\sigma^B$  i  $\sigma^H$  a 11 genů je řízeno faktorem  $\sigma^B$  i  $\sigma^L$ , přičemž deleční kmeny  $\Delta sigB$ ,  $\Delta sigC$ ,  $\Delta sigH$  a  $\Delta sigL$  prokázaly sníženou schopnost odolávat kyselému stresu, teplotnímu šoku a také zhoršenou virulenci (Chaturongakul *et al.*, 2011). Dalším příkladem je exprese genu pro faktor skupiny 2  $\sigma^B$  *M. tuberculosis*, která je řízena hned třemi ECF faktory, a to  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^L$  (Dainese *et al.*, 2006; Manganelli *et al.*, 2002, 2001). Není tedy překvapením, že vzhledem ke strukturní a funkční podobnosti  $\sigma$  faktorů *M. tuberculosis* se  $\sigma$  faktory *C. glutamicum*, dochází i u druhého jmenovaného zástupce k řízení exprese *sigB* faktory  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  (Dostálová *et al.*, 2017; Holátko *et al.*, 2012). Důsledkem překryvu rekogniční specifity  $\sigma$  faktorů je překryv regulonů. Jestliže určitá skupina genů (regulon) je řízena jedním společným  $\sigma$  faktorem (označovaných též jako sigmulon) a jiná skupina genů druhým  $\sigma$  faktorem, mohou se vyskytnout geny, které spadají do obou skupin; tyto geny pak tvoří překryv regulonů (Cho *et al.*, 2014).

U *C. glutamicum* je typickým příkladem překryv  $\sigma$  regulonů ECF faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  (Obr. 4). Promotory, u kterých byl prokázán překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  *C. glutamicum*, řídí geny kódující chaperony (DnaJ2, DnaK), transkripční regulátor ClgR, faktor  $\sigma^B$  a anti- $\sigma$  faktor CseE (Obr. 4) (Busche *et al.*, 2023; Dostálová *et al.*, 2017; Šilar *et al.*, 2016). Zajímavé je, že téměř každý prokázaný  $\sigma^E$ -dependentní promotor *C. glutamicum* je zároveň i  $\sigma^H$ -dependentním promotorem (Obr. 4) (Busche *et al.*, 2023).



**Obrázek 4. Schéma překryvu regulonů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ .** Kruhy znázorňují  $\sigma^E$ -regulon (modře) a  $\sigma^H$ -regulon (červeně). V průniku obou kruhů se nachází geny, pro jejichž promotory byl prokázán překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ .

Přestože u bakterií *R. erythropolis* a *R. opacus* nebyly doposud tyto faktory podrobeny důkladnějšímu zkoumání, předpokládáme, že jejich funkce ve stresovém fungování buňky je obdobná, a tudíž i zde budou nalezeny překryvy odpovídající příbuzným rodům. U ECF faktorů  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  *C. glutamicum* se kvůli odlišným konsenzuálním sekvencím -35 a -10 promotorových oblastí jimi řízených genů dlouho předpokládalo, že nedochází k překryvům jejich regulonů. Nicméně výsledky sekvenování RNA transkriptomu a mapování 5' konců mRNA transkriptů mutantního kmene  $\Delta sigD$  prokázaly, že existuje i  $\sigma^D$ -dependentní promotor *P<sub>lpd</sub>*, jehož oblast -10 obsahuje trojici nukleotidů GTT, která je typická pro  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -dependentní promotory. Dalším nalezeným, přirozeným hybridním  $\sigma^D/\sigma^H$ -dependentním promotorem byl promotor *P<sub>cg0607</sub>*, jehož oblast -35 obsahuje sekvenci nukleotidů GGAA, která je typická pro  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ - dependentní promotory (Dostálová *et al.*, 2019). Navíc u doposud nejméně prozkoumaného faktoru RNAP *C. glutamicum*  $\sigma^M$  rovněž předpokládáme, že jeho regulony se mohou překrývat s regulony  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ , neboť sekvence pro oblast -35 v  $\sigma^M$ -dependentních promotorech obsahuje nukleotidy GGAAC (Dostálová, 2020).

# 4 Materiál a metody

## 4.1 Bakteriální kmeny

- *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
- *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032  $\Delta$ sigH
- *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595
- *Rhodococcus opacus* PD630
- *Escherichia coli* TOP10

## 4.2 Pufry a kultivační média

### Komplexní tekuté médium 2xYT (1 l)

- 16 g trypton
- 10 g kvasničný extrakt
- 5 g NaCl
- pH  $\approx$  7,0 (neupravováno)

Složky média byly rozpuštěny v dH<sub>2</sub>O. Celkový objem roztoku činil 1 l. Poté bylo médium sterilizováno pomocí autoklávu.

### Komplexní pevné médium 2xYT (1 l)

- 16 g trypton
- 10 g kvasničný extrakt
- 5 g NaCl
- 15 g agar
- pH  $\approx$  7,0 (neupravováno)

Složky média byly rozpuštěny v dH<sub>2</sub>O. Celkový objem roztoku činil 1 l. Poté bylo médium sterilizováno pomocí autoklávu.

### Pufir PBS

- 2,68 mM KCl
- 1,77 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 136,89 mM NaCl
- 10,05 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- pH  $\approx$  8,0 (upraveno H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

Po namíchání byl pufir rozpuštěn v dH<sub>2</sub>O. Roztok o celkovém objemu 1 l byl sterilizován pomocí autoklávu.

## Elektroforetický pufr TBE (5x koncentrováný)

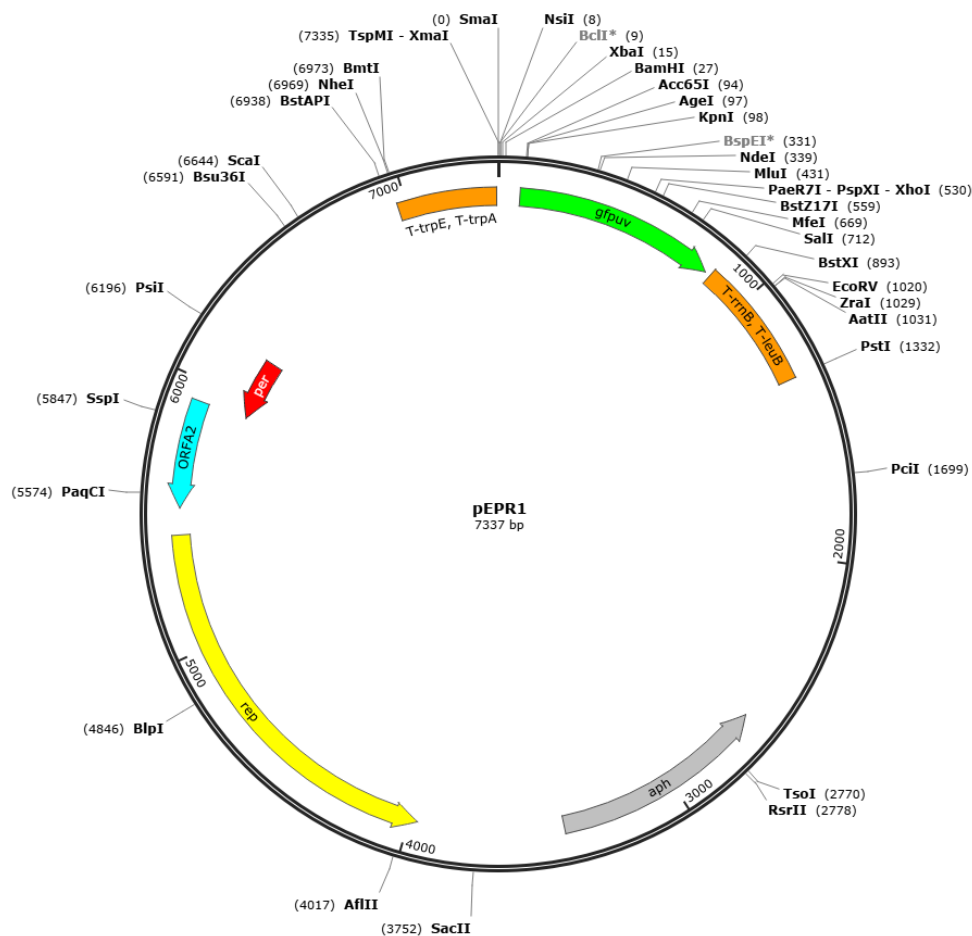
- 54 g Tris-HCl
- 27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH = 8,0)
- pH ≈ 8,3 (neupravováno)

Složky pufru byly rozpuštěny v dH<sub>2</sub>O. Roztok o celkovém objemu 1 l byl sterilizován pomocí autoklávu.

## 4.3 Plazmidy

### 4.3.1 pEPR1

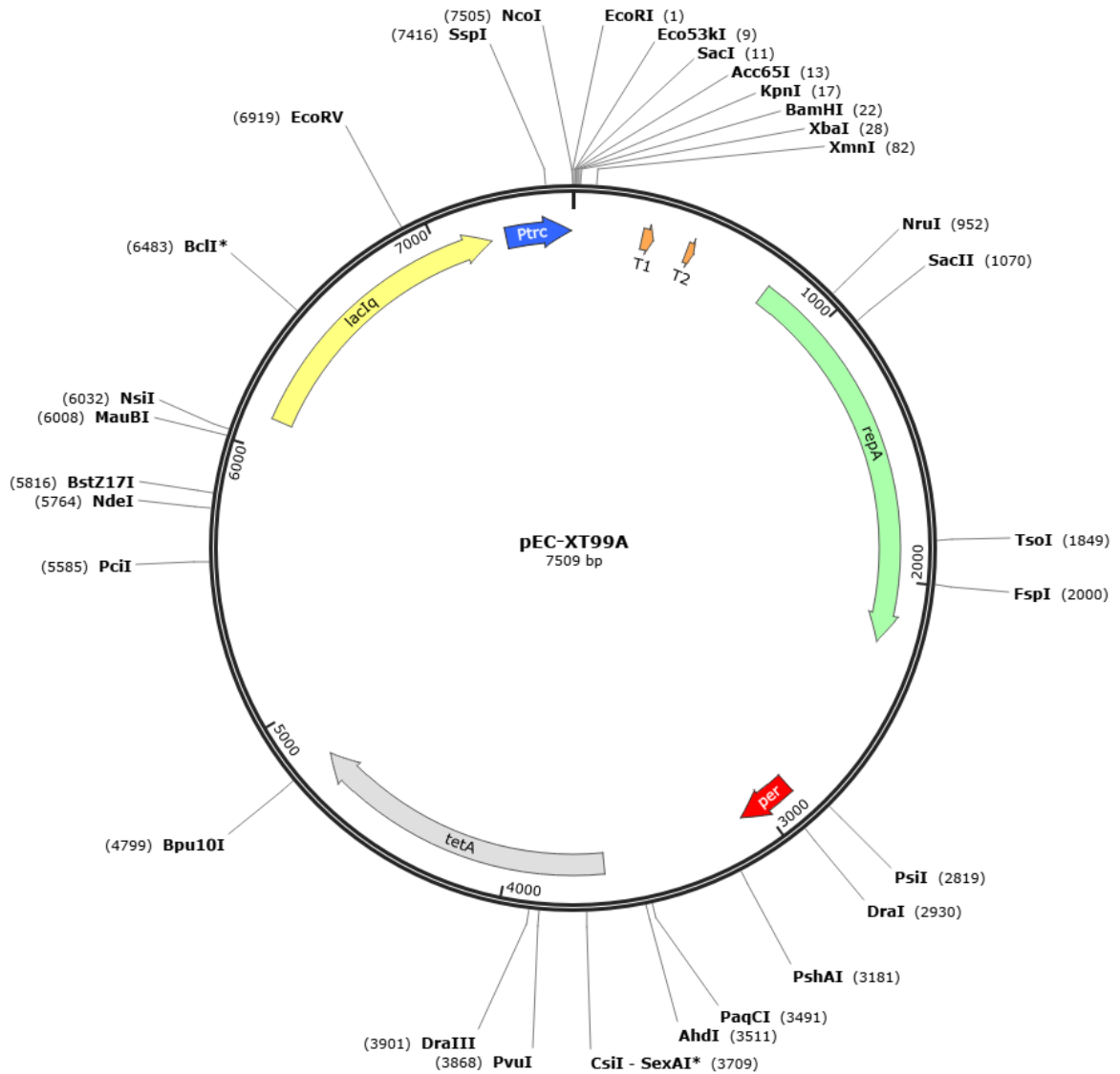
Tento podvojný promotor-test vektor (s možností replikace v *C. glutamicum* i *E. coli*) nese reportérový gen *gfpUV*, který umožňuje měřit aktivitu sledovaného promotoru (Knopová *et al.*, 2007). Selektivní marker (rezistenci ke kanamycinu) kóduje gen *aph* (Obr. 5).



**Obrázek 5. Mapa plazmidu pEPR1.** *aph* – gen kódující aminoglykosidfosfotransferázu, která je zodpovědná za rezistenci ke kanamycinu; *gfpUV* – reportérový gen kódující GFP; *rep* – gen pro replikační protein; *per* – gen kódující regulátor replikace; T-*trpE*, T-*trpA*, T-*rrmB* a T-*leuB* – terminátory transkripce.

### 4.3.2 pEC-XT99A

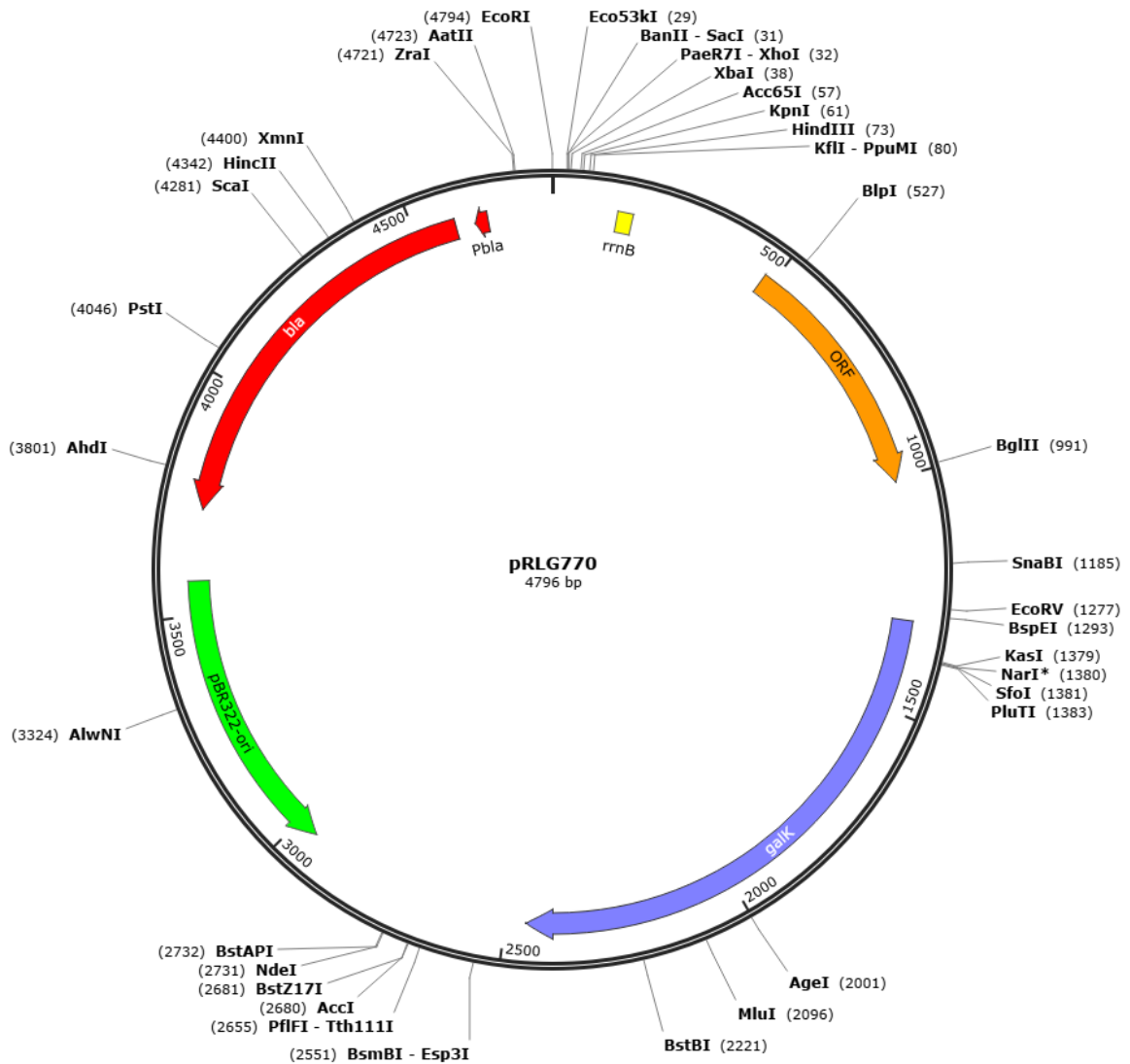
Tento podvojný vektor slouží k nadexpresi sledovaného genu, což je umožněno pomocí IPTG indukovaného promotoru *P<sub>trc</sub>* (Kirchner a Tauch., 2003). Selektivní marker (rezistenci k tetracyklinu) kóduje gen *tetA* (Obr. 6).



**Obrázek 6. Mapa plazmidu pEC-XT99A.** *tetA* – gen kódující protein zajišťující rezistenci k tetracyklinu; *lacIq* – gen kódující Lac represor; *repA* – gen kódující replikační protein; *per* – gen kódující pozitivní regulátor replikace; T1 a T2 – terminátory transkripce.

### 4.3.3 pRLG770

Plazmid pRLG770 se replikuje pouze v *E. coli* a je určen pro *in vitro* transkripci. Obsahuje 150 nt oblast, před kterou vkládáme sledovaný promotor. Tato oblast je zakončená terminátorem transkripce *rrnB* (Ross *et al.*, 1990). Selekční marker (rezistenci k ampicilinu) kóduje gen *bla* (Obr. 7).



**Obrázek 7. Mapa plazmidu pRLG770.** *bla* – gen kódující  $\beta$ -laktamázu zajišťující rezistenci k ampicilinu; *Pbla* – promotor genu *bla*; *rrnB* – terminátor transkripce; ORF – otevřený čtecí rámeček; *galk* – gen kódující galaktokinázu; pBR322-ori – replikační počátek.

## 4.4 Syntetické oligonukleotidy

Tabulka 1. Seznam použitých oligonukleotidů.

Název	Sekvence oligonukleotidu (5' → 3')
PRS01090REF70	GACCGTTGAAGGTTTGAATATTTTCGATTTCAGTAACACCGA ATCGATTGGCCACGATGTACTCGAAGACG
PRS01090RER70	GATCCGTCTTCGAGTACATCGTGGCCAATCGATTCCGGTGT TACTGAATCGAAATATTTCAAACCTTCAACGGTCTGCA
PRS25565REF70	GGTCCGATTGTTGCGATGACCTCGACTTTGTAACACCGGA GCCCCCGAAAGGGACAAACACGTCGACAG
PRS25565RER70	GATCCTGTCGACGTGTTTGTCCCTTTCCGGGGGCTCCGGT GTTACAAAGTCGAGGTCATCGCAACAATCGGACCTGCA
TRPTCGF1	CAGTTGTGTGATGTGGCAATGTTTCACG
GFP1	CTAATTCAACAAGAATTGGGAC
SIGDREpECEcoRIF2	GCCACTGAATTCCCAGGATTTTCG
SIGDREPECR	CACTCTAGACCGCAGCCAAGTCC
SIGHREpECSacIF2	TGGCGGAGCTCTTGATCCCTACGG
SIGHREPECR	CTGTCTAGAAGTCGAGCCTTTC
ECXT99AR	GCTACGGCGTTTTCACTTCTG
PRS01090p770F	AATTCACCGTTGAAGGTTTGAATATTTTCGATTTCAGTAACA CCGAATCGATTGGCCACGATGTACTCGAAGACA
PRS01090p770R	AGCTTGTCTTCGAGTACATCGTGGCCAATCGATTCCGGTGT TACTGAATCGAAATATTTCAAACCTTCAACGGTG
PRS25565p770F	AATTCGTCGATTGTTGCGATGACCTCGACTTTGTAACAC CGGAGCCCCCGAAAGGGACAAACACGTCGACAA
PRS25565p770R	AGCTTTGTGTCGACGTGTTTGTCCCTTTCCGGGGGCTCCGGT GTTACAAAGTCGAGGTCATCGCAACAATCGGACG
30F	CCACCTGACGTCTAAGAAACC
CM3	CGGCGGATTTGTCCCTACT
PSigB70REF	GGTCACGGCGTTTTAGCGGAAATCGGCGCGGGAACTTTCC CGGAACTCTCACACGTTGAACTGTGTGAGAGG
PSigB70RER	GATCCCTCTCACACAGTTCAACGTGTGAGAGTTCCGGGAA AGTTCCCGCGCCGATTTCCGCTAAAACGCCGTGACCTGCA
PSigD70REF1/2	GCGGGAGCACACCCGCTCGGGAGGTGCCACTGTAACGCCA GGATTTTCGCTGACGATGACAAATACGAGCGG
PSigD70RER1/2	GATCCCGCTCGTATTTGTTCATCGTCAGCGAAAATCCTGGC GTTACAGTGGCACCTCCCGAGCGGGTGTGCTCCCGCTGCA
PSigE70REF	GTCACCAGGATTCTCAGGAATCCCTCAGGCTCCTCATATG GCGTGCACACCCGCGATGAGAAAAGGTGTAG
PSigE70RER	GATCCTACACCTTTTCTCATCGCGGTGTGCACGCCATATG AGGAGCCTGAGGGATTCTGAGAATCCTGGTGACTGCA
PSigH70REF	GATCGCCGACAGGTACATCCGACCAGGCCGGGAACAGAGT CGCAGACTCCCGTGTGGTACCAGTTGATGAG



PSigH70RER	GATCCTCATCAACTGGTACCAACACGGGAGTCTGCGACTC TGTTCCCGGCCTGGTCGGATGTACCTGTCGGCGATCTGCA
SIGAREPECF2	CGCCGGAATTCCACTCTGG
SIGAREPECR	TCTTCTAGAAGCTGGTGTGACTA
SIGBREPECF	GAGAATTCGCCGATAGGGAGG
SIGBREPECR	CTGACTCTAGAGCTGTGTTGTTTGA
SIGEREPECF	GCACTACGGAATTCGGACAAC
SIGEREPECR	TCCCTCTAGATGATTGACCAC
PSIGBP770REF	AATCCGGTCACGGCGTTTTTAGCGGAAATCGGCGCGGGAAC TTTCCCGGAACTCTCACACGTTGAACTGTGTGAGAGA
PSIGBP770RER	AGCTTCTCTCACACAGTTCAACGTGTGAGAGTTCGGGAA AGTTCCCGCGCCGATTTCCGCTAAAACGCCGTGACCG
P1SIGDP770REF	AATCCGCGGGAGCACACCCGCTCGGGAGGTGCCACTGTAA CGCCAGGATTTTCGCTGACGATGACAAATACGAGCGA
P1SIGDP770RER	AGCTTCGCTCGTATTTGTCATCGTCAGCGAAAATCCTGGC GTTACAGTGGCACCTCCCGAGCGGGTGTGCTCCCGCG
PSIGHP770REF	AATCCGATCGCCGACAGGTACATCCGACCAGGCCGGGAAC AGAGTCGCAGACTCCCGTGTGGTACCAGTTGATGAA
PSIGHP770RER	AGCTTTCATCAACTGGTACCAACACGGGAGTCTGCGACTC TGTTCCCGGCCTGGTCGGATGTACCTGTCGGCGATCG
O5YRS03175F	GTCCGGTGTGGCCTGGTGACGTGACTCGGGACTAATCCCG ACCCTGTTCGTTGTTGCACCTTCGGTGACG
O5YRS03175R	GATCCGTCACCGAAGGTGCAACAACGAACAGGGTTCGGAT TAGTCCCGAGTCACGTCACCAGGCCACACCCGACTGCA
O5YRS06830F	GCCTCGTCGACGGAACCACCTCGCTCCGGAAGTTTTTCAG GCTGGGGGAGCGTTGACCAGATTCATGGAG
O5YRS06830R	GATCCTCCATGAATCTGGTCAACGCTCCCCAGCCTGAAA ACTTCCGGAGCGAGGGTGGTTCCGTCGACGAGGCTGCA
O5YRS07285F	GGCCGCCATCTGTGGGCGTTGACCAGGGGGAAATAGGAAA GCCGGCCAGATGGTTGCACCTTCCAACGAG
O5YRS07285R	GATCCTCGTTGGAAGGTGCAACCATCTGGCCGGCTTTCCCT ATTTCCCCCTGGTCAACGCCACAGATGGCGGCCTGCA
O5YRS11800F	GCCGCGATCTTCGAACTGGACTGCCTCCGGAACAAACCGG CCGCACGGCGTTCGTTGGTGCAGATATGAGG
O5YRS11800R	GATCCCTCATATCTGCACCAACGACGCCGTGCGGCCGGTT TGTTCCGGAGGCAGTCCAGTTCGAAGATCGCGGCTGCA
O5YRS15250F	GCCGAGAACGCAAGCTGAAATCGGCTCAGGGAAGAATCAG CGGTCCGGGGCGTTGCACACACCAACAGG
O5YRS15250R	GATCCCTGTTGGTGTGTGCAACGCCCGGAACCGCTGATT CTTCCCTGAGCCGATTTTCAGCTTGCCTTCTCGGCTGCA
P1sigBREmut-35GPEPRF	AAGTTTCCCGGAACTCTCAC
P1sigBREmut-35GPEPRF	CCCGCGCCGATTTCCGCTAAAAC
P1sigBREmut-35APEPRF	AAATTTCCCGGAACTCTCAC

P1sigBREmut-35APEPRR	CCCGCGCCGATTTCCGCTAAAAC
P1sigBREmut-35TPEPRF	AATTTTCCCGGAACTCTCAC
P1sigBREmut-35TPEPRR	CCCGCGCCGATTTCCGCTAAAAC
PRS07285mut-35GPEPRF	AAGTAGGAAAGCCGGCCAG
PRS07285mut-35GPEPRR	CCCCCTGGTCAACGCC
PRS07285mut-35CPEPRF	AACTAGGAAAGCCGGCCAG
PRS07285mut-35CPEPRR	CCCCCTGGTCAACGCC
PRS07285mut-35TPEPRF	AATTAGGAAAGCCGGCCAG
PRS07285mut-35TPEPRR	CCCCCTGGTCAACGCC
SIGAPD630pECF	GCCGGCGAATTCAGTAGACCTCTCC
SIGAPD630pECR	CCAGCGTCTAGAGGGCCGTAGGC
SIGBPD630pECF	CGAGGAATTCGCAGGTCACAGCG
SIGBPD630pECR	GTACGTCTAGAACCGGCGCTGATTCC
SIGDPD630pECF	GTTACTCTTGGAGAATTCGCTGAGAGC
SIGDPD630pECR	CCTTCTAGATCGGCATCGGGATTGC
SIGEPD630pECF	GGAATTCACGACGACGGAGGAAAGTCC
SIGEPD630pECR	CGGTCTAGACAAACTGGCGAGGTACACG
SIGHPD630pECF	GTCGGGAGCTCAGCGGACGGG
SIGHPD630pECR	AGTCTAGATGCTCGAATTCGTCTGCTCGC
P2RS01905PD630pEPRF	GTTTTTCGGGTGCCCGAACTTTCCTTTGCGGGAATCGCTC CGTGACCCCAACTGTTGCGCAGGGTGTACCAG
P2RS01905PD630pEPRR	GATCCTGGTACACCCTGCGCAACAGTTGGGGTCACGGAGC GATTCGCGAAAGGAAAGTTTCGGGCACCCGAAAACTGCA
P1RS06830PD630pEPRF	GCTTCTCGGACGCACCCTGCCGTGAGCGGGAAGATCCGG GTTCTGTCGTCGTTGGACCGAGTCGGCACCG
P1RS06830PD630pEPRR	GATCCGGTGCCGACTCGGTCCAACGACGACAGGAACCCGG ATCTTCCCCTCACGGCAGGGTGCGTCCGAGAAAGCTGCA
P1RS13650PD630pEPRF	GGGAGCACCCCATCGGGGGAGGTGCCACTGTAACGCCAG GATATTCAGCAACGATGACTAATACGAGCGAG
P1RS13650PD630pEPRR	GATCCTCGCTCGTATTAGTCATCGTTGCTGAATATCCTGG CGTTACAGTGGCACCTCCCCCGATGGGTGTGCTCCCTGCA
P2RS15515PD630pEPRF	GGGACCACGGTGTGCCGGGACGTCCGGAGGGAAGTTCGAG GGGTCGTCCGGTGTGTCGACATAAGTTGATG

P2RS15515PD630pEPRR	GATCCATCAACTTATGTCGACAACACCGGACGACCCCTCG AACTTCCCTCCGGACGTCCCGGCACACCGTGGTCCCTGCA
P1RS16460PD630pEPRF	GTCACAGCGCCTTCACAAATTACCGGCCGGGAACTTTCCC AGGCCCTTCGGTTCGTTGATCCATATGAGACAG
P1RS16460PD630pEPRR	GATCCTGTCTCATATGGATCAACGCACCGAAGGCCTGGGA AAGTTCCCGGCCGGTAATTTGTGAAGGCGCTGTGACTGCA
P1RS19340PD630pEPRF	GCCCGATCGGGTGATGCTGCGGCCTCTTCGGTAACGATAG GGGAGTTTCGCTCGATATCGTCATCAACTGCG
P1RS19340PD630pEPRR	GATCCGCAGTTGATGACGATATCGAGCGAAACTCCCCTAT CGTTACCGAAGAGGCCCGCAGCATCACCCGATCGGGCTGCA
P0RS25360PD630pEPRF	GTCCCGGAGGCCGAAGTTCCGGTCTCCCTGTAAC TCCCGG CCGATGTAGGAGGCGACTGTGGCGACCCCGGG
P0RS25360PD630pEPRR	GATCCCCGGGGTCCGACAGTCGCCTCTACATCGGCGGG GAGTTACAGGGAGACCGGAAC TCGGCCTCCGGGACTGCA
P0RS39075PD630pEPRF	GATCCCGGCCGATCGTCCAGATTTGAACAAGGAATAGATT ACTTGCCGATGTGGTTGTTGACGGCATGCTGG
P0RS39075PD630pEPRR	GATCCAGCATGCCGTCAACAACCACATCGGCAAGTAATC TATTCCTTGTTCAAATCTGGACGATCGGCCGGGATCTGCA
Pcg0668mut-10F	AAACACTTATTGACAGGGATCCAAGTTC
Pcg0668mut-10R1	CACTGGAAAAACGGCCAAAAGGTTCC
Pcg0668mut-10R2	TACTGGAAAAACGGCCAAAAGGTTCC
Pcg0668mut-10R3	AACTGGAAAAACGGCCAAAAGGTTCC
JB-0668mut-31GPEPRF	GCTTTTGGCCGTTTTTCCAG
JB-0668mut-31GPEPRR	TTCCCTTGAATGTGAAATTAGGGG
JB-0668mut-31APEPRF	ACTTTTGGCCGTTTTTCCAG
JB-0668mut-31APEPRR	TTCCCTTGAATGTGAAATTAGGGG
JB-0668mut-31TPEPRF	TCTTTTGGCCGTTTTTCCAG
JB-0668mut-31TPEPRR	TTCCCTTGAATGTGAAATTAGGGG

## 4.5 DNA markery

Quick-Load® 100 bp DNA Ladder – New England Biolabs, USA

1 kb DNA Ladder – New England Biolabs, USA

## 4.6 Chemikálie

Agar – Oxoid, UK

Agaróza SeaKem® LE – Lonza, USA

Akrylamid – VWR, ČR

Bovine serum albumine (BSA) – Sigma-Aldrich, USA  
Bradfordovo činidlo (5x) – Serva, Německo  
CutSmart® Buffer – New England Biolabs, USA  
dNTP – New England Biolabs, USA  
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) – Lachema, ČR  
Etanol (97 %) – Lachema, ČR  
Fenol – Serva, Německo  
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) – Serva, Německo  
Gel Loading Dye, Purple (6x) – New England Biolabs, USA  
GelRed® - Biotium, USA  
Glycerol – VWR, ČR  
GoTaq Reaction Buffer – Promega, USA  
Hydrogenfosforečnan sodný (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) – Lachema, ČR  
Hydroxid sodný (NaOH) – Lach-Ner, ČR  
Chlorid draselný (KCl) – Lach-Ner, ČR  
Chlorid sodný (NaCl) – Lachema, ČR  
Chlorid vápenatý (CaCl<sub>2</sub>) – Lachema, ČR  
Chloroform – Penta, ČR  
Izoamylalkohol – Penta, ČR  
Izopropanol - Penta, ČR  
Izopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) – Sigma-Aldrich, USA  
Kanamycin – Sigma-Aldrich, USA  
Kyselina boritá (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) – Sigma-Aldrich, USA  
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) – Sigma-Aldrich, USA  
Kyselina fosforečná (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) – Lach-Ner, ČR  
Kyselina chlorovodíková (HCl) – Lachema, ČR  
Kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH) – Penta, ČR  
Kvasničný extrakt – Serva, Německo  
Lysozym – Serva, Německo  
3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina (MOPS) – Serva, Německo  
P1 pufr – Qiagen, Německo  
P2 pufr – Qiagen, Německo  
P3 pufr – Qiagen, Německo  
Peroxodisíran amonný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> – Serva, Německo  
PCRBIO HS Taq Mix Red – PCR biosystems Ltd, UK  
Q5® High-Fidelity DNA polymeráza – New England Biolabs, USA  
Q5® High GC enhancer – New England Biolabs, USA

Q5<sup>®</sup> Reaction Buffer – New England Biolabs, USA  
Restrikční endonukleázy – New England Biolabs, USA  
T4 DNA ligáza – New England Biolabs, USA  
T4 DNA Ligase Buffer – New England Biolabs, USA  
Tetracyklin – Serva, Německo  
Tetrametyletylendiamin (TEMED) – Serva, Německo  
TRIS-hydroxymetylaminoetan – Serva, Německo  
Trypton – Oxoid, UK

## 4.7 Komerční soupravy

NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid – Macherey-Nagel, Německo  
NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up – Macherey-Nagel, Německo  
High Pure PCR Product Purification Kit<sup>®</sup> - Roche, Německo  
Q5<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit – New England Biolabs, USA  
Amicon<sup>®</sup> Ultra 0,5 mL – Merck, Německo

## 4.8 Přístrojové vybavení

Analytická váha GR-202 EC – A&D Company, Japonsko  
Autokláv Systec DX 150 – Systec, Německo  
Centrifuga Mikro 20 – Hettich, Německo  
Cycler Biometra TAdvanced – Analytik Jena, Německo  
Elektroforetická aparatura MultiSUB Midi – Cleaver Scientific Ltd, UK  
Elektroforetická aparatura Owl P10DS – ThermoFisher Scientific, USA  
Elektroporátor Gene pulser – Bio-Rad, Německo  
FastPrep<sup>®</sup>-24 Classic Instrument – MP biomedical, USA  
Fluorimetr SPARK<sup>®</sup> – Tecan, Švýcarsko  
Chlazená centrifuga Eppendorf 5804 – Eppendorf, Německo  
Chlazená centrifuga Mirko 200R – Hettich, Německo  
ImageQuant<sup>™</sup> TL (Cytiva, USA) – analýza radiografických gelů  
Laboratorní váha L610D – Sartorius, Německo  
Magnetická míchačka Mini MR Standard – IKA, Německo  
pH metr Edge<sup>®</sup> – Hanna, ČR  
Quantum<sup>©</sup> CX5 – Vilber, Francie  
Skenner značených biomolekul AmeshamTyphoon<sup>®</sup> – AP Czech s.r.o, ČR  
Termoblok my Block Mini Dry Bath – Benchmark Scientific Inc., USA

Třepačka Gallenkamp – Gallenkamp, Německo

Třepačka Orbital Shaker Incubator ES-20 150 – Biosan, Litva

UV/Vis spektrofotometr Biomate 5 – Thermo Electron Corporation, USA

UV/Vis spektrofotometr Nanophotometer® - Implen, Německo

Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Consort E143 – Consort, Belgie

## 4.9 Software

**ApE (Davis a Jorgensen, 2022)** – analýza a zpracování nukleotidových sekvencí

**Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; NCBI)** – porovnávání sekvencí nukleotidů a aminokyselin [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]

**Bio-Vision® (Vilber, Francie)** – fotodokumentace agarózových gelů

**Canva** – grafický editor [<https://www.canva.com/>]

**CoreIDRAW® Graphics Suite 2020 (Alludo HQ, Kanada)** – grafický editor

**Database of Clusters of Orthologous Genes (COG; NCBI)** – hledání potenciální funkce genů

**Laser gene verze 7. (DNASTAR, Inc. USA)** - analýza a zpracování nukleotidových a aminokyselinových sekvencí

**Microsoft Office (Microsoft, USA)** – vypracování a úpravy textů, tabulek a grafů

**MiST4.0 (Gumerov VM.)** – databáze proteinů signální bakteriální transdukce [<https://mistdb.com/>]

**NEBaseChanger (New England Biolabs, USA)** – návrh primerů pro mutagenézi [<https://nebasechanger.neb.com/>]

**SnapGene® (GSL Biotech LLC, USA)** – grafické zpracování plazmidů

## 4.10 Metody

### 4.10.1 Elektroforéza DNA v agarózových gelech

#### Materiál:

- Pufr TBE
- GelRed®
- Agaróza SeaKem® LE
- DNA – velikostní standardy (markery): 100 bp a 1 kb DNA Ladder
- Gel Loading Dye, Purple (6x)

#### Postup:

Zahříváním v mikrovlnné troubě byla rozpuštěna agaróza ve 40 nebo 50 ml 0,5 x TBE v požadované koncentraci 1-2% (w/v). Jamky, které byly vytvořeny pomocí hřebínku,

posloužily k nanesení vzorků i DNA markeru spolu s GelRed® a nanášecím pufrem Gel Loading Dye, Purple. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického napětí. Elektroforéza probíhala 50-90 min při 6 V/cm. Gel byl vizualizován a vyhodnocen pomocí fotodokumentačního systému Bio-Vision®.

#### 4.10.2 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu

##### **Materiál:**

- High Pure PCR Product Purification Kit®
- Izopropanol
- 10 mM Tris-HCl, pH = 8,5

##### **Postup:**

Z agarózového gelu byl pod UV zářením skalpelem vyříznut bloček o hmotnosti 100-300 mg s požadovaným fragmentem DNA. Po vyříznutí se pokračovalo dle příručky výrobce soupravy High Pure PCR Product Purification Kit®. Nakonec byl produkt z kolonky eluován 30  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl.

#### 4.10.3 Miniizolace plazmidové DNA

##### **Materiál:**

- suspenzní pufr P1 (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA + RNáza A; pH = 8,0) (Qiagen, Německo)
- lyzační pufr P2 (0,2 M NaOH a 1% SDS) (Qiagen, Německo)
- neutralizační pufr P3 (3,0 M octan draselný; pH = 5,5) (Qiagen, Německo)
- 97% (v/v) EtOH
- Acetát-MOPS (0,1 M octan sodný; 0,05 M MOPS; upraveno na pH = 8,0 pomocí NaOH)
- 10 mM Tris-HCl, pH = 8,5
- Lysozym (10 mg/ml)

##### **Postup:**

Kultura *E. coli* byla zaočkována do 2 ml tekutého 2xYT média s příslušným antibiotikem. Po přibližně 20hodinové kultivaci při teplotě 37 °C byla suspenze kultury sklizena a pelet zamražen v mrazáku při teplotě -20 °C. Poté byl pelet resuspendován ve 200  $\mu$ l P1 + 6  $\mu$ l lysozymu. Následovala 15min inkubace ve 37 °C. Poté se ke vzorku přidalo 400  $\mu$ l P2 pufru. Vzorek byl jemně promíchán převrácením mikrozkušavky a 5 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po přidání P3 a jemném promíchání následovala 10min inkubace při 4 °C. Poté byla suspenze centrifugována 10 min při 11 000 x g a teplotě 10 °C. 710  $\mu$ l supernatantu bylo odebráno do nové 2ml mikrozkušavky a promícháno

s dvojnásobným objemem EtOH (1420 µl). Směs s etanolem byla inkubována 15 min při 4 °C a následně centrifugována 10 min při 11 000 x g a teplotě 10 °C. Po odstranění supernatantu byla otevřená mikrozkuhavka sušena 10 min při laboratorní teplotě. Pelet byl rozpuštěn v 75 µl acetát-MOPS a následně promíchán se 150 µl EtOH. Po 15min inkubaci při 4 °C opět proběhla 10min centrifugace při 11 000 x g a 10 °C. Po centrifugaci následovalo odstranění supernatantu a vysušení při laboratorní teplotě. Nakonec byl pelet rozpuštěn v 50 µl 10mM Tris-HCl. Izolovaný vzorek byl analyzován pomocí agarózové elektroforézy.

V případě miniizolace plazmidové DNA z hostitelských kmenů *C. glutamicum* byl postup totožný. Rozdíl byl pouze v množství přidaného lysozymu (30 µl) a délce inkubace vzorku s pufrem P1 (2 h).

#### 4.10.4 Příprava plazmidu na sekvenování

##### Materiál:

- NucleoSpin® Plasmid
- 10 µM sekvenační primer
- 10 mM Tris-HCl pH = 8,5

##### Postup:

Izolovaný plazmid byl přečištěn pomocí soupravy NucleoSpin® Plasmid a následně eluován 50 µl 10 mM Tris-HCl. Po zhodnocení vzorku elektroforézou a Nanophotometrem byl vzorek osekvenován ve Středisku sekvenace DNA Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i.

#### 4.10.5 PCR z bakteriální kolonie

##### Materiál:

- ddH<sub>2</sub>O
- 2x PCR BIO HS *Taq* Mix Red
- 10 µM primery pro PCR
- kolonie příslušného bakteriálního kmene

##### Postup:

Bakteriální biomasa z kolonie příslušného kmene byla pomocí párátko přenesena do 500µl mikrozkuhavky, kde byla resuspendována ve 185 µl ddH<sub>2</sub>O. Poté byla směs inkubována 10 min v cykleru při teplotě 95 °C. Následovala 5min centrifugace při 7500 x g a 10 °C. Po centrifugaci posloužilo 5 µl supernatantu jako DNA templát pro PCR. Reakce byla namíchána v ledové lázni podle příslušné tabulky (Tab. 2). Směs o výsledném objemu 25 µl



byla promíchána a vložena do termocyklu, kde proběhl příslušný program (Tab. 3). Výsledek PCR byl ověřen agarózovou elektroforézou.

**Tabulka 2.** Reakční směs pro PCR.

Chemikálie	Objem
2x PCR BIO HS <i>Taq</i> Mix Red	12,5 µl
primer 1	1 µl
primer 2	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	5,5 µl
templát DNA	5 µl

**Tabulka 3.** Průběh PCR reakce.

Reakce	Teplota (°C)	Čas	počet cyklů
Iničiační denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	15 s	35
Hybridizace	54-67*	15 s	
Syntéza	72	15-30 s**	
Konečná syntéza	72	5 min	1

\*na základě vypočtené teploty tání primerů pomocí programu ApE: A plasmid Editor.

\*\*na základě délky požadovaného produktu (syntéza 1 kb za 15 s).

#### 4.10.6 Amplifikace strukturního genu pomocí PCR

##### Materiál:

- ddH<sub>2</sub>O
- 5x Q5<sup>®</sup> Reaction Buffer
- Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA polymerase
- Q5<sup>®</sup> High GC enhancer
- 10 µM primery pro PCR
- 10 mM dNTP
- DNA templát (izolovaná bakteriální chromozomální DNA)

##### Postup:

Reakční směs byla namíchána v ledové lázni dle příslušné tabulky (Tab. 4). Směs o výsledném objemu 25 µl byla vložena do termocyklu, kde proběhl příslušný program (Tab. 5). Po proběhnutí programu byl výsledek PCR ověřen agarózovou elektroforézou

**Tabulka 4.** Reakční směs pro PCR.

Chemikálie	Objem
Q5 <sup>®</sup> reakční pufr	5 µl
dNTP	0,5 µl
primer 1	1,25 µl
primer 2	1,25 µl
Q5 <sup>®</sup> High GC enhancer	5 µl
DNA polymeráza	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	11,25 µl
DNA templát	0,5 µl

**Tabulka 5.** Průběh PCR reakce.

Reakce	Teplota (°C)	Čas	počet cyklů
Iničiační denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	35
Hybridizace	54-67*	15 s	
Syntéza	72	20-60 s**	
Konečná syntéza	72	2 min	1

\*na základě vypočtené teploty tání primerů pomocí programu ApE: A plasmid Editor.

\*\*na základě délky požadovaného produktu (syntéza 1 kb za 30 s).

#### 4.10.7 Asociace syntetických komplementárních oligonukleotidů

##### Materiál:

- 100 µM syntetické oligonukleotidy
- GoTaq Reaction Buffer
- ddH<sub>2</sub>O

##### Postup:

Jednotlivé reagenty byly smíchány do výsledného objemu 50 µl (Tab. 6). Směs byla umístěna do termocykleru, kde byla nejdříve inkubována při 95 °C po dobu 5 minut. Poté docházelo každou minutu ke snížení reasociační teploty o 1 °C dokud směs nedosáhla teploty 45 °C. Nakonec byla směs ochlazená na 4 °C.

**Tabulka 6.** Reakční směs hybridizace oligonukleotidů.

Chemikálie	Objem
GoTaq pufr	5 µl
oligonukleotid 1	2,5 µl
oligonukleotid 2	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	40 µl

#### 4.10.8 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

**Materiál:**

- CutSmart™ Buffer (10x koncentrovaný)
- Restrikční endonukleázy: BamHI-HF; EcoRI-HF; HindIII-HF; NsiI-HF; SacI-HF; PstI-HF; XbaI
- DNA
- ddH<sub>2</sub>O

**Postup:**

V 1,5ml mikrozkuhavce byla připravena restrikční směs o celkovém objemu 30  $\mu$ l. Směs obsahovala 3  $\mu$ l CutSmart™ pufru, 50-2000 ng DNA a 1  $\mu$ l odpovídající restrikční endonukleázy. Pomocí ddH<sub>2</sub>O byla směs doplněna do celkového objemu 30  $\mu$ l. Následovala 2-3h inkubace při 37 °C. Výsledek restrikčního štěpení byl analyzován pomocí elektroforézy.

#### 4.10.9 Přečištění lineární DNA pomocí komerční soupravy

**Materiál:**

- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit
- 10 mM Tris-HCl, pH = 8,5

**Postup:**

Přečištění vzorku po PCR a restrikčním štěpení bylo provedeno pomocí soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up dle manuálu výrobce. Přečištěný vzorek lineární DNA byl nakonec eluován 30  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl.

#### 4.10.10 Ligace DNA

**Materiál:**

- T4 DNA Ligase Buffer (10x)
- T4 DNA ligáza
- DNA (inzert + vektor)
- ddH<sub>2</sub>O

**Postup:**

Ligační směs obsahovala 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase Buffer, 1 $\mu$ l T4 DNA ligázy, fragmenty DNA v molárním poměru inzert/vektor 3:1. Směs byla namíchána v 0,5ml mikrozkuhavce a doplněna ddH<sub>2</sub>O do 10  $\mu$ l. Samotná ligace probíhala v termocykleru po dobu 3,5 h při teplotě 18 °C.

#### 4.10.11 Příprava kompetentních buněk *E. coli* TOP10

**Materiál:**

- 45 % (w/v) glycerol
- 0,1 M CaCl<sub>2</sub>

**Postup:**

Inokulum bylo připraveno zaočkováním buněk *E. coli* TOP10 z pevného 2xYT média do 10 ml tekutého 2xYT média a následnou 15-18h kultivací na třepačce při 37 °C. Narostlou kulturou bylo zaočkováno tekuté 2xYT médium do OD ≈ 0,1. Kultura *E. coli* byla kultivována na třepačce při teplotě 37 °C do dosažení OD<sub>600</sub> ≈ 0,5. Po kultivaci následovala 10min centrifugace při 5000 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 0,5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> a poté ponechán 30 min v ledové lázni. Proběhla opět 5min centrifugace při 5000 x g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet finálně resuspendován v 0,1 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Po přidání 25 µl glycerolu byly kompetentní buňky okamžitě použity pro transformaci či uchovány v -70 °C.

#### 4.10.12 Transformace *E. coli* (Hanahan, 1983)

**Materiál:**

- Ligační směs
- Antibiotikum (30 µg/ml kanamycin; 10 µg/ml tetracyklin; 100 µg/ml ampicilin)

**Postup:**

K 125 µl připravené buněčné suspenze kompetentních buněk *E. coli* TOP10 bylo přidáno 10 µl ligační směsi. Suspenze byla poté ponechána 30 min v ledové lázni. Tepelný šok byl aplikován v termobloku vyhřátém na 42,5 °C po dobu 90 s. Poté byla směs chlazená 3 min v ledové lázni a bylo k ní přidáno 400 µl 2xYT. Následovala regenerace 45 min při 37 °C na třepačce. 200-300 µl buněčné suspenze bylo vyseto na komplexní pevné médium s příslušným antibiotikem odpovídajícím rekombinantnímu plazmidu. Inkubace na pevném médiu při 37 °C trvala 24 hodin.

#### 4.10.13 Cílená mutagenese pomocí PCR

**Materiál:**

- ddH<sub>2</sub>O
- 10 µM primery pro PCR
- Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit
- DNA templát (plazmidová DNA; 10 ng/µl)

**Postup:**

Mutagenese byla provedena podle manuálu výrobce komerční soupravy Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit. Primery pro cílenou mutagenezi byly navrženy pomocí internetového softwaru NEBaseChanger, dle kterého byla vypočtena i teplota hybridizace primerů. Reakce byla namíchána v ledové lázni podle příslušné tabulky (Tab. 7). Směs o výsledném objemu 25 µl byla promíchána a vložena do termocykleru, kde proběhl příslušný program (Tab. 8).

**Tabulka 7.** Reakční směs pro PCR.

Chemikálie	Objem
Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	12,5 µl
primer 1	1,25 µl
primer 2	1,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	9,0 µl
templát DNA	1 µl

**Tabulka 8.** Průběh PCR reakce.

Reakce	Teplota (°C)	Čas	počet cyklů
Iniciační denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	25
Hybridizace	54-67*	30 s	
Syntéza	72	20-60 s**	
Konečná syntéza	72	2 min	1

\*na základě vypočtené teploty tání primerů pomocí softwaru NEBaseChanger®.

\*\*na základě délky požadovaného produktu (syntéza 1 kb za 30 s).

Po proběhnutí amplifikace byla připravena směs pro KLD reakci (fosforylace PCR produktu, ligace a eliminace templátu) o celkovém objemu 10 µl (Tab. 9). Směs byla důkladně promíchána pipetováním a inkubována 5 minut při pokojové teplotě.

**Tabulka 9.** Reakční směs KLD reakce.

Chemikálie	Objem
PCR produkt	1 µl
2x KLD reakční pufr	5 µl
10x KLD enzymová směs	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	3 µl

5 µl směsi KLD reakce bylo použito k transformaci kompetentních buněk *E. coli* TOP10. Postup transformace byl stejný jako v kapitole 4.10.12. 50 µl transformovaných buněk bylo vyseto na pevné médium s antibiotikem odpovídajícím rekombinantnímu plazmidu. Inkubace na pevném médiu při 37 °C trvala 24 hodin.

#### 4.10.14 Příprava kompetentních buněk *C. glutamicum*

##### Materiál:

- Roztok G [10 % (w/v) glycerol]
- Roztok GT [10 % (w/v) glycerol; 8 mM Tris-HCl; pH = 7,4]
- Při přípravě již jednou transformovaných buněk příslušné antibiotikum odpovídající rekombinantnímu plazmidu

##### Postup:

Inokulum bylo připraveno zaočkováním *C. glutamicum* z pevného 2xYT média do 10 ml tekutého 2xYT média a následnou 24h kultivací na třepačce při 30 °C. Narostlou kulturou bylo zaočkováno 65 ml 2xYT média do  $OD_{600} = 0,2$ . Následovala přibližně 1,5-2h kultivace na třepačce při 30 °C do dosažení  $OD_{600} \approx 0,5$ . Poté byla kultura chlazená 15 min v ledové lázni. Následovala 10min centrifugace kultury při 4500 x g a teplotě 4 °C a po odstranění média byl pelet resuspendován ve 30 ml GT. Opět byla provedena 10min centrifugace (4500 x g, 4 °C), odstranění supernatantu a resuspendování kultury ve 30 ml GT. Po zopakování centrifugace za stejných podmínek byl pelet resuspendován v 1,2 ml G. Po poslední centrifugaci (11 000 x g, 4 °C, 3 min) byl pelet finálně resuspendován v 1,2 ml G a suspenze kompetentních buněk byla rozdělena po 170  $\mu$ l do 2ml mikrozkušavek. Připravené buňky byly využity k elektroporaci nebo uchovány v -70 °C.

#### 4.10.15 Transformace *C. glutamicum* pomocí elektroporace

##### Materiál:

- Plazmid
- Antibiotikum (30 nebo 20  $\mu$ g/ml kanamycin; 10 nebo 5  $\mu$ g/ml tetracyklin)

##### Postup:

170  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk *C. glutamicum* bylo smícháno s 1-10  $\mu$ g plazmidu. Po přibližně 1min inkubaci v ledové lázni byla směs přenesena do vychlazené elektroporační kyvety (tloušťka skleněné stěny 0,2 mm). K provedení elektroporace byl použit elektroporátor GENE PULSER (parametry elektrického pulzu: napětí 2,5 kV; kapacita 25  $\mu$ F; odpor 600  $\Omega$ ). Poté, co proběhla elektroporace, byl k suspenzi přidán 1 ml 2xYT. Směs byla přenesena do 2ml mikrozkušavky, která byla umístěna do termobloku, kde proběhl tepelný šok (46 °C; 6 min). Následně byly transformované buňky regenerovány 2 hod při 30 °C na rotační třepačce, a poté vysety na pevné médium s příslušným antibiotikem odpovídajícím rekombinantnímu plazmidu. Transformované buňky na pevném médiu byly inkubovány 1-3 dny ve 30 °C.

## 4.10.16 Měření fluorescence v bezbuněčném extraktu

### *C. glutamicum*

#### **Materiál:**

- Pufr PBS; pH  $\approx$  8,0
- 1 M IPTG
- 0,1 M PMSF
- Bradfordovo činidlo [0,1 % (w/v) Coomasie Brilliant Blue G250; 43 % (v/v) EtOH; 8,5 % (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]
- 10 mg/ml BSA
- Antibiotika (30  $\mu$ g/ml kanamycin; 10  $\mu$ g/ml tetracyklin)
- ddH<sub>2</sub>O

#### **Postup:**

Bakteriální kultura byla kultivována 24 h v 10 ml 2xYT s příslušnými antibiotiky odpovídajícími rekombinantním plazmidům. Narostlá kultura posloužila k inokulaci 80 ml 2xYT s týmiž antibiotiky na OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,6. Poté, co nově inokulovaná kultura dosáhla OD<sub>600</sub> = 1, bylo z baňky odebráno 15 ml kultury pro stanovení „bazální hodnoty specifické intenzity fluorescence“. 30 ml kultury bylo přeneseno do nové kultivační baňky, indukováno 30  $\mu$ l 1 M IPTG (čas „0 h“) a dáno třepat. Zbylá kultura byla rovněž dále kultivována a posloužila jako kontrolní neindukovaný vzorek.

Ve stanovených intervalech (většinou 3, 6 a 24 h po indukci) byla odebírána biomasa odpovídající 7,2 mg suché hmotnosti buněk (4 ml při OD<sub>600</sub> = 3,0). Odebraný vzorek byl centrifugován 5 min při 5000 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml vychlazeného pufru PBS, který byl obohacen o inhibitor proteáz PMSF (finální koncentrace PMSF v PBS pufru byla 0,1 mM). Vzorek byl přenesen do 2ml mikrozkušky a centrifugován (1 min; 14 000 x g a 4 °C). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn, pelet resuspendován v 500  $\mu$ l PBS s PMSF a vzorky byly přes noc uchovány v chladu a temnu.

Do speciálních 2ml mikrozkušek určených pro homogenizaci pomocí přístroje FastPrep-24™ bylo připraveno přibližně 200  $\mu$ l skleněných mikrokuliček Balotina (průměr 0,5 mm). Odebrané vzorky byly přeneseny do těchto mikrozkušek a proběhla homogenizace po dobu 1 min při rychlosti 6,5 m/s. Tříkrát homogenizované vzorky byly centrifugovány 20 min při 14 000 x g a teplotě 10 °C. 260  $\mu$ l supernatantu tvořeného bezbuněčným extraktem bylo odebráno do nové 1,5ml mikrozkušky a analyzováno.

Pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976) byla stanovena koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu. V plastových kyvetách bylo smícháno 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l bezbuněčného extraktu a 980  $\mu$ l Bradfordova činidla. Pro stanovení kalibrační křivky byly

použity standardy BSA (0,1 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,75 mg/ml a 1 mg/ml), přičemž v plastových kyvetách bylo smícháno 20  $\mu$ l standardu a 980  $\mu$ l Bradfordova činidla. Po uběhnutí 30 minut inkubace vlastních vzorků a standardů BSA byla pomocí UV-vis spektrofotometru změřena absorbance standardů při vlnové délce 595 nm a ustanovena tak kalibrační křivka, dle které byla vypočtena koncentrace proteinů jednotlivých bezbuněčných extraktů na základě jejich změřené absorbance.

Intenzita fluorescence v bezbuněčných extraktech byla změřena pomocí fluorimetru Tecan Spark<sup>®</sup> dle nastavených parametrů (Tab. 10). Pro samotné měření bylo 200  $\mu$ l bezbuněčného extraktu přeneseno do jamek mikrotitrační destičky Nucleoclone<sup>™</sup> Delta Surface. Změřená intenzita fluorescence (AU) byla vztažena na výslednou koncentraci proteinů v jednotlivých extraktech (AU/mg).

**Tabulka 10.** Nastavení parametrů Tecan Spark<sup>®</sup>.

<b>Parametr měření</b>	<b>Hodnota</b>
Vlnová délka excitace	397 nm
Vlnová délka emise	509 nm
Šířka excitační štěrbin	5 nm
Šířka emisní štěrbin	20 nm
Doba třepání	5 s
Doba usazování	10 s
Mód čtení	spodní
Integrační čas	40 $\mu$ s



## 4.10.17 Transkripční reakce *in vitro*

### Materiál:

- Plazmid pRLG770 s klonovaným fragmentem studovaného promotoru
- Chemikálie na PCR (viz kapitola 4.10.6)
- Amicon Ultra 0,5 ml 30 kDa kit
- Směs fenol:chloroform:izoamylalkohol 25:24:1
- Směs chloroform:izoamylalkohol 24:1
- DEPC H<sub>2</sub>O
- Transkripční pufr 20xTB (400 mM Tris; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT)
- 1M KCl
- 10 mg/ml BSA
- DB [50 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA; 100 μM DTT; 1 mM 2-merkaptoetanol; 233 mM NaCl; 130 mg/ml lysozym; 5% (w/v) glycerol; pH = 8,0]
- NTPs určené pro transkripci (20 mM ATP; 20 mM CTP; 20 mM GTP; 1 mM UTP)
- Radioaktivně označený nukleotid α<sup>32</sup>P-UTP
- Izolované jádro RNAP *C. glutamicum*
- Izolované σ faktory RNAP
- Pufr TBE
- 10 % APS
- TEMED
- PAA gel pufr (5,5% akrylamid, 1xTBE, 7 M močovina)
- Roztok Urea Stop (2x TBE; 7 M močovina; 10 mM EDTA; 1 % SDS; 0,005 % bromfenolová modř; 0,05 % xylencyanol)

### Postup:

Pomocí PCR byl amplifikován fragment obsahující sledovaný promotor klonovaný v plazmidu pRLG770. Podle tabulky (Tab. 11) bylo namícháno 400 μl PCR směsi a v termocykleru proběhl příslušný program (Tab. 12). Vzniklý produkt byl analyzován pomocí agarózové elektroforézy. Následovala purifikace PCR produktu pomocí směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol, jejíž přidání bylo v poměru 1:1 s množstvím vzorku (400 μl). Vzorek byl lehce protřepán a centrifugován při 10 000 x g po dobu 3 min. Po centrifugaci se v roztoku ustanovily horní fáze, mezifáze a spodní fáze. Horní fáze byla přenesena do nové 1,5ml mikrozkušavky, k ní byla přidána směs chloroform:izoamylalkohol v poměru 1:1 s množstvím vzorku a celý krok se opakoval. Přechištěná DNA byla poté zakoncentrována pomocí soupravy Amicon® Ultra 0,5 ml 30 kDa

podle příručky výrobce. Kvalita a množství DNA purifikovaného a zakoncentrované vzorku byla ověřena pomocí Nanophotometru a gelové agarózové elektroforézy.

**Tabulka 11.** Reakční směs pro PCR.

Chemikálie	Objem 1x (50 µl)	Objem 8x (400 µl)
Q5® reakční pufr	10 µl	80 µl
dNTP	1 µl	8 µl
primer 30F	2,5 µl	20 µl
primer CM3	2,5 µl	20 µl
Q5® High GC enhancer	10 µl	80 µl
DNA polymeráza	0,5 µl	4 µl
ddH <sub>2</sub> O	22,5 µl	180 µl
DNA templát	1 µl	-

**Tabulka 12.** Průběh PCR reakce.

Reakce	Teplota (°C)	Čas	počet cyklů
Iniciační denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	35
Hybridizace	55	30 s	
Syntéza	72	40 s	
Konečná syntéza	72	2 min	1

Před samotnou transkripční reakcí byl připraven polyakrylamidový gel pro vertikální gelovou elektroforézu RNA. Nejdříve byl smícháním 10 ml PAA gel pufru, 85,6 µl, 10% APS a 6,9 µl TEMED připraven spodní gel, který byl nalit do elektroforetické aparatury. Po 15min polymeraci při pokojové teplotě byl připraven horní gel (40 ml PAA gel pufru; 343 µl 10% APS a 27,6 µl TEMED), který byl po promíchání nalit do elektroforetické aparatury na polymerovaný spodní gel. Po jeho nalití byly vytvořeny jamky pomocí hřebínku.

V ochranném boxu z plexiskla byla v ledové lázni namíchána reakční směs pro transkripci *in vitro* (Tab. 13). Celkový objem směsi jedné reakce byl 8,5 µl.

Enzymová směs obsahující izolované proteiny jádra RNAP a  $\sigma$  faktorů v poměru 1:30 s DB puforem o celkovém objemu 1,5 µl byla namíchána zvlášť v ledové lázni. Poté byla enzymová směs umístěna na 10 min do termobloku vyhřátého na 37 °C, aby proběhla rekonstituce enzymu. Následně byla k enzymové směsi přidána reakční směs a dalších 10 min v termobloku probíhala transkripční reakce. Reakce byla zastavena přidáním 10 µl Urea stop roztoku, tj. v poměru 1:1 k reakční směsi. Směs byla přenesena do elektroforetické jamky. Elektroforéza běžela po dobu 4 h při napětí 140 V.

Po proběhnutí elektroforézy byl gel přesunut z aparatury na chromatografický papír WHATMAN a sušen 45 min při teplotě 80 °C pomocí vakuové sušičky gelů. Následně byl 30 min chlazen bločky z plexiskla (odstínění radioaktivního záření) a nakonec umístěn do

expoziční kazety s folií na absorbování radioaktivity. Po 24h expozici byla folie skenována pomocí přístroje Amersham Typhoon Scanner a výsledek byl analyzován pomocí programu ImageQuantTL.

**Tabulka 13.** Složení reakční směsi na transkripci.

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem</b>	<b>Finální koncentrace</b>
20xTB	0,5 µl	1x
KCl	0,9 µl	90 mM
BSA	0,1 µl	100 µg/ml
purifikovaný DNA templát	0,7 µl	150 ng DNA
ATP	0,1 µl	200 µM
CTP	0,1 µl	200 µM
GTP	0,1 µl	200 µM
UTP	0,1 µl	10 µM
α <sup>32</sup> P-UTP	0,1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	5,8 µl	

## 5 Výsledky

Hlavním cílem práce bylo objasnit fungování základních stresových  $\sigma$  regulonů u bakterií *R. erythropolis* a *R. opacus* a porovnat nabyté znalosti s poznatky o stresových regulonech *C. glutamicum*. Zároveň se práce zaměřila i na studium  $\sigma^M$  regulonu *C. glutamicum* a jeho překryvů s regulony faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ , neboť  $\sigma^M$  regulon *C. glutamicum* zatím zůstal jako jediný z regulonů ECF  $\sigma$  faktorů *C. glutamicum* neprobádán.

### 5.1 Překryvy stresových $\sigma$ regulonů u

#### *C. glutamicum*

Bakterie *C. glutamicum* je využívána v biotechnologiích jako velmi efektivní producent aminokyselin, biopaliv a heterologních proteinů. V naší *Laboratoři modulace genové exprese* se věnujeme studiu  $\sigma$  faktorů a jejich regulonů u této bakterie. S využitím metod sekvenování RNA (ve spolupráci s *Laboratoří mikrobiální genomiky a biotechnologií* na Univerzitě v Bielefeldu), metod *in vivo* (měření aktivity promotorů ve dvouplazmidových systémech *C. glutamicum*), *in vitro* (transkripce *in vitro*) a *in silico* (homologní modelování a simulace molekulární dynamiky) se nám podařilo charakterizovat regulony všech ECF  $\sigma$  faktorů ( $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$ ) s výjimkou  $\sigma^M$ . Navíc jsme prokázali, že regulony některých  $\sigma$  faktorů se překrývají. Byl tak prokázán a analyzován překryv regulonu  $\sigma^E$  s regulonem  $\sigma^H$  (Busche *et al.*, 2023; Dostálová *et al.*, 2017; Šilar *et al.*, 2016). I další výsledky naznačují, že s faktorem  $\sigma^H$  sdílí překryv regulonů téměř všechny ECF faktory *C. glutamicum*, tedy  $\sigma^C$  (nepublikované výsledky laboratoře),  $\sigma^D$  (Dostálová *et al.*, 2019) a  $\sigma^M$  (Dostálová, 2020). V následujících kapitolách jsme využili cílené mutagenese a *in silico* metod (homologní modelování a simulace molekulární dynamiky) k objasnění interakcí hrajících roli v překryvech rekogniční specifity faktorů  $\sigma^D$  s  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  s  $\sigma^H$ .

#### 5.1.1 Překryvy regulonů faktorů $\sigma^D$ a $\sigma^H$ u *C. glutamicum*

Faktor  $\sigma^H$  je považován za globální regulátor stresové odpovědi *C. glutamicum*. Bývá spojován s teplotním a oxidativním stresem, ale jeho úloha je daleko širší, neboť se rovněž podílí na expresi genu faktoru  $\sigma^B$ , který nahrazuje úlohu vegetativního faktoru  $\sigma^A$  během stacionární fáze růstu. Je známo, že konsenzuální sekvence pro oblasti -35 (gGGAA<sup>T</sup>/G) a -10 (GTT)  $\sigma^H$ -dependentních promotorů se velmi podobají těm pro  $\sigma^E$ -dependentní promotory, tedy GGAAC pro oblast -35 a GTT pro oblast -10, což vede i k překryvu regulonů faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  (Busche *et al.*, 2023). Oproti tomu faktor  $\sigma^D$ , který se uplatňuje během poškození buněčné stěny, je považován za velmi specifický  $\sigma$  faktor.

$\sigma^D$ -dependentní promotory s konsenzuálními sekvencemi GTAAC<sup>A/G</sup> (-35 oblast) a GAT (-10 oblast) bývají rozpoznávány pouze faktorem  $\sigma^D$  (Toyoda a Inui, 2018).

Tuto představu o unikátnosti  $\sigma^D$ -dependentních promotorů však narušila analýza výsledků sekvenování RNA kmenů nadprodukcujících faktor  $\sigma^D$ , kdy byly mezi 29 nadexprimovanými geny nalezeny geny *cg607* a *lpd*. Promotor genu *cg0607* má oblast -35 tvořenou sekvencí nukleotidů GGAA, která je typická pro  $\sigma^E/\sigma^H$ -dependentní promotory *C. glutamicum*, a oblast -10 (GAT), která je naopak typická pro  $\sigma^D$ -dependentní promotory. Gen pro dihydrolipoamid dehydrogenázu (*lpd*) má promotor *Pcg0441*, který se skládá ze sekvencí CTAAC (oblast -35) a GTT (oblast -10), takže -10 oblast *Pcg0441* je shodná s konsenzuální sekvencí pro -10 oblast  $\sigma^H$ -dependentních promotorů, zatímco -35 oblast odpovídá svou sekvencí  $\sigma^D$ -dependentním promotorům (Dostálová *et al.*, 2019). S využitím kombinace metod *in silico* (homologní modelování, molekulární dynamika) a *in vivo* (měření aktivity promotorů ve dvouplazmidovém systému *C. glutamicum*) byla analyzována interakce faktorů  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  s přirozeným hybridním promotorem *Pcg0441* (*P<sub>lpd</sub>*) (Tab. 14). V dřívějších měřeních byl studován i syntetický hybridní promotor *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>*, který byl vytvořen kombinací  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *PrsdA* (sekvence -35 oblasti GTAAC) a  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* (sekvence oblastí -10 GTT) při snaze o vytvoření striktně regulovaného expresního systému, v němž by hybridní  $\sigma$  faktor RNAP *C. glutamicum* rozeznával pouze hybridní promotor a neovlivňoval expresi vlastních genů hostitele (Blumenstein, 2019) (Tab. 14). Tento promotor sloužil jako srovnání s přirozeným hybridním promotorem *Pcg0441* a k ucelení představy o modelu interakce sledovaných faktorů  $\sigma$  s příslušnými promotory. Dále byly zkonstruovány 4 mutantní varianty faktoru  $\sigma^H$  (Blumenstein, 2019) s takovými záměnami v doméně  $\sigma_4$ , aby nově rozpoznávaly -35 promotorovou oblast  $\sigma^D$ -dependentních promotorů namísto -35 promotorové oblasti  $\sigma^H$ -dependentních promotorů.

**Tabulka 14.** Analyzované promotory.

Gen	Sekvence promotoru <sup>a</sup>	Název promotoru
<i>cg0441</i> ( <i>lpd</i> )	ATTTTCGGCAGAGTG <b>CTAAC</b> GGTTAGGCACTATTTTCC <b>GTT</b> AGTTCTTTT <b>G</b>	<i>Pcg0441</i>
<i>uvrD3</i>	TTTAACCGCTATCT <b>GGAAT</b> GATTGATAGCTCCCAAGT <b>GTT</b> GTATCTATT <b>C</b>	<i>PuvrD3</i>
<i>rsdA</i>	GGTCAGCGATGGAA <b>GTAAC</b> AGAGTTAGGGAACCTTC <b>GAT</b> CTACTGAGT <b>G</b>	<i>PrsdA</i>
<i>rsdA/uvrD3</i>	GGTCAGCGATGGAA <b>GTAAC</b> AGAGTTAGGGTCCCAAGT <b>GTT</b> GTATCTATT <b>C</b>	<i>PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub></i>

<sup>a</sup>Zeleně jsou vyznačeny oblasti zodpovědné za interakci s faktorem  $\sigma^D$  a červeně oblasti zodpovědné za interakci s faktorem  $\sigma^H$ . Podtržené jsou klíčové oblasti promotoru -35, -10 a TSS.

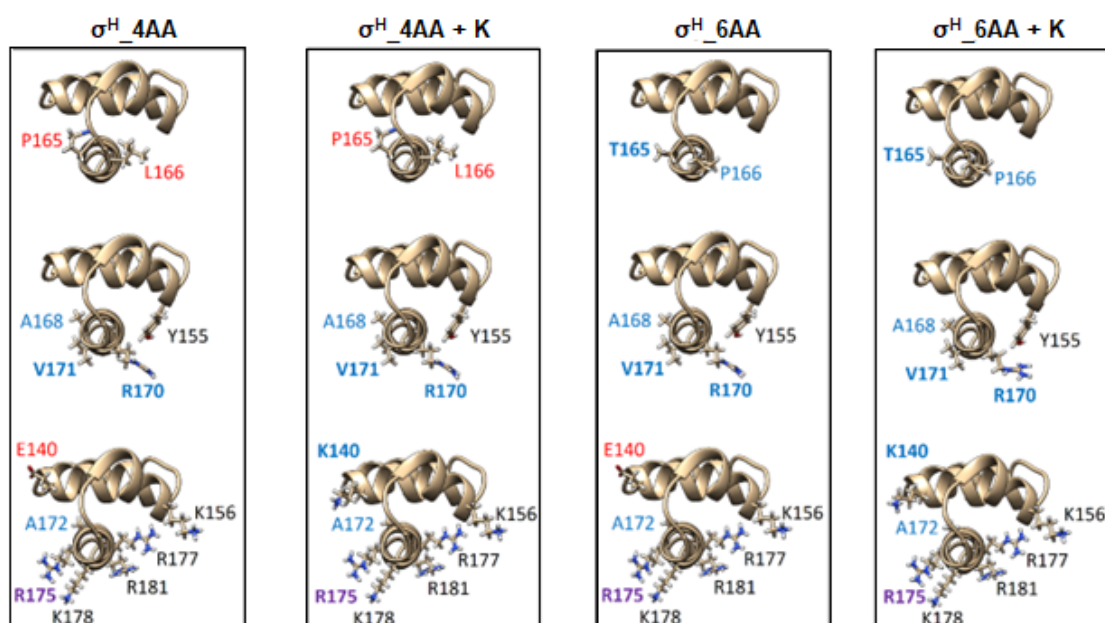
### 5.1.1.1 Mutantní varianty faktoru $\sigma^H$ *C. glutamicum*

Na základě homologního modelování a simulace molekulární dynamiky (Dr. Ivan Barvík; Fyzikální ústav UK Praha) byly navrženy a dále zkonstruovány mutantní varianty faktoru  $\sigma^H$  se záměnami v doméně  $\sigma_4$  (Tab. 15) (Obr. 8), které měly změnit afinitu

k oblasti -35  $\sigma^H$ -dependentního promotoru (GGAAT) a umožnit interakci s oblastí -35  $\sigma^D$ -dependentního promotoru (GTAAC) (Blumenstein, 2019; Dostálová *et al.*, 2019). Tyto varianty byly použity i v této práci.

**Tabulka 15.** Mutantní varianty faktoru  $\sigma^H$  se sekvenční změnou v doméně  $\sigma_4$ .

Původní $\sigma$ faktor	Název mutace	Sekvenční změna
$\sigma^H$	$\sigma_{4AA}$	$T^{168}M^{170}S^{171}R^{172} \rightarrow A^{168}R^{170}V^{171}A^{172}$
	$\sigma_{4AA} + K$	$E^{140} T^{168}M^{170}S^{171}R^{172} \rightarrow K^{140} A^{168}R^{170}V^{171}A^{172}$
	$\sigma_{6AA}$	$P^{165}L^{166}T^{168}M^{170}S^{171}R^{172} \rightarrow T^{165}P^{166}A^{168}R^{170}V^{171}A^{172}$
	$\sigma_{6AA} + K$	$E^{140} P^{165}L^{166}T^{168}M^{170}S^{171}R^{172} \rightarrow K^{140} T^{165}P^{166}A^{168}R^{170}V^{171}A^{172}$



**Obrázek 8.** Doména  $\sigma_4$  mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  a aminokyseliny zodpovědné za interakci s -35 promotorovou oblastí. Aminokyseliny přítomné v původním faktoru jsou označeny červenou barvou, zatímco aminokyseliny přítomné v mutantní variantě jsou označeny modrou barvou. Zvýrazněny jsou aminokyseliny, jejichž role byla zásadní v simulacích molekulární dynamiky. Pro přehlednost jsou aminokyseliny zobrazeny odděleně: (nahore) aminokyseliny rozlišující mutanty  $\sigma^H_{4AA}$  a  $\sigma^H_{6AA}$ ; (uprostřed) aminokyseliny z původní sady mutací  $\sigma^H_{4AA}$ , které byly mutovány ve všech případech; (dole) aminokyselina v poloze 140, kde má  $K^{140}$  kompenzovat mutaci  $R^{172}$  na  $A^{172}$ . Dále klíčový  $R^{175}$ , který interaguje s nukleotidem v poloze -35, a bazické aminokyseliny  $K^{178}$ ,  $R^{181}$ ,  $R^{177}$  a  $K^{156}$ , které jsou důležité pro interakci s cukr-fosfátovou kostrou nukleových kyselin.

#### 5.1.1.1.1 $\sigma^H_{4AA}$

V první sledované mutantní variantě byla v centrálním helixu domény  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  (Tab. 15), který zodpovídá za rozpoznávání oblasti -35 promotoru, provedena záměna sekvence aminokyselin 168-Thr-Val-Met-Ser-Arg-172 na sekvenci 168-Ala-Val-Arg-Val-Ala-172 (Dostálová *et al.*, 2019). Protože  $V^{169}$  nebyl mutován, byly změněny pouze 4 aminokyseliny. Tato mutantní varianta je dále označována jako  $\sigma^H_{4AA}$ . Změny v doméně

$\sigma_4$  měly způsobit, že tato varianta faktoru  $\sigma^H$  bude rozpoznávat hybridní promotory  $PD_{35}H_{10}$  a  $Pcg0441$  díky schopnosti vázat se na oblast  $-35 \sigma^D$ -dependentních promotorů.

#### 5.1.1.1.2 $\sigma^H_{4AA} + K$

Další mutantní varianta faktoru  $\sigma^H$  měla kromě 4 změn aminokyselin v doméně  $\sigma_4$  změněný  $E^{140}$  na  $K^{140}$  (Tab. 15). Důvodem této změny bylo to, že počítačové modely ukázaly interakci  $K^{140}$  v  $\sigma^D$  se stejnými fosfátovými skupinami jako  $R^{172}$  v  $\sigma^H$ . Zajímavé je, že  $K^{140}$  v  $\sigma^D$  se nachází mimo centrální helix domény  $\sigma_4$  (Obr. 8), ale jeho dlouhý a flexibilní postranní řetězec směřuje přesně na stejné místo jako  $R^{172}$  v  $\sigma^H$ . Vzhledem k přítomnosti  $K^{140}$  byla tato mutantní varianta pojmenovaná  $\sigma^H_{4AA} + K$ .

#### 5.1.1.1.3 $\sigma^H_{6AA}$

Další dvě aminokyseliny v  $\sigma^D$  ( $T^{165}$ ,  $P^{166}$ ) a v  $\sigma^H$  ( $P^{165}$ ,  $L^{166}$ ) v blízkosti mutované sekvence  $\sigma^H$  168-Ala-Val-Arg-Val-Ala-172 nejsou mezi  $\sigma^H$  a  $\sigma^D$  konzervovány (Obr. 8). Proto byla navržena a zkonstruována další mutantní varianta faktoru  $\sigma^H$  rozpoznávající oblast  $-35 \sigma^D$ -dependentního promotoru. V sekvenci centrálního helixu domény  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  došlo ke změně sekvence aminokyselin 165-Pro-Leu-Gly-Thr-Val-Met-Ser-Arg-172 na 165-Thr-Pro-Gly-Ala-Val-Arg-Val-Ala-172 (Tab. 15). Celkově tak bylo změněno 6 aminokyselin, a proto byla mutantní varianta pojmenovaná  $\sigma^H_{6AA}$ .

#### 5.1.1.1.4 $\sigma^H_{6AA} + K$

Poslední vytvořená mutantní varianta faktoru  $\sigma^H$  obsahovala všechny uvedené změny v sekvenci aminokyselin jako mutantní varianta  $\sigma^H_{6AA}$  (Tab. 15). Navíc však obsahovala ještě změnu  $E^{140} \rightarrow K^{140}$ , která je přítomna v mutantní variantě  $\sigma^H_{4AA} + K$  (Obr. 8).

### 5.1.1.2 Měření aktivity promotorů *in vivo* ve dvouplazmidovém systému

#### *C. glutamicum*

K této analýze byly použity 4 promotory: striktně  $\sigma^D$ -dependentní *PrsdA*, striktně  $\sigma^H$ -dependentní *PuvrD3*, přirozený  $\sigma^D/\sigma^H$  hybrid *Pcg0441* a umělý hybrid  $PD_{35}H_{10}$  (tab. 14). Konstrukty expresního vektoru pEC-XT99A s mutantními variantami faktoru  $\sigma^H$  ( $\sigma^H_{4AA}$ ,  $\sigma^H_{4AA} + K$ ,  $\sigma^H_{6AA}$  a  $\sigma^H_{6AA} + K$ ) a promotor-test vektoru pEC-XT99A se sledovanými promotory byly vytvořeny během předchozích experimentů (Blumenstein, 2019; Dostálová *et al.*, 2019). Dvouplazmidové systémy nesoucí konstrukt expresního vektoru pEC-XT99A s mutantními variantami  $\sigma^H_{4AA} + K$ ,  $\sigma^H_{6AA}$  a  $\sigma^H_{6AA} + K$  (Vytvořil Dr. Václav Štěpánek)

a konstrukt promotor-test vektoru pEPR1 s vloženým přirozeným hybridem *Pcg0441* byly vytvořeny v této práci.

Nejdříve proběhla elektroporační transformace buněk *C. glutamicum* ATCC 13032 expresními vektory s naklonovanými geny pro sledované  $\sigma$  faktory (pEC-XT99A*sig*,X“). Následovalo vyšetření transformantů na 2xYT plotny s tetracyklinem. Plazmidy izolované z náhodně vybraných narostlých klonů byly ověřeny restrikční analýzou prostřednictvím enzymu PstI. Z odpovídajícího kmene byly opět vytvořeny kompetentní buňky, které byly transformovány promotor-test vektorem pEPR1 s naklonovaným sledovaným promotorem. Po výsevu na 2xYT plotny s tetracyklinem i kanamycinem následovalo ověření získaných klonů pomocí restrikční analýzy PstI a také PCR s užitím vektorových primerů TRPTCGF1 + GFP1 a PCR BIO HS *Taq* Mix Red. Vytvořené kmeny obsahující oba konstrukty (pEC-XT99A+*sig* gen a pEPR1+promotor) byly uchovány v glycerolových konzervách v -80 °C a využity pro měření aktivity promotorů *in vivo*. Měření aktivity promotorů *in vivo* umožnil promotor-test vektor pEPR1, který nesl vložený sledovaný promotor před reportérovým genem *gfpUV*, a expresní vektor pEC-XT99A, který nesl gen pro analyzovaný  $\sigma$  faktor exprimovaný z IPTG-inducibilního promotoru *P<sub>trc</sub>*. Jako negativní kontrola byly použity dvouplazmidové systémy obsahující prázdný vektor pEC-XT99A.

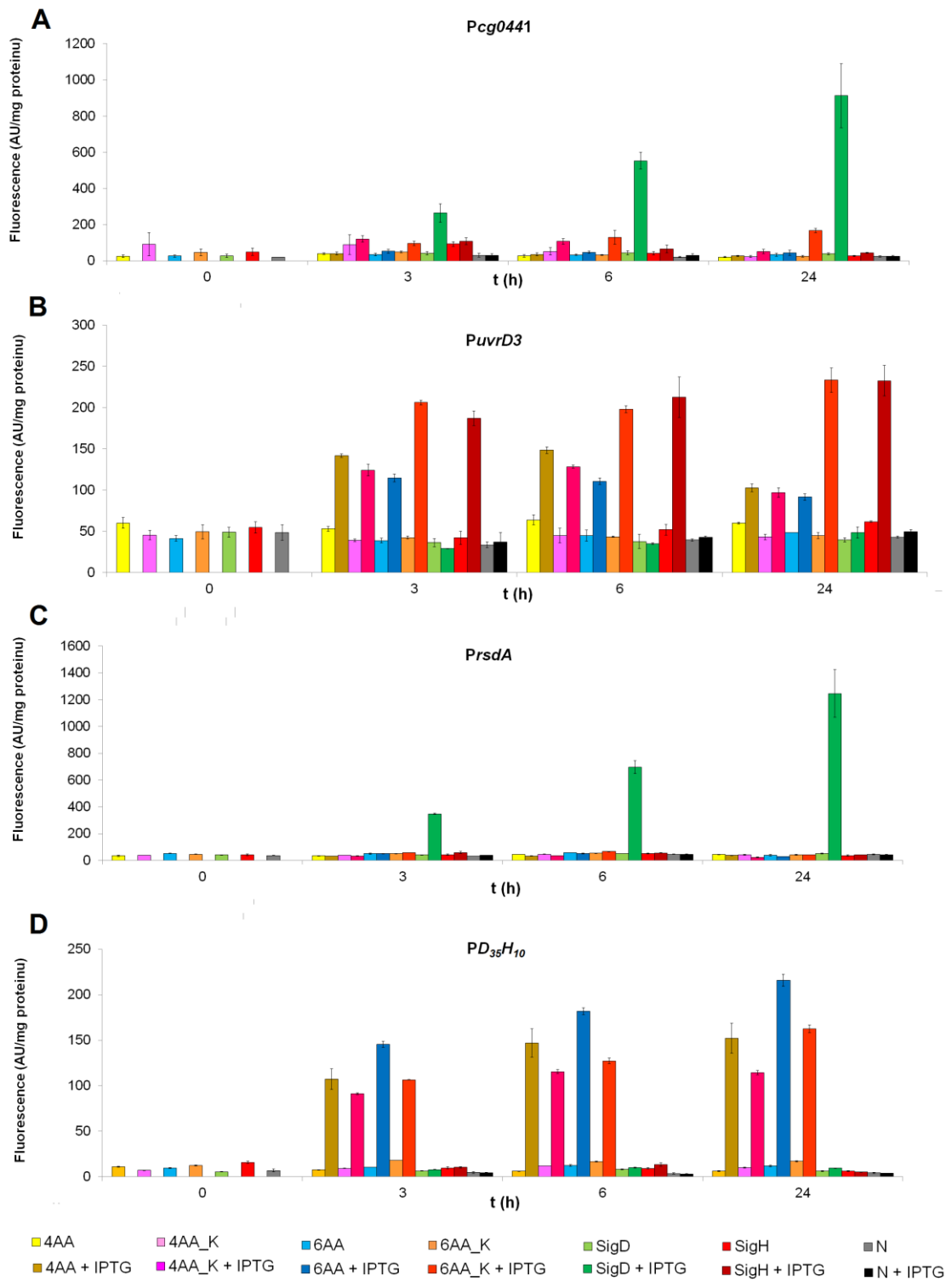
Prvním sledovaným promotorem byl přirozený hybridní promotor *Pcg0441* (Obr. 9A). Nejvyšší nárůst fluorescence (aktivity promotoru) byl naměřen v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^D$ , přičemž tento nárůst dosáhl vrcholu ve 24. hodině, kdy byl dvacetinásobný oproti neindukovanému stavu (dále v práci vyjádřeno jako indukční poměr IP, tedy kolikrát je aktivita promotoru po indukci vyšší než před ní). Oproti tomu v případě buněk nadprodukcujících přirozený faktor  $\sigma^H$  byl nárůst aktivity promotoru téměř nepatrný (IP = 1,5). Zajímavý výsledek poskytly buňky s nadprodukovanými mutantními variantami faktoru  $\sigma^H$ , kdy u složitějších mutant s pozměněným E<sup>140</sup> na K<sup>140</sup> došlo v 6. h k výraznému nárůstu aktivity promotoru (IP = 2 pro  $\sigma^H$ \_4AA + K, IP = 4 pro  $\sigma^H$ \_6AA + K). Naopak u variant  $\sigma^H$ \_4AA a  $\sigma^H$ \_6AA nedošlo téměř k žádnému nárůstu a aktivity promotoru byly srovnatelné s negativní kontrolou.

Dalším sledovaným promotorem byl promotor *P<sub>uvrD3</sub>* (Obr. 9B). Podle očekávání zde došlo ke značnému nárůstu aktivity promotoru v buňkách s nadprodukcí přirozeného faktoru  $\sigma^H$ , který ve 24. hodině po indukci dosáhl maxima (IP = 3,4). Překvapivý výsledek však poskytly jeho mutantní varianty, kdy ve všech kmenech s těmito variantami došlo po přidání induktoru k velkému nárůstu aktivity promotoru. V případě nejkompexnější mutantní varianty  $\sigma^H$ \_6AA + K se dokonce naměřená aktivita promotoru vyrovnala buňkám nadprodukcujícím přirozený faktor  $\sigma^H$ . Nárůst aktivity v buňkách s nadprodukovaným faktorem  $\sigma^D$  byl srovnatelný s negativní kontrolou, což se očekávalo.



Promotor *PrsdA* (Obr. 9C) se podle očekávání projevil jako silný specifický  $\sigma^D$ -dependentní promotor, neboť nastal vysoký nárůst aktivity promotoru v buňkách obsahujících nadprodukovaný faktor  $\sigma^D$ , který dosáhl svého vrcholu ve 24. hodině po indukci (IP = 25). U ostatních kmenů byla aktivita promotorů po celou dobu kultivace srovnatelná s negativní kontrolou.

U syntetického hybridního promotoru *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* (Obr. 9D) došlo dle předpokladu k vysokému nárůstu aktivity promotoru ve všech kmenech nadprodukujících mutantní varianty faktoru  $\sigma^H$ . Zajímavé je, že oproti přirozenému hybridnímu promotoru *Pcg0441* byla největší aktivita promotorů změřena v přítomnosti mutantních variant  $\sigma^H_{4AA}$  a  $\sigma^H_{6AA}$ , u nichž nedošlo k záměně E<sup>140</sup> za K<sup>140</sup>, přičemž největší nárůst aktivity promotoru nastal v případě nadprodukovaného faktoru  $\sigma^H_{6AA}$  ve 24. hodině po indukci (IP = 18). Velmi mírný nárůst aktivity promotoru byl naměřen v buňkách s nadprodukovaným přirozeným faktorem  $\sigma^H$  v 6. hodině (IP = 2,4), zatímco aktivita promotoru *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* v buňkách s nadprodukovaným faktorem  $\sigma^D$  byla srovnatelná s negativní kontrolou.



**Obrázek 9. Měření aktivity promotorů *Pcg0441*, *PuvrD3*, *PrsdA*, *PD<sub>35H10</sub>* *in vivo*.** N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny patří vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.

### 5.1.1.3 Homologní modelování a simulace interakce mezi promotorem a faktory $\sigma^D$ a $\sigma^H$ u *C. glutamicum* pomocí molekulární dynamiky

Počítačové modelování interakce mezi  $\sigma$  faktory a promotory *C. glutamicum* proběhlo ve spolupráci s Dr. Ivanem Barvíkem. S využitím znalostí o struktuře  $\sigma$  faktorů skupiny 4 u bakterií, o  $\sigma^D$ - či  $\sigma^H$ -dependentních promotorech *C. glutamicum* a výstupech předchozích měření v rámci naší skupiny byl navržen model interakce mezi oblastí -35 promotoru a  $\sigma$  faktorem.

Veškeré homologní modelování bylo prováděno na základě známé krystalické struktury ECF faktoru  $\sigma^E$  *E. coli*, jelikož krystalické struktury  $\sigma$  faktorů skupiny 4 *C. glutamicum* nebyly doposud získány (Lane a Darst, 2006). Modelovány byly interakce  $\sigma$  faktorů se sekvencí DNA promotorů *PrsdA* ( $\sigma^D$ -dependentní promotor genu pro anti- $\sigma$  faktor  $\sigma^D$  *C. glutamicum*), *PuvrD3* ( $\sigma^H$ -dependentní promotor genu pro UvrD3 helikázu *C. glutamicum*), *Pcg0441* (přirozený  $\sigma^D/\sigma^H$ -dependentní hybridní promotor genu pro dihydrolipoamid dehydrogenázu *C. glutamicum*) a *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* (syntetický hybridní promotor složený z promotorů *PrsdA* a *PuvrD3*) (Tab. 14).

Interakce mezi aminokyselinami a nukleotidy lze rozdělit na sekvenčně specifické, které zahrnují určité báze DNA, a sekvenčně nespecifické, které zahrnují negativně nabitou cukr-fosfátovou kostru DNA přitahující dlouhé a flexibilní postranní řetězce bazických aminokyselin (argininů nebo lysinů). Dále se zapojují aminokyseliny s hydroxylovými skupinami (tyrosin nebo threonin), které mohou vytvářet vodíkové vazby.

#### 5.1.1.3.1 Nukleotidy uplatňující se v interakci mezi doménou $\sigma_4$ a promotorem

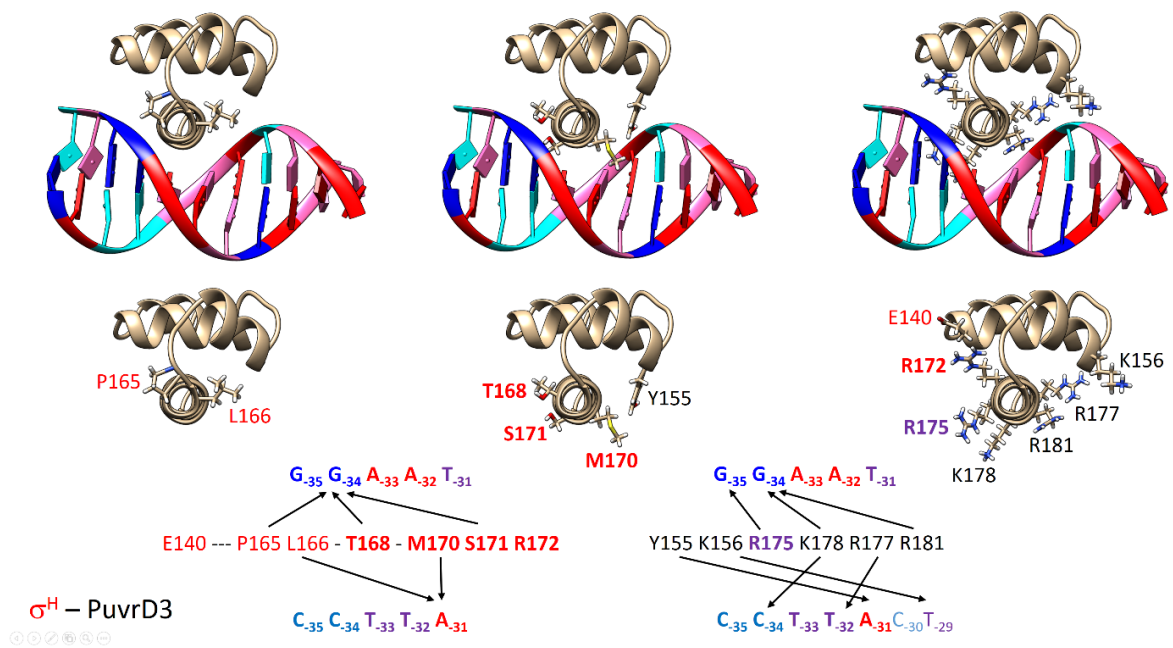
U promotorů *Pcg0441*, *PuvrD3*, *PrsdA* a *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* báze na „první“ a „druhé“, tj. -35 a -34 pozici v rámci oblasti -35 netemplátového vlákna DNA (**CTA**AC / **GG**AAT / **GT**AAC) a báze na „páté“, tj. -31 pozici opačného (templátového) řetězce DNA (GATT**G** / CCTT**A** / CATT**G**) se podílely na nejdůležitějších sekvenčně specifických interakcích s polárními aminokyselinami domény  $\sigma_4$  (Obr. 10, 11).

Zejména báze C<sub>-35</sub>, T<sub>-34</sub> (netemplátové vlákno) a G<sub>-31</sub> (templátové vlákno)  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *Pcg0441* se uplatňují v těchto interakcích. V případě  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* (Obr. 10) se uplatňují báze G<sub>-35</sub>, G<sub>-34</sub> (netemplátové vlákno) a A<sub>-31</sub> (templátové vlákno). U zbývajících sledovaných promotorů, tedy  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *PrsdA* (Obr. 11) a hybridního promotoru *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>*, se uplatňují v interakcích báze G<sub>-35</sub>, T<sub>-34</sub> (netemplátové vlákno) a G<sub>-31</sub> (templátové vlákno).

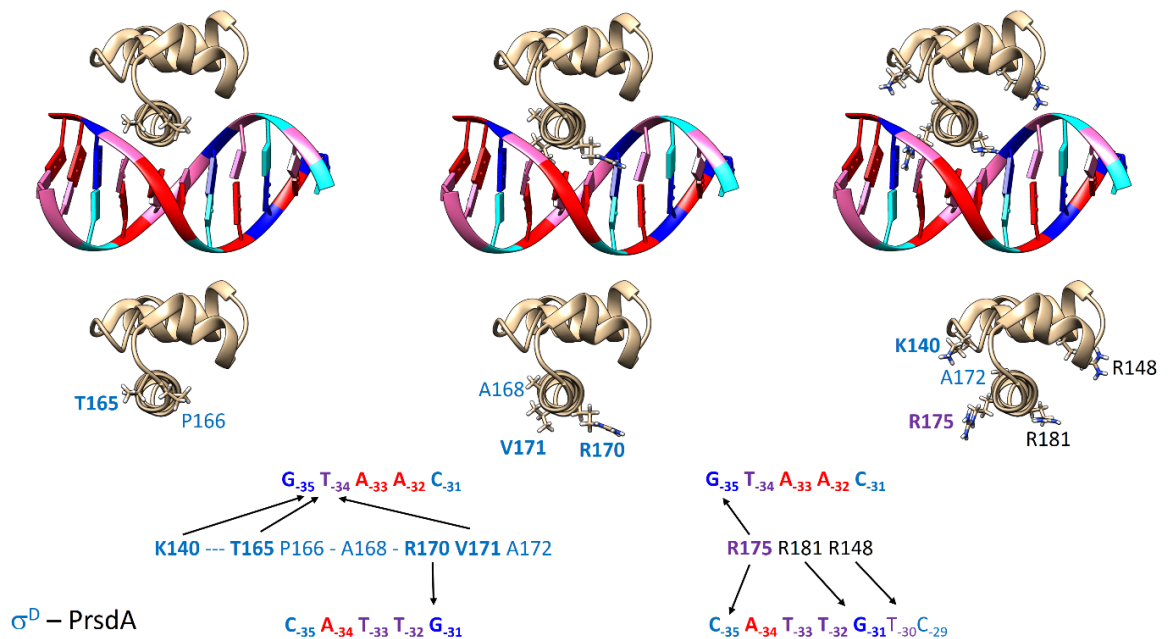
Kromě toho jsou konzervované báze -33, -32 (přesněji AA/TT v netemplátovém/templátovém řetězci DNA) v těsném kontaktu s  $\alpha$ -helixem regionu  $\sigma_{R4.2}$  faktorů  $\sigma^H$  (Obr. 10) a  $\sigma^D$  (Obr. 11) mezi aminokyselinami v polohách 170 a 171 (tj. M<sup>170</sup>,

S<sup>171</sup> nebo R<sup>170</sup>, V<sup>171</sup>), které byly mutovány. Metylové skupiny bází T<sub>-33</sub> a T<sub>-32</sub> se podílejí na stabilizaci hydrofobních interakcí, a to zejména s objemným nepolárním postranním řetězcem V<sup>171</sup> (Obr. 11).

Kromě toho může být několik nukleotidů obklopujících kanonickou oblast -35 v mírném kontaktu s mutovanými aminokyselinami, což může do jisté míry modulovat rozpoznávání mezi specifickými  $\sigma$  faktory a promotory. Například nukleotid -30 interaguje s aminokyselinou R<sup>170</sup> nebo M<sup>170</sup>, zatímco nukleotidy -37, -36 interagují jen s aminokyselinou K<sup>140</sup> a nikoliv E<sup>140</sup>.



**Obrázek 10. Doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  interagující s oblastí -35 promotoru PuvrD3.** Aminokyseliny přítomné ve faktoru  $\sigma^H$ , které byly mutovány, jsou označeny červenou barvou. Aminokyseliny, které se ukázaly jako důležité během simulací molekulární dynamiky, jsou tučně zvýrazněny. Pro přehlednost jsou aminokyseliny zobrazeny odděleně: (vlevo) mutované pouze v 6AA mutantech; (uprostřed) mutované ve všech mutantních variantách faktoru  $\sigma^H$ ; (vpravo) aminokyselina E<sup>140</sup>, která byla mutována v  $\sigma^H_{4AA} + K$  a  $\sigma^H_{6AA} + K$ , aby kompenzovala mutaci R<sup>172</sup> → A<sup>172</sup>. Tj. tak, aby v místě, které by mohlo interagovat s negativně nabitou kostrou nukleové kyseliny, byl přítomen kladně nabitý postranní řetězec aminokyseliny. Dále je zde zobrazena aminokyselina R<sup>175</sup>, která interaguje s nukleotidovou bází v poloze -35, a bazické aminokyseliny K<sup>178</sup>, R<sup>171</sup>, R<sup>177</sup> a K<sup>156</sup>, které jsou důležité pro interakci s cukr-fosfátovou kostrou nukleových kyselin.



**Obrázek 11. Doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$  interagující s oblastí -35 promotoru *PrsdA*.** Aminokyseliny přítomné ve faktoru  $\sigma^D$ , které byly mutovány, jsou označeny modrou barvou. Aminokyseliny, které se ukázaly jako důležité během simulací molekulární dynamiky, jsou tučně zvýrazněny. Pro přehlednost jsou aminokyseliny zobrazeny odděleně: (vlevo) mutované pouze v  $\sigma_{6AA}$  mutantech; (uprostřed) mutované ve všech mutantních variantách faktoru  $\sigma^H$ ; (vpravo) aminokyselina K<sup>140</sup>, která v mutantech  $\sigma^H_{4AA} + K$  a  $\sigma^H_{6AA} + K$  kompenzovala mutaci R<sup>172</sup> → A<sup>172</sup>. Dále je zde zobrazena aminokyselina R<sup>175</sup>, která interaguje s nukleotidovou bází v pozici -35 a bazické aminokyseliny R<sup>181</sup> a R<sup>148</sup>, které jsou důležité pro interakci s cukr-fosfátovou kostrou nukleových kyselin.

### 5.1.1.3.2 Aminokyseliny domény $\sigma_4$ odpovídající za interakci s promotorem

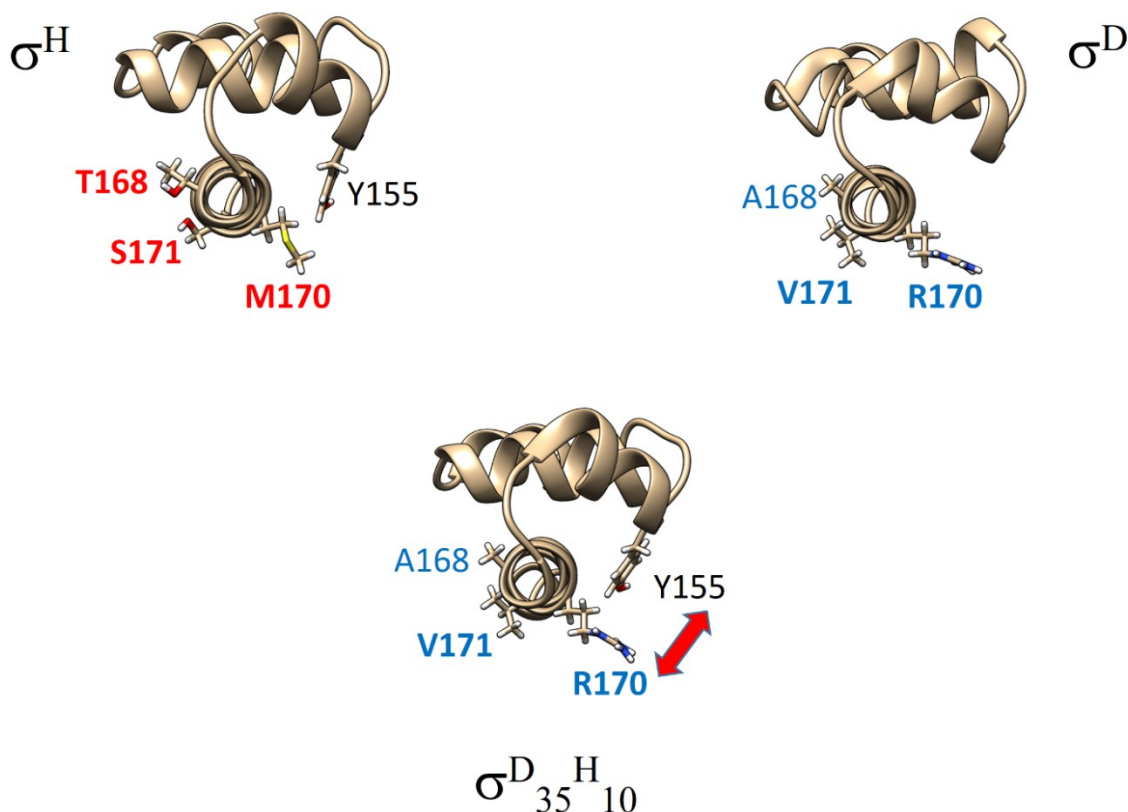
Za interakci oblastí -35 promotoru zodpovídá centrální helix regionu  $\sigma_{R4.2}$  faktorů  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$ .

Báze G/A v pozici -31 templátového vlákna DNA interaguje s aminokyselinou R<sup>170</sup> faktoru  $\sigma^D$  (Obr. 11). Zejména pokud se G nachází v poloze -31, mohou vzniknout až dvě stabilizační vodíkové vazby. Alternativně může dlouhý flexibilní postranní řetězec R<sup>170</sup> vytvořit tzv. solný můstek se záporně nabitými fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry DNA.

V případě faktoru  $\sigma^H$  interaguje báze G/A v pozici -31 s M<sup>170</sup> (Obr. 10). Methionin nemůže vytvářet vodíkové vazby s bázemi nebo solné můstky s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry DNA jako R<sup>170</sup>. Postranní řetězec M<sup>170</sup> však utváří pevný klastr s postranními řetězci aminokyselin L<sup>166</sup>, Y<sup>155</sup> a R<sup>177</sup> (Obr. 10), které nejsou přítomny v  $\sigma^D$ . Poslední dvě jmenované aminokyseliny interagují s cukr-fosfátovou kostrou DNA. Zdá se, že takto může přítomnost suboptimálního interakčního partnera A<sub>-31</sub>/G<sub>-31</sub> v blízkosti M<sup>170</sup> vést jak ke stabilizaci, tak i k destabilizaci komplexu  $\sigma$  faktor-promotor.

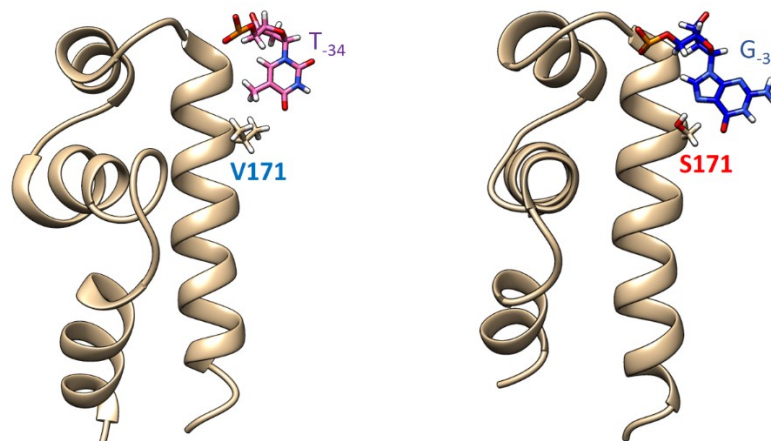
V případě mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  dochází ke specifické situaci (Obr. 12). Je zde R<sup>170</sup> z faktoru  $\sigma^D$ , ale také aminokyseliny L<sup>166</sup>, Y<sup>155</sup> a R<sup>177</sup> z faktoru  $\sigma^H$ . Při simulacích

molekulární dynamiky trvalo poměrně dlouho, než se dlouhé postranní řetězce R<sup>170</sup> a Y<sup>155</sup> uvolnily a správně usadily do uspořádání bez vzájemných sterických střetů (Obr. 12).



**Obrázek 12. Specifická situace mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  ( $\sigma^D_{35} \sigma^H_{10}$  na obrázku dole).** Nachází se zde jak aminokyselina R<sup>170</sup> z faktoru  $\sigma^D$  (vpravo nahoře), tak Y<sup>155</sup> z faktoru  $\sigma^H$  (vlevo nahoře). Při simulacích molekulární dynamiky trvalo poměrně dlouho, než se dlouhé postranní řetězce R<sup>170</sup> a Y<sup>155</sup> uvolnily a správně usadily do uspořádání bez vzájemných sterických střetů. Optimální interakce R<sup>170</sup> s bází -31 byla tedy většinou pozorována, když prostorově blízký Y<sup>155</sup> nebyl vázán na fosfátovou skupinu DNA. Sterické konflikty mezi R<sup>170</sup> a Y<sup>155</sup> by mohly být jedním z důvodů, proč jsme u mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  obecně pozorovali slabší aktivitu *in vivo* (Obr. 9), než jaké bylo dosaženo u faktoru  $\sigma^D$ , kterému Y<sup>155</sup> chybí.

Báze G/T v poloze -34 netemplátového vlákna DNA interagují s aminokyselinami, které jsou specifické pro faktory  $\sigma^H$  (S<sup>171</sup>) a  $\sigma^D$  (V<sup>171</sup>). Zatímco S<sup>171</sup> vytváří stabilizační vodíkové vazby s bází G<sub>-34</sub>, vzájemné přitahování V<sup>171</sup> a T<sub>-34</sub> vyplývá z jejich hydrofobního charakteru (Obr. 13).



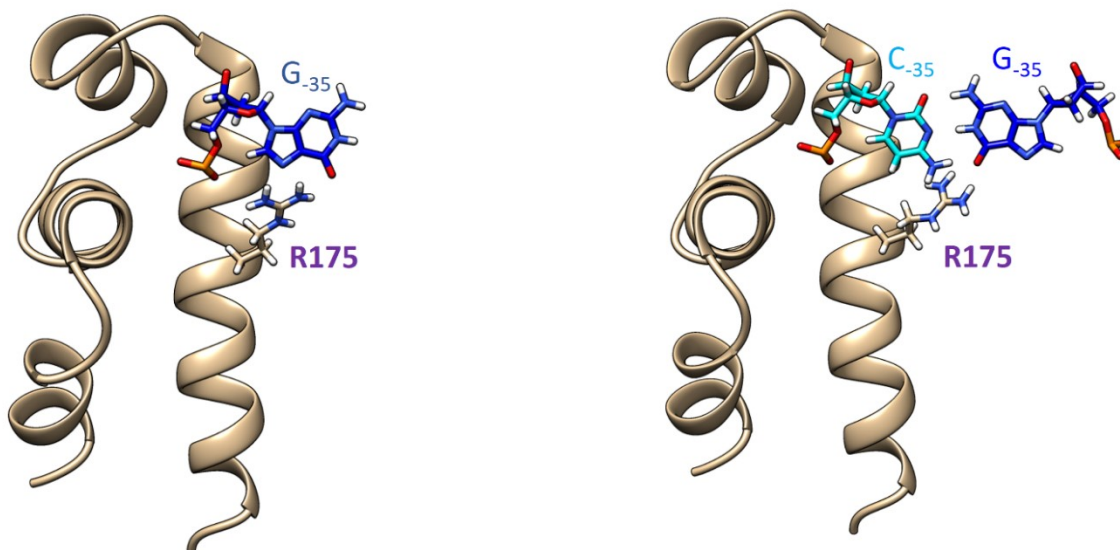
**Obrázek 13. Báze G/T v pozici -34 netemplátového vlákna DNA interagující s aminokyselinami specifickými pro  $\sigma^H$  (S<sup>171</sup>) a  $\sigma^D$  (V<sup>171</sup>). Zatímco S<sup>171</sup> utváří stabilizační vodíkovou vazbu s bází G<sub>-34</sub>, tak přitahování V<sup>171</sup> a T<sub>-34</sub> vyplývá z jejich hydrofobního charakteru.**

Úzké kontakty atypických interakčních partnerů S<sup>171</sup> a T<sub>-34</sub> (v komplexech  $\sigma^H$  se  $\sigma^D$ -dependentním promotorem *PrsdA*, přirozeným hybridním promotorem *Pcg0441* a syntetickým hybridním promotorem *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>*) jsou destabilizující. Je to proto, že vodíková vazba vytvořená mezi hydroxylovou skupinou S<sup>171</sup> a atomem kyslíku O4 T<sub>-34</sub> vede v konečném důsledku k narušení dalších stabilizačních interakcí.

Naproti tomu těsné kontakty atypických interakčních partnerů V<sup>171</sup> a G<sub>-34</sub> v komplexech  $\sigma^D$  a mutantů  $\sigma^H$  v doméně  $\sigma_4$  ( $\sigma^H$ \_4AA,  $\sigma^H$ \_4AA\_K,  $\sigma^H$ \_6AA a  $\sigma^H$ \_6AA\_K) se  $\sigma^H$ -dependentním promotorem *PuvrD3* se nezdají být destabilizujícími.

Báze G v poloze -35 netemplátového řetězce DNA  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* a  $\sigma^D$ -dependentního promotoru interaguje (prostřednictvím dvou vodíkových vazeb zahrnujících atomy O6 a N7) s postranním řetězcem argininu R<sup>175</sup> (Obr. 14), který je přítomen v ekvivalentním prostorovém uspořádání jak u  $\sigma^H$ , tak u  $\sigma^D$ . Tyto vodíkové vazby se zapojením R<sup>175</sup> konzervovaného v  $\sigma^H$  a  $\sigma^D$  lze považovat za nejdůležitější. Po jejich narušení obvykle rychle následuje podstatná změna polohy duplexu DNA:DNA vzhledem k doméně  $\sigma_4$ .

Pokud jde o sekvenčně nespecifické interakce, R<sup>181</sup> obou domén  $\sigma_4$  faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^D$  interaguje s negativně nabitou cukr-fosfátovou kostrou řetězců DNA a zajišťuje další stabilizaci komplexů  $\sigma_4$ -promotor. Dále je zde další bazická aminokyselina K<sup>178</sup>, která je přítomná pouze v doméně  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  a v jejích mutantech.



**Obrázek 14.** (Vlevo) Báze G v pozici -35 netemplátového vlákna DNA  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* nebo  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *PrsdA* interaguje prostřednictvím dvou vodíkových vazeb zahrnujících atomy O6 a N7 s postranním řetězcem R<sup>175</sup>, který je přítomen v ekvivalentní prostorové pozici jak u faktoru  $\sigma^H$ , tak u  $\sigma^D$ . (Vpravo) Báze C na první pozici -35 promotorové oblasti promotoru *Pcg0441* neumožňuje obvyklou vodíkovou vazbu s postranním řetězcem R<sup>175</sup>. Namísto toho postranní řetězec R<sup>175</sup> interaguje s G v pozici -35 na komplementárním vlákně DNA.

#### 5.1.1.3.3 Stabilita komplexu domény $\sigma_4$ faktoru $\sigma^H$ –promotor v MD simulacích

Podle očekávání vytvořila doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  nejstabilnější komplex se  $\sigma^H$ -dependentním promotorem *PuvrD3*. Byly nalezeny všechny možné výše uvedené stabilizační interakce: sekvenčně specifické (G<sub>-35</sub>-R<sup>175</sup>, G<sub>-34</sub>-S<sup>171</sup>, A<sub>-31</sub>-M<sup>170</sup>) i sekvenčně nespecifické (tj. zprostředkované vazbou postranních řetězců Y<sup>155</sup>, R<sup>177</sup>, K<sup>156</sup>, R<sup>172</sup>, T<sup>168</sup>, R<sup>181</sup>, K<sup>178</sup> na cukr-fosfátovou kostru nukleové kyseliny).

Naproti tomu u  $\sigma^D$  a  $\sigma^D/\sigma^H$ -dependentních promotorů (tj. *PrsdA*, *Pcg0441* a *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>*) byla většina těchto interakcí přerušena, orientace duplexu DNA:DNA vzhledem k doméně  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  byla výrazně změněna nebo byl dokonce tento komplex zcela zrušen. V každém případě byla vodíková vazba mezi nevhodnými partnery (S<sup>171</sup> a T<sub>-34</sub>) primárním destabilizujícím faktorem.

#### 5.1.1.3.4 Stabilita komplexu domény $\sigma_4$ faktoru $\sigma^D$ –promotor v MD simulacích

Všechny komplexy byly poměrně stabilní a pouze malé odchylky byly pozorovány u domény  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$ . Byly pozorovány výše uvedené očekávané stabilizační interakce: sekvenčně specifické (C/G<sub>-35</sub>-R<sup>175</sup>, T<sub>-34</sub>-V<sup>171</sup>, G<sub>-31</sub>-R<sup>170</sup>) i sekvenčně nespecifické (tj. zprostředkované vazbou postranních řetězců R<sup>148</sup>, E<sup>156</sup>, K<sup>140</sup>, T<sup>165</sup>, R<sup>181</sup> na cukr-fosfátovou kostru nukleové kyseliny).



Jedinou výjimkou byl  $\sigma^H$ -dependentní promotor *PuvrD3*, u kterého bylo přechodně pozorováno výrazně větší narušení interakcí a je otázkou, zda by tento komplex zůstal stabilní během delší simulace molekulární dynamiky.

#### **5.1.1.3.5 Stabilita komplexu domény $\sigma_4$ mutantních variant faktoru $\sigma^H$ -promotor v MD simulacích**

Mutace pouhých 4-7 aminokyselin, které přibližují  $\sigma^H$  k  $\sigma^D$  (výsledkem jsou varianty  $\sigma^H_{4AA}$ ,  $\sigma^H_{6AA}$ ,  $\sigma^H_{4AA} + K$  nebo  $\sigma^H_{6AA} + K$ ), byly dostatečné pro stabilizaci komplexů všech mutovaných faktorů  $\sigma^H$  se  $\sigma^D$ - a  $\sigma^D/\sigma^H$ -dependentními promotory (*PrsdA*, *Pcg0441* a *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>*).

Naopak v důsledku těchto mutací došlo k určité destabilizaci komplexů se  $\sigma^H$ -dependentním promotorem *PuvrD3*. Zde byl nejstabilnější komplex se  $\sigma^H_{6AA} + K$ .

Optimální interakce R<sup>170</sup> s bází -31 byla většinou pozorována, když prostorově blízký Y<sup>155</sup> nebyl vázán na cukr-fosfátovou kostru DNA (Obr. 12). Sterické konflikty mezi těmito dvěma aminokyselinami by mohly být jedním z důvodů, proč jsme u mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  obecně pozorovali slabší aktivitu *in vivo* (Obr. 9), než jaké bylo dosaženo u faktoru  $\sigma^D$ , kterému Y<sup>155</sup> chybí.

#### **5.1.1.4 Integrace výsledků experimentálního měření aktivity promotorů *in vivo* a dat získaných metodami *in silico***

Hlavním cílem homologního modelování a simulací molekulární dynamiky bylo vytvoření modelů interakcí aminokyselin v  $\sigma$  faktorech a nukleotidů v klíčových motivech promotorů (sekvencí v oblastech -35 a -10), nalezení optimálních kombinací AA+nt, potvrzení konsenzuálních sekvencí jednotlivých tříd promotorů a vysvětlení některých překvapivých výsledků stanovení jejich aktivit. Zatímco aktivity promotoru při měření *in vivo* můžeme hodnotit jen podle elementů -35 a -10, při modelování vstupují do hry celé sekvence promotorů. To zahrnuje i sekvence mezerníků, u nichž je známo, že mohou aktivitu výrazně ovlivňovat.

##### **5.1.1.4.1 Přirozený hybridní promotor *Pcg0441***

Zatímco aktivita promotoru *Pcg0441* v přítomnosti nadprodukovaného faktoru  $\sigma^D$  byla vysoká, v případě faktoru  $\sigma^H$  nebyl patrný téměř žádný nárůst aktivity promotoru po indukci (Obr. 9A). Komplex oblasti -35 promotoru *Pcg0441* s doménou  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$  během simulací molekulární dynamiky byl stabilní, kdežto komplex této oblasti s doménou  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  nebyl stabilní. Tato odlišnost byla evidentně dána stabilizující interakcí báze T<sub>-34</sub>

s aminokyselinou V<sup>171</sup> (doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$ ) (Obr. 13) a destabilizující interakcí báze T<sub>-34</sub> s aminokyselinou S<sup>171</sup> (doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$ ).

Ačkoliv experimentální výsledky korelují se simulacemi molekulární dynamiky, není jasný důvod, proč je *Pcg0441* silně  $\sigma^D$ -dependentní promotor, neboť jeho sekvence GTT v oblasti -10 je typická pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory. Nicméně netypická sekvence oblasti -35 CTAAC (místo GTAAC) u *Pcg0441* nebyla překážkou pro to, aby  $\sigma^D$  silně stimuloval transkripci z tohoto přirozeného hybridního promotoru.

Podrobná analýza trajektorií molekulární dynamiky ukázala, že tento jev může souviset s atypickou bází na první pozici oblasti -35 (v netemplátovém vlákně DNA). Promotor *Pcg0441* zde má bázi C. To znamená, že nese sekvenci CTAAC namísto GTAAC, která je pro  $\sigma^D$ -dependentní promotory *C. glutamicum* konsenzuální.

Simulace molekulární dynamiky ukázaly, že báze C<sub>-35</sub> promotoru *Pcg0441* neumožňuje obvyklou interakci s postranním řetězcem argininu R<sup>175</sup> (Obr. 14). Místo toho R<sup>175</sup> interaguje s bází G na komplementárním templátovém vlákně DNA v pozici -35. Navíc postranní řetězec R<sup>175</sup> také interaguje s G na netemplátovém vlákně DNA v pozici -36.

Atypická interakce R<sup>175</sup> (Obr. 14) má vliv na interakce argininu R<sup>170</sup>. Postranní řetězec R<sup>170</sup> by ideálně přispíval k sekvenčně specifickému rozpoznání báze na páté pozici oblasti -35 promotoru (-31, na templátovém vlákně). Avšak zde postranní řetězec R<sup>170</sup> preferuje sekvenčně nespécifickou interakci s cukr-fosfátovou kostrou templátového vlákna DNA. Dochází tak k vytvoření solného můstku.

Arginin R<sup>170</sup> je poslední aminokyselinou, která podstatně interaguje s oblastí -35. V otevřeném komplexu RNA s kompletními transkripčními bublinami následuje mezerník o délce ~17-18 bp spojující oblasti -35 a -10. Zdá se, že drobné přeskupení klíčových interakcí mezi promotorem *Pcg0441* a  $\sigma$  faktory, které se objevuje zásluhou atypické báze C na první pozici oblasti -35, se nějakým způsobem přenáší přes R<sup>170</sup> a duplex DNA v mezerníku směrem k oblasti elementu -10, kde by mohlo mírně narušit prostorové uspořádání komplexu RNAP s DNA i základní interakce mezi aminokyselinami a nukleotidy. To by mohlo mimo jiné způsobit, že faktor  $\sigma^D$  je schopen rozpoznat trinukleotid GTT (typický spíše pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory) v oblasti -10 přirozeného hybridního promotoru *Pcg0441* (Tab. 14).

Aktivita promotoru *Pcg0441* v přítomnosti nadprodukovaných mutantních variant  $\sigma^H$ \_4AA a  $\sigma^H$ \_6AA byla zanedbatelná. Lehce zvýšená aktivita promotoru byla naměřena v přítomnosti variant  $\sigma^H$ \_4AA + K a  $\sigma^H$ \_6AA + K. Tyto aktivity se však zdaleka nedaly porovnávat s obrovskou aktivitou promotoru s faktorem  $\sigma^D$  (Obr. 9A). Nízké aktivity promotoru s mutanty  $\sigma^H$  přičítáme především tomu, že podle simulací molekulární dynamiky nebyl klíčový arginin R<sup>170</sup> schopen navázat interakci s bází G<sub>-31</sub> nebo s blízkou fosfátovou skupinou (jako tomu bylo v případě faktoru  $\sigma^D$ ). Zřejmým důvodem byl postranní řetězec

tyrozinu Y<sup>155</sup> (který chybí v  $\sigma^D$ , kde je nahrazen méně objemným alaninem A<sup>155</sup>), s nímž je R<sup>170</sup> ve velmi těsném kontaktu (Obr. 12), který svou velikostí do jisté míry narušuje interakce Y<sup>155</sup> i R<sup>170</sup> s nukleovou kyselinou.

#### 5.1.1.4.2 $\sigma^H$ -dependentní promotor *PuvrD3*

V případě  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* byly všechny sledované mutantní varianty  $\sigma^H$  faktoru schopny iniciovat transkripci, zatímco  $\sigma^D$  vůbec ne (Obr. 9B). Přirozený faktor  $\sigma^H$  a jeho mutantní varianta  $\sigma^H_{6AA} + K$  rozhodně zapříčinily nejvyšší aktivitu promotoru.

Simulace molekulární dynamiky ukázaly, že nejen doména  $\sigma_4$  přirozeného faktoru  $\sigma^H$  a jeho mutantní varianty  $\sigma^H_{6AA} + K$ , ale i doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$  může vytvářet interakce s oblastí -35 promotoru *PuvrD3*. V případě  $\sigma^D$  je však klíčová interakce mezi postranním řetězcem R<sup>175</sup> a bází v poloze -35 (Obr. 14) daleko méně stabilní. Navíc podle simulace molekulární dynamiky nebyl R<sup>170</sup> v doméně  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$  schopen vytvořit stabilní kontakt s cukr-fosfátovou kostrou DNA tak jako v případě mutanty  $\sigma^H_{6AA} + K$ . Silná afinita  $\sigma^H$  a *PuvrD3* je zřejmě způsobena tyrosinem Y<sup>155</sup> (který v  $\sigma^D$  chybí) umožňujícím nespecifickou vazbu  $\sigma^H$  a fosfátové skupiny DNA. Provedené mutace pak funkčnost páru  $\sigma^H + PuvrD3$  mohly pouze snížit, ale nikoliv zcela zrušit.

#### 5.1.1.4.3 $\sigma^D$ -dependentní promotor *PrsdA*

Silný  $\sigma^D$ -dependentní promotor *PrsdA* projevil zvýšenou aktivitu pouze v přítomnosti nadprodukovaného přirozeného faktoru  $\sigma^D$  (Obr. 9C). U  $\sigma^H$  a jeho mutantů byla aktivita promotoru po indukci srovnatelná s hodnotami negativní kontroly.

Simulace molekulární dynamiky ukázala, že všechny mutantní varianty faktoru  $\sigma^H$ , které měly za cíl funkčně napodobit tuto oblast v  $\sigma^D$  (Tab. 15, Obr. 8), skutečně byly schopny rozpoznat oblast -35  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *PrsdA*, zatímco přirozený  $\sigma^H$  nikoliv. Kruciólní interakce mezi postranním řetězcem R<sup>175</sup> a bází v pozici -35 (Obr. 14) byla stabilní, což vedlo ke klasickému uspořádání komplexů.

Neschopnost mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  umožnit transkripci ze  $\sigma^D$ -dependentního promotoru pravděpodobně spočívala v tom, že nedokážou interagovat s nukleotidovou sekvencí GAT, která je typická pro oblast -10  $\sigma^D$ -dependentních promotorů (zatímco konsenzuální sekvence pro  $\sigma^H$  je GTT) (Tab. 14).

#### 5.1.1.4.4 Syntetický hybridní promotor *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>*

Detailní poznatky o funkčnosti kombinací promotorů a  $\sigma$  faktorů, případně jejich mutantů, jsme se rozhodli využít pro konstrukci páru hybridního promotoru a mutantního  $\sigma$

faktoru, který by vykazoval vlastnosti striktního expresního systému (bio-orthogonální expresi). Pro konstrukci hybridního promotoru byla spojena oblast -35  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *PrsdA* a oblast -10  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* (Blumenstein, 2019). Při analýze tohoto promotoru *in vivo* byla pozorována vysoká transkripční aktivita v přítomnosti všech mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  (Obr. 9D). To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že doména  $\sigma_2$  faktoru  $\sigma^H$ , která zodpovídá za interakci s oblastí -10, byla v hybridech nezměněna a interagovala tedy ideálně s -10 GTT<sub>sigH</sub>, zatímco doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  byla různě mutována, aby imitovala doménu  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$ , a interagovala proto dobře s -35 GTAAC<sub>sigD</sub>. To potvrdilo hypotézu, že právě oblast -10 *PrsdA* postrádající konsenzuální sekvenci GTT pro  $\sigma^H$  (Obr. 9C) a atypická oblast -35 CTAAC přirozeného hybridního promotoru *Pcg0441* (Obr. 9A) brání transkripci z těchto promotorů pomocí mutantních variant faktoru  $\sigma^H$ . Ze stejných důvodů pravděpodobně přirozené faktory  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  syntetický hybridní promotor *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* nerozpoznávaly (Obr. 9D).

Naopak žádná z mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  nezpůsobovala zvýšení aktivity  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *PrsdA* (Obr. 9C). V případě typického  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* byla zaznamenána jeho nejmenší aktivita v přítomnosti varianty  $\sigma^H$ \_6AA (Obr. 9B). Z hlediska praktického využití vytvořeného striktního expresního systému bylo pozitivní zjištění, že právě tato varianta způsobila nejvyšší nárůst aktivity syntetického promotoru *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>*.

## 5.1.2 Překryvy rekogniční specifity faktorů $\sigma^M$ , $\sigma^E$ , $\sigma^H$ u

### *C. glutamicum*

$\sigma^M$  platí stále za nejméně prozkoumaný  $\sigma$  faktor RNAP *C. glutamicum*. Definování jeho specifity komplikují faktory  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ , které rozpoznávají většinu potenciálních  $\sigma^M$ -dependentních promotorů. Ke zkoumání tohoto faktoru nepřispívá ani fakt, že se jej doposud nepodařilo izolovat a purifikovat ve funkční konformaci pro *in vitro* testování aktivity promotorů. Pomocí sekvenování RNA s metodou ROSE (RNA sekvenování *in vitro* transkriptů) (Schmidt *et al.*, 2023) se podařilo kolegům z Univerzity v Bielefeldu za naší spolupráce stanovit několik potenciálních  $\sigma^M$ -dependentních promotorů, jejichž aktivita byla v naší laboratoři změřena metodami *in vivo* a *in vitro* (Dostálová, 2020). Jedním z nich byl promotor *Pcg0668* (promotor genu pro segregáční ATPázu z FtsK/SpoIIIE rodiny), jehož klíčové sekvence jsou -35 GGGAACC a -10 GTC. K potvrzení důležitosti konsenzuální sekvence -35 a -10  $\sigma^M$ -dependentních promotorů jsme podrobili tento promotor několika mutacím, které zároveň posloužily k analýze překryvu rekogniční specifity faktorů  $\sigma^M/\sigma^H/\sigma^E$  a ujasnění interakcí mezi sekvencí promotoru a  $\sigma$  podjednotkami RNAP.

### 5.1.2.1 Mutantní varianty promotoru Pcg0668

Navrhli jsme několik mutantních variant se záměnami v oblastech -35 a -10 promotoru Pcg0668 (Tab. 16). Takové mutace by měly vést ke změně rozpoznávání promotoru jednotlivými  $\sigma$  faktory. Čtveřice nukleotidů GGAA v oblasti -35 promotoru je identická s oblastí -35  $\sigma^E$ - či  $\sigma^H$ -dependentních promotorů. Proto jsme provedli několik mutací nt -31, který je u *C. glutamicum* klíčový, v očekávání, zda bude takový promotor i nadále  $\sigma^M$ -dependentní a zda bude zároveň pouze  $\sigma^H$ -dependentní, nebo  $\sigma^E/\sigma^H$ -dependentní (Busche *et al.*, 2023). Oblast -10 Pcg0668 je tvořena trojicí nukleotidů GTC, která se jedním nt liší od velmi silně konzervované oblasti -10 GTT u  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -dependentních promotorů. Proto jsme zvolili mutace právě v této odlišné pozici s očekáváním, že při záměně v sekvenci GTC -10 oblasti (C → T) dojde ke vzniku  $\sigma^E/\sigma^H$ -dependentního promotoru.

**Tabulka 16.** Sekvence  $\sigma^M$ -dependentního promotoru Pcg0668 a jeho mutantních variant.

Promotor	Sekvence promotoru <sup>a</sup>
Pcg0668	CACATTCAA <u>GGGAACC</u> TTTTGGCCGTTTTTCCA <u>GTCAA</u> CACTTATTGAC
Pcg0668 -10 <sub>GTG</sub>	CACATTCAA <u>GGGAACC</u> TTTTGGCCGTTTTTCCA <u>GTGAAA</u> CACTTATTGAC
Pcg0668 -10 <sub>GTA</sub>	CACATTCAA <u>GGGAACC</u> TTTTGGCCGTTTTTCCA <u>GTAAAA</u> CACTTATTGAC
Pcg0668 -10 <sub>GTT</sub>	CACATTCAA <u>GGGAACC</u> TTTTGGCCGTTTTTCCA <u>GTAAAA</u> CACTTATTGAC
Pcg0668 -31 <sub>G</sub>	CACATTCAA <u>GGGAAAC</u> TTTTGGCCGTTTTTCCA <u>GTCAA</u> CACTTATTGAC
Pcg0668 -31 <sub>A</sub>	CACATTCAA <u>GGGAAAC</u> TTTTGGCCGTTTTTCCA <u>GTCAA</u> CACTTATTGAC
Pcg0668 -31 <sub>T</sub>	CACATTCAA <u>GGGAAAT</u> TTTTGGCCGTTTTTCCA <u>GTCAA</u> CACTTATTGAC

<sup>a</sup>Podtržené jsou klíčové oblasti promotoru -35, -10 a TSS. Červeně je vyznačena změna nukleotidu oproti sekvenci původního promotoru.

### 5.1.2.2 Tvorba konstruktů pEPR1 nesoucích mutantní varianty promotoru Pcg0668

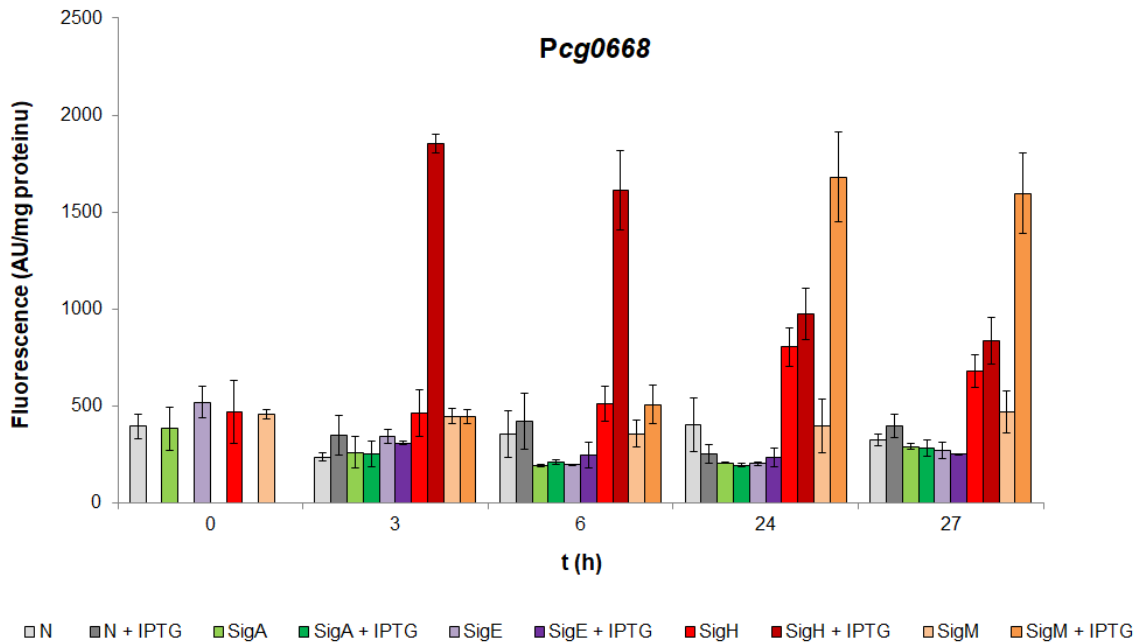
K vytvoření mutantních variant promotorů Pcg0668 byl jako templát pro PCR použit plazmid pEPR1Pcg0668. Amplifikace mutantních variant pomocí soupravy Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit proběhla se dvojicemi primerů: Pcg0668mut-10F + Pcg0668mut-10R1 (-10<sub>GTG</sub>), Pcg0668mut-10F + Pcg0668mut-10R2 (-10<sub>GTA</sub>), Pcg0668mut-10F + Pcg0668mut-10R3 (-10<sub>GTT</sub>), JB-0668mut-31GPEPRF + JB-0668mut-31GPEPRR (-31<sub>G</sub>), JB-0668mut-31APEPRF + JB-0668mut-31APEPRR (-31<sub>A</sub>) a JB-0668mut-31TPEPRF + JB-0668mut-31TPEPRR (31<sub>T</sub>). Plazmidový konstrukt s mutací v promotoru byl připraven dle postupu doporučeného výrobcem soupravy pro mutagenезi (fosforylace, ligace a eliminace templátu). Produktem byly pak transformovány buňky *E. coli* TOP10. Přítomnost očekávaného konstruktů byla v buňkách transformantů prokázána pomocí PCR s použitím vektorových primerů TRPCGF1 + GFP1 a mixu PCR BIO HS Taq.

Mutace v promotoru byla pak ověřena sekvenováním. Získané plazmidy pEPR1 nesoucí promotory *Pcg0668*-10<sub>GTG</sub>, *Pcg0668*-10<sub>GTA</sub>, *Pcg0668*-10<sub>GTT</sub>, *Pcg0668*-31<sub>G</sub>, *Pcg0668*-31<sub>A</sub> a *Pcg0668*-31<sub>T</sub> posloužily k tvorbě dvouplazmidových systémů v *C. glutamicum*. Byly použity i analogické kmeny nesoucí původní sekvenci promotoru *Pcg0668*.

### 5.1.2.3 Měření aktivity mutantních variant promotoru *Pcg0668* ve dvouplazmidovém systému *C. glutamicum*

Konstrukty expresního vektoru pEC-XT99A s genem pro sledovaný  $\sigma$  faktor RNAP *C. glutamicum* (*sigA*, *sigE*, *sigH*, *sigM*) byly vytvořeny během předchozí experimentální práce v naší laboratoři. Postup přípravy a samotné měření byly shodné jako v kapitole 5.1.1.2, avšak kromě odběrů v časech 0 h, 3 h, 6 h a 24 h byl proveden i odběr kultury v čase 27 h z důvodu dříve pozorovaného trendu nárůstu aktivit promotorů s faktorem  $\sigma^M$  v průběhu kultivace. K větší přehlednosti sledování aktivity v homologním dvouplazmidovém systému byl použit kmen *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  (kmen s chromozomální delecí v genu *sigH*). Pozorovali jsme totiž často, že přirozená produkce  $\sigma^H$  zajištěná pouze genem na chromosomu interferovala se slabší aktivitou jiných  $\sigma$  faktorů kódovaných příslušným genem na plazmidu. Jako negativní kontrola aktivity promotoru byly použity dvouplazmidové buňky obsahující prázdný vektor pEC-XT99A.

Nejprve byla změřena aktivita přirozeného promotoru *Pcg0668* (Obr. 15). V buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^H$  došlo k výraznému nárůstu aktivity promotoru ve 3. (IP = 4) a 6. hodině (IP = 3,1). Avšak v časech 24 a 27 hodin po indukci došlo ke značnému poklesu aktivity promotoru v těchto buňkách, a naopak v buňkách se  $\sigma^M$  došlo k výraznému vzestupu aktivity (IP = 4,3). V případě ostatních kmenů byla aktivita promotoru po indukci srovnatelná s hodnotami negativní kontroly. Analýza *in vivo* ukázala, že překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^M$  a  $\sigma^H$  u *C. glutamicum* je zřejmý a že *Pcg0668* je  $\sigma^M/\sigma^H$ -dependentní promotor. Z měření v různých fázích kultivace vyplynulo, že daný promotor je v exponenciální fázi aktivován faktorem  $\sigma^H$ , zatímco v pozdních fázích kultivace jeho aktivitu zajišťuje hlavně  $\sigma^M$ .



**Obrázek 15. Aktivita promotoru *Pcg0668* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^A$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ .** N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.

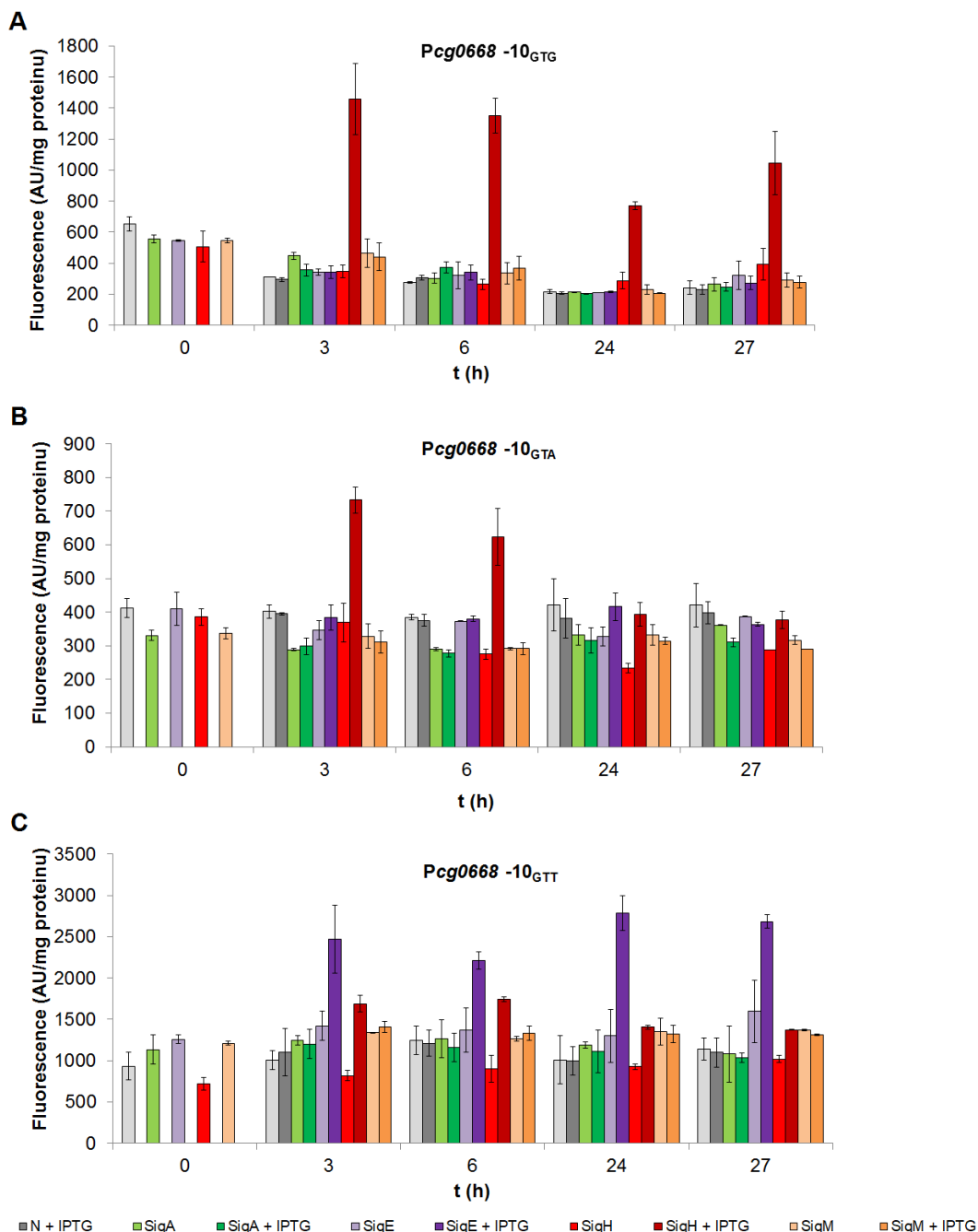
Po měření aktivity promotoru *Pcg0668* *in vivo* byla změřena aktivita jeho tří mutantních variant, které měly změnu sekvence v oblasti -10 (Obr. 16).

Měření aktivity *Pcg0668* -10<sub>G<sub>TG</sub></sub> (Obr. 16A) ukázalo, že záměna GTCAAA → GTGAAA zcela potlačila nárůst aktivity promotoru v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^M$ . Naopak v případě  $\sigma^H$ , s nímž byla aktivita původního promotoru *Pcg0668* v časech 24 h a 27 h potlačena (Obr. 15), byl i ve 27. hodině znatelný nárůst aktivity této varianty promotoru (IP = 2,7). V případě ostatních  $\sigma$  faktorů byla aktivita po indukci srovnatelná s negativní kontrolou. Podle výsledku tohoto měření změna klíčového nukleotidu C → G zcela zrušila schopnost  $\sigma^M$  rozpoznávat promotor *Pcg0668* a naopak zvýšila afinitu promotoru k faktoru  $\sigma^H$ .

Aktivita *Pcg0668* -10<sub>G<sub>TA</sub></sub> (Obr. 16B) ukázala, že i záměna GTCAAA → GTAAAA opět způsobila ztrátu schopnosti  $\sigma^M$  rozpoznávat promotor *Pcg0668*. Trend aktivity *Pcg0668* s faktorem  $\sigma^H$  byl podobný jako v případě přirozeného promotoru *Pcg0668*, kde také došlo k poklesu aktivity promotoru ve 24. a 27. hodině (Obr. 15). Aktivita promotoru po indukci ostatních faktorů byla srovnatelná s negativní kontrolou. Změna klíčového nukleotidu C → A způsobila opět ztrátu afinity  $\sigma^M$  k promotoru *Pcg0668* (Obr. 16B).

Nejzajímavějším mutantním promotorem byl *Pcg0668* -10<sub>G<sub>TT</sub></sub> (Obr. 16C), u něhož změna GTCAAA → GTTAAA způsobila vznik kompletní konsenzuální sekvence odpovídající  $\sigma^H$ - a  $\sigma^E$ -dependentním promotorům (-35 GGAAC a -10 GTT). Tomu

odpovídala i aktivita promotoru, jejíž nejvyšší nárůst nastal 24 h po indukci (IP = 2,2) s faktorem  $\sigma^E$ . O trochu menší nárůst aktivity byl sledován i s faktorem  $\sigma^H$  (IP = 1,93 ve 3. a 6. hodině po indukci). V případě ostatních kombinací byla aktivita promotoru po indukci srovnatelná s hodnotami negativní kontroly. Změna klíčového nukleotidu C  $\rightarrow$  T tedy vytvořila z promotoru *Pcg0668* téměř ukázkový  $\sigma^E$ -dependentní a slabší  $\sigma^H$ -dependentní promotor a zcela potlačila interakci promotoru s faktorem  $\sigma^M$ .



**Obrázek 16. Aktivita mutantních variant promotoru *Pcg0668* se změnou oblasti -10 v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^A$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ . N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.**

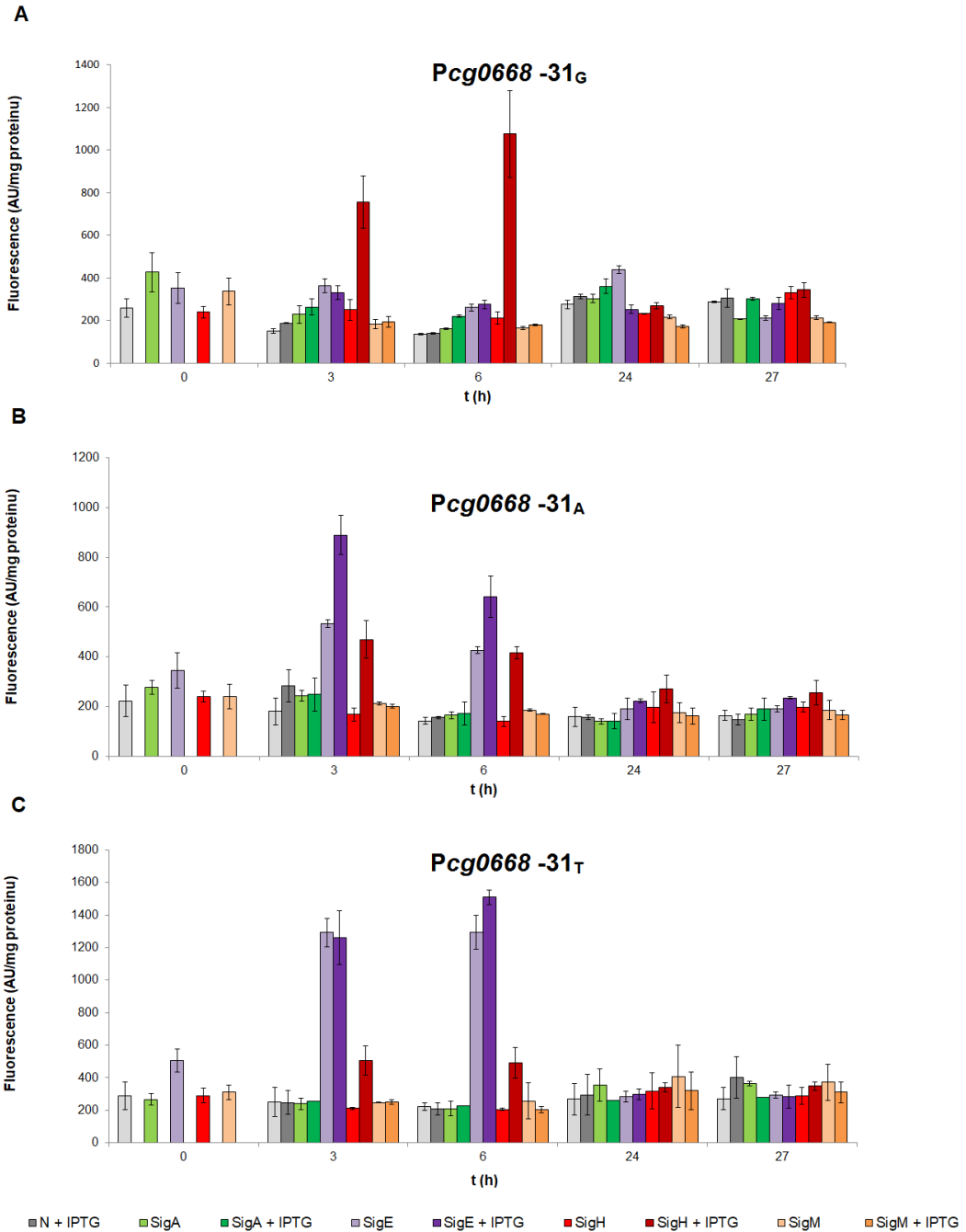


Další tři mutantní varianty nesly záměnu v oblasti -35 *Pcg0668*, v níž byl změněn nukleotid C<sub>-31</sub>. V případě varianty *Pcg0668* -31<sub>G</sub> záměna GGGAACC → GGGAAGC zcela potlačila aktivitu s faktorem  $\sigma^M$  (Obr. 17A). Vysoký nárůst aktivity promotoru nastal 6 h po indukci v buňkách s faktorem  $\sigma^H$  (IP = 5), přičemž byl zachován trend, který se ukázal během měření aktivity přirozeného promotoru *Pcg0668* (Obr. 15), tedy, že ve 24. a 27. hodině došlo k poklesu aktivity na úroveň stavu bez indukce. Naměřené aktivity promotoru v ostatních kombinacích byly srovnatelné s hodnotami negativní kontroly.

I v případě varianty *Pcg0668* -31<sub>A</sub>, kde byla provedena záměna GGGAACC → GGGAAAC, došlo k potlačení nárůstu aktivity promotoru s faktorem  $\sigma^M$  (Obr. 17B). Aktivity promotoru byly naopak pozorovány v buňkách se  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ . V případě faktoru  $\sigma^E$  došlo 3 h po indukci k výraznějšímu nárůstu (IP = 1,7). V tomto případě však již samotná hodnota aktivity neindukovaného stavu byla neočekávaně přibližně dvojnásobná oproti hodnotám negativní kontroly. Ve 3 hodině po indukci došlo k nárůstu aktivity promotoru i se  $\sigma^H$  (IP = 2,8). Jak v případě  $\sigma^E$ , tak i  $\sigma^H$ , se aktivita promotoru v průběhu kultivace snižovala. Aktivity *Pcg0668* -31<sub>A</sub> v ostatních kombinacích byly srovnatelné s hodnotami aktivity promotoru negativní kontroly.

Trend v nárůstu (IP = 2,4) a následného poklesu aktivity promotoru se  $\sigma^H$  byl patrný i u *Pcg0668*-31<sub>T</sub> (záměna GGGAACC → GGGAATC) (Obr. 17C). Zvláštností je, že v případě faktoru  $\sigma^E$  aktivita promotoru v indukovaném i neindukovaném systému ve 3. hodině byla přibližně 5x vyšší než hodnota aktivity promotoru negativní kontroly. Aktivity promotorů v ostatních buňkách, tedy i těch nadprodukcujících faktor  $\sigma^M$ , odpovídaly hodnotám negativní kontroly.

Výsledky měření aktivity promotoru *Pcg0668* a jeho mutantních variant prokázaly, že  $\sigma^M$ -regulon a  $\sigma^H$ -regulon se mohou vzájemně překrývat. Protože jakákoliv mutace v pozicích -31 a -10  $\sigma^M$ -dependentního promotoru *Pcg0668* zrušila aktivitu právě se  $\sigma^M$ , zdá se, že sekvence -35 GGGAACC a -10 GTCAAA jsou pro rozeznání a funkčnost  $\sigma^M$ -dependentních promotorů nezbytné. Na základě dosavadních výsledků můžeme sekvence GGGAACC (-35 oblast) a GTC (-10 oblast) považovat za konsenzuální pro  $\sigma^M$ -dependentní promotory *C. glutamicum*. Nepostradatelnost ostatních nukleotidů v klíčových sekvenčních motivech konkrétních promotorů by se samozřejmě musela ověřovat další mutagenézí. Je zřejmé, že regulony příslušné k  $\sigma^H$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^M$  se překrývají a jediná záměna nukleotidu v klíčových motivech promotorů může přepínat mezi aktivitami jednotlivých  $\sigma$  faktorů.



**Obrázek 17. Aktivita mutantních variant promotoru *Pcg0668* se změnou v pozici -31 promotoru v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^A$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ . N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.**

## 5.2 Stresové $\sigma$ regulony bakterií rodu

### *Rhodococcus*

Naše *Laboratoř modulační genové exprese* se dlouhou dobu zabývala  $\sigma$  regulony *C. glutamicum* a jejich dopadem na fungování buňky. Při hledání stresových regulonů se přitom jako důležitý pomocník ukázala metoda analýzy transkriptomu pomocí sekvenování RNA, kterou provádíme ve spolupráci s *Laboratoří mikrobiální genomiky a biotechnologií* na Univerzitě v Bielefeldu (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Další zásadní metody, které nám umožňují přiřadit k sobě jednotlivé  $\sigma$  faktory a příslušné promotory a jejich pozici v regulační síti, kombinují *in vivo*, *in vitro* a *in silico* metody (Dostálová *et al.*, 2017, 2019), což promotorové studie podstatně zpřesňuje.

Jelikož se tento přístup ke studiu promotorů a  $\sigma$  faktorů *C. glutamicum* osvědčil, předpokládali jsme podobnou spolehlivost naší metodiky i v případě kmenů *Rhodococcus erythropolis* CCM2595 a *Rhodococcus opacus* PD630, neboť aktinobakteriální rody *Corynebacterium* a *Rhodococcus* jsou dosti příbuzné. Kmeny obou rodů jsou využívány v biotechnologiích: korynebakterie při produkci aminokyselin a dalších významných látek, rhodokoky pro degradaci toxických látek, což lze využít v environmentální praxi.

#### 5.2.1 Identifikace $\sigma^D$ -dependentních promotorů *Rhodococcus erythropolis* pomocí heterologního *in vivo* a *in vitro* systému

První linií obrany bakteriálních buněk proti působení vnějších stresových podmínek je buněčná stěna. Proto byl v první řadě studován faktor  $\sigma^D$ , jehož funkce v *C. glutamicum* je spojena především s expresí genů podílejících se na syntéze mykolových kyselin a odpovědi na povrchový stres (Taniguchi *et al.*, 2017; Toyoda a Inui, 2018). Jako součást  $\sigma^D$ -regulonů *C. glutamicum* byly pomocí *in vivo* a *in vitro* systému potvrzeny geny pro korynemykolyltransferázu (*cmt1* a *cmt2*) (Dostálová *et al.*, 2019). Zajímalo nás, zda u příbuzných rhodokoků existují analogické geny a zda je jejich transkripce podobně regulována. Pomocí softwaru BLASTP *search* byly vyhledány homology proteinů Cmt1 a Cmt2 u *R. erythropolis* CCM2595, a to proteiny FrmB1 a FrmB2 (S-formylglutathionhydroláza) (Tab. 17). Faktory  $\sigma^D$  *C. glutamicum* ATCC 13032 a *R. erythropolis* CCM2595 prokazovaly sekvenční identitu 55,2 %.

**Tabulka 17.** Identita aminokyselinové sekvence Cmt *C. glutamicum* a FrmB *R. erythropolis*.

Porovnávané proteiny	Sekvenční identita
Cmt1 vs. FrmB1	30 %
Cmt1 vs. FrmB2	30 %
Cmt2 vs. FrmB1	48 %
Cmt2 vs. FrmB2	45 %
Cmt1 vs. Cmt2	30 %
FrmB1 vs. FrmB2	77 %

Transkripční starty a promotory genů *cmt1* a *cmt2* byly definovány na základě výsledků sekvenování RNA transkriptomu a mapování 5' konců transkriptů kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 kultivovaného během nadprodukce faktoru  $\sigma^D$  (Dostálová *et al.*, 2019). Porovnáním sekvencí promotorů *Pcmt1/Pcmt2* *C. glutamicum* ATCC 13032 se sekvencemi promotorů *PfrmB1* a *PfrmB2* v genomu *R. erythropolis* CCM2595 (Acc. Number NC\_022115 v databázi GenBank) se podařilo nalézt potenciální oblasti -35 a -10 promotorů *PfrmB1* a *PfrmB2* (Obr. 18).

```

                                -35                -10                TSS
cmt1      GGTAAGCGCCTGTTAACGTAATAG-CTTGAAATATAGATGTA AATTAAA
cmt2      GTGTCACAACCTGGTAACGTGTGGG-CGGAAAAACAAGATAGGCATCGAG
frmB1     ATATTTTCGATTCAGTAACACCGAAT-CGATTGGCCACGATGTACTCGAAG
frmB2     TGACCTCGACTTTGTAACACCGGAGCCCCCGGAAAGGACAAACACGTCG
  
```

**Obrázek 18.** Srovnání promotorových sekvencí genů *cmt1/cmt2* *C. glutamicum* a jejich homologů *frmB1/frmB2* *R. erythropolis*. Podtržené sekvence označují oblasti -35 a -10 a transkripční start (TSS) stanovený RNA sekvenováním.

### 5.2.1.1 Sledování aktivity promotorů ve dvouplazmidových systémech *C. glutamicum*

Měření aktivity promotorů ve dvouplazmidových kmenech *C. glutamicum* se používá v *Laboratoři modulace genové exprese* jako spolehlivá metoda analýzy interakce  $\sigma$  faktorů s promotory *in vivo* a přiřazení konkrétního  $\sigma$  faktoru ke sledovanému promotoru. Zahrnuje dva rekombinantní plazmidy replikující se v jedné buňce: promotor-test vektor pEPR1, který obsahuje vložený sledovaný promotor před reportérovým genem *gfpUV*, a expresní vektor pEC-XT99A, který nese gen pro analyzovaný  $\sigma$  faktor exprimovaný z IPTG-inducibilního promotoru *Ptrc*. V případě interakce nadprodukovaného  $\sigma$  faktoru se sledovaným promotorem totiž dochází ke zvýšení exprese reportérového genu *gfpUV*, čehož se využije při měření intenzity fluorescence nadprodukovaného GFP, která je měřítkem aktivity promotoru.

#### **5.2.1.1.1 Konstrukce plazmidů s potenciálními $\sigma^D$ -dependentními promotory *R. erythropolis* PfrmB1<sub>R.e.</sub> a PfrmB2<sub>R.e.</sub>**

Komplementární páry oligonukleotidů PRS01090REF70 + PRS01090RER70 (promotor PfrmB1<sub>R.e.</sub>) a PRS25565REF70 + PRS25565RER70 (promotor PfrmB2<sub>R.e.</sub>) o délce 70-78 nt byly po vzájemné asociaci v termocykleru (vznikly dvouvláknové fragmenty s přečnívajícími konci odpovídajícími štěpení BamHI a NsiI) klonovány ve vektoru pEPR1 štěpeném enzymy BamHI a NsiI. Následovala transformace bakterií *E. coli* TOP10 ligační směsí a transformované kultury byly vysety na agarové plotny 2xYT s kanamycinem. Přítomnost konstruktů byla pak v narostlých koloniích ověřována pomocí PCR s užitím vektorových primerů TRPTCGF1 + GFP1 a PCR BIO HS Taq Mix Red. Z klonů, jejichž PCR produkt nesl odpovídající velikost, byl izolován a přečištěn plazmid a přítomnost konstruktů se správnou nukleotidovou sekvencí byla ověřena sekvenováním. Izolované a purifikované konstrukty pEPR1PfrmB1<sub>R.e.</sub> a pEPR1PfrmB2<sub>R.e.</sub> posloužily k tvorbě dvouplazmidových systémů v *C. glutamicum*.

#### **5.2.1.1.2 Konstrukce expresních vektorů s geny $\sigma$ faktorů *R. erythropolis* sigD<sub>R.e.</sub> a sigH<sub>R.e.</sub>**

S využitím dvojic primerů SIGDREpECEcoRIF2 + SIGDREPECR a SIGHREpECSacIF2 + SIGHREPECR byly na templátu (izolovaná chromozomální DNA *R. erythropolis* CCM2595) pomocí Q5 polymerázy amplifikovány produkty nesoucí geny sigD<sub>R.e.</sub> a sigH<sub>R.e.</sub> Po úspěšné amplifikaci ověřené elektroforézou byly získané amplikony purifikovány a následně štěpeny odpovídajícími restričními endonukleázami, přičemž fragment nesoucí gen sigD<sub>R.e.</sub> byl štěpen enzymy EcoRI a XbaI, zatímco fragment s genem sigH enzymy EcoRI a XbaI. Získané restriční fragmenty byly poté ligovány s vektorem pEC-XT99A štěpeným týmiž enzymy. Transformované kultury *E. coli* TOP10 byly vysety na agarové plotny 2xYT s tetracyklinem. Narostlé kolonie byly otestovány pomocí PCR s použitím primerů SIGDREpECEcoRIF2 + ECXT99AR (pro pEC-XT99AsigD<sub>R.e.</sub>) a SIGHREpECSacIF2 + ECXT99AR (pro pEC-XT99AsigH<sub>R.e.</sub>) a mixu PCR BIO HS Taq Mix Red. Po izolaci plazmidů z transformantů následovala ověřovací restriční analýza pomocí PstI. Plazmidy klonů s odpovídajícím restričním profilem byly přečištěny a sekvenovány. Plazmidy pEC-XT99AsigD<sub>R.e.</sub> a pEC-XT99AsigH<sub>R.e.</sub> s požadovanou nukleotidovou sekvencí byly použity k tvorbě dvouplazmidových systémů v *C. glutamicum*.

#### **5.2.1.1.3 Příprava heterologního dvouplazmidového systému *C. glutamicum* pro promotory rhodokoků**

Doposud se v laboratoři používal pouze homologní dvouplazmidový systém, v němž analyzované  $\sigma$  faktory i promotory náležely hostitelskému druhu bakterie, tedy

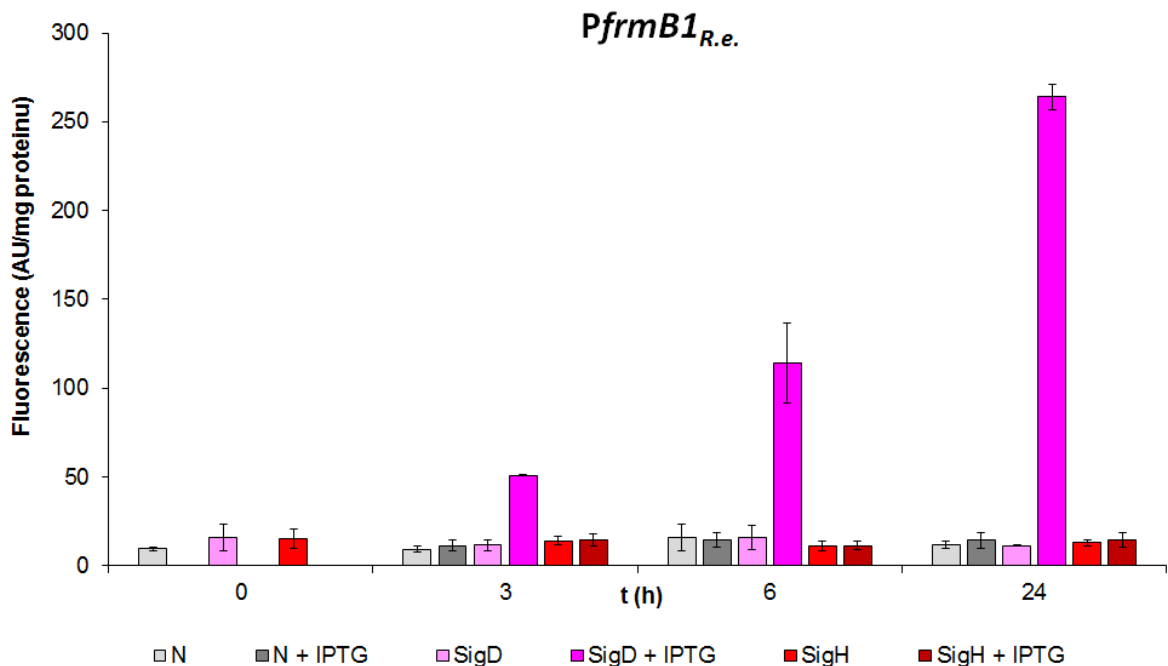
*C. glutamicum*. Pro sledování promotorů *PfrmB1<sub>R.e</sub>* a *PfrmB2<sub>R.e</sub>* z *R. erythropolis* byl vytvořen heterologní dvouplazmidový systém, který se skládal z plazmidů obsahujících promotor a gen pro  $\sigma$  faktor patřící druhu *R. erythropolis*, avšak hostitelským kmenem zůstal kmen *C. glutamicum*.

Nejdříve proběhla elektroporační transformace buněk *C. glutamicum* ATCC 13032 expresními vektory s naklonovanými geny pro sledované  $\sigma$  faktory (pEC-XT99Asig<sub>X</sub>). Následovalo vyšetření transformantů na 2xYT plotny s tetracyklinem. Narostlé klony byly ověřeny pomocí PCR a izolované plazmidy restriční analýzou prostřednictvím enzymu PstI. Z odpovídajícího kmene byly opět vytvořeny kompetentní buňky, které byly transformovány promotor-test vektorem pEPR1 s naklonovaným sledovaným promotorem. Po výsevu na 2xYT plotny s tetracyklinem i kanamycinem následovalo ověření získaných klonů pomocí PCR a restriční analýzy PstI. Vytvořené kmeny obsahující oba konstrukty (pEC-XT99A+sig gen a pEPR1+promotor) byly uchovány v glycerolových konzervách při -70 °C a využity pro měření aktivity promotorů *in vivo*.

#### **5.2.1.1.4 Měření aktivity promotoru *PfrmB1<sub>R.e</sub>* *in vivo***

Po vytvoření dvouplazmidových systémů založených na hostiteli *C. glutamicum* byla měřena fluorescence v kmenech nesoucích tyto kombinace plazmidů: pEC-XT99A + pEPR1*PfrmB1<sub>R.e</sub>*, pEC-XT99Asig<sub>D<sub>R.e</sub></sub> + pEPR1*PfrmB1<sub>R.e</sub>* a pEC-XT99Asig<sub>H<sub>R.e</sub></sub> + pEPR1*PfrmB1<sub>R.e</sub>*. Jako negativní kontrola byl použit dvouplazmidový systém obsahující prázdný vektor pEC-XT99A

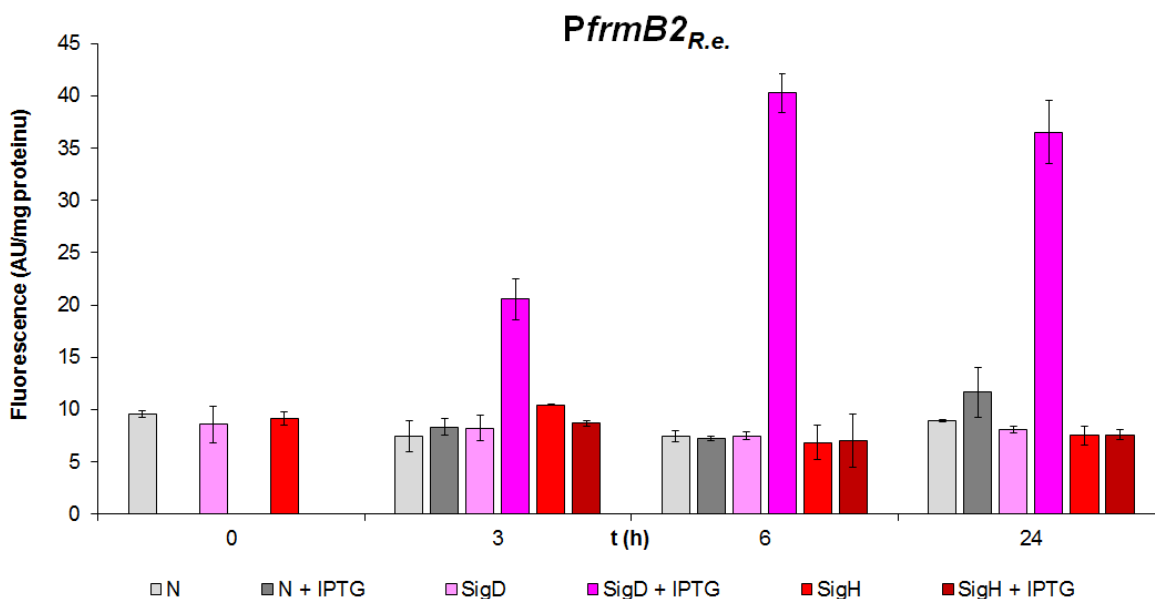
Z analýzy vyplynulo, že promotor *PfrmB1<sub>R.e</sub>* je velmi silný  $\sigma^D$ -dependentní promotor (Obr. 19). Aktivita promotoru v kmenech s plazmidem pEC-XT99Asig<sub>D<sub>R.e</sub></sub> se totiž v průběhu kultivace neustále zvyšovala a ve 24. hodině od indukce dosáhla přibližně dvacetinásobných hodnot oproti neindukovanému systému (IP = 20). Dvouplazmidový kmen nadprodukcující faktor  $\sigma^H_{R.e}$  vykazoval po indukci v průběhu kultivace aktivitu promotoru přibližně stejnou jako negativní kontrola.



**Obrázek 19. Aktivita promotoru *PfrmB1* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^{D_{R.e.}}$  a  $\sigma^{H_{R.e.}}$ .** Jednotlivé sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v arbitrárních jednotkách (AU/mg proteinu). Šedě jsou znázorněny hodnoty pro samotný vektor pECXT99A (označený jako N), fialově pro pECXT99A*sigD*<sub>R.e.</sub> a červeně pro pECXT99A*sigH*<sub>R.e.</sub>. Světlé odstíny platí vždy pro neindukované buňky a tmavé pro buňky indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření a směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

#### 5.2.1.1.5 Měření aktivity promotoru *PfrmB2*<sub>R.e.</sub> *in vivo*

V případě měření aktivity promotoru *PfrmB2*<sub>R.e.</sub> nastala obdobná situace jako u promotoru *PfrmB1*<sub>R.e.</sub>. Po indukci došlo opět k vysokému nárůstu aktivity promotoru v buňkách s nadprodukovaným faktorem  $\sigma^{D_{R.e.}}$  (IP = 5 v 6. hodině). V buňkách s nadprodukovaným faktorem  $\sigma^{H_{R.e.}}$  v průběhu 24h kultivace po indukci k nárůstu aktivity promotoru *PfrmB2* nedošlo (Obr. 20).



**Obrázek 20. Aktivita promotoru *PfrmB2* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^{D_{R.e.}}$  a  $\sigma^{H_{R.e.}}$ .** Šedě jsou znázorněny hodnoty pro samotný vektor pECXT99A (označený jako N), fialově pro pECXT99A*sigD*<sub>R.e.</sub> a červeně pro pEC-XT99A*sigH*<sub>R.e.</sub>. Světlé odstíny platí vždy pro neindukované buňky a tmavé pro buňky indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření a směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

### 5.2.1.2 Sledování aktivity promotorů pomocí transkripce *in vitro*

Další technika používaná v naší laboratoři pro sledování interakce mezi  $\sigma$  faktory RNAP a promotorem je transkripce *in vitro*. Doposud jsme používali RNAP,  $\sigma$  faktor i promotor, které pocházely ze stejného druhu bakterie, tedy *C. glutamicum* (Dostálová *et al.*, 2017). V případě promotorů *PfrmB1* a *PfrmB2* byl poprvé použit heterologní *in vitro* systém, v němž hlavní komponenty  $\sigma$  faktor + promotor pocházejí z *R. erythropolis*, zatímco jádro RNAP bylo izolováno z *C. glutamicum*. Tím vlastně vznikla úplná obdoba měření aktivity promotoru v heterologním systému *in vivo*, v němž se  $\sigma$  faktor a promotor původem z *R. erythropolis* kombinují s RNAP z hostitelské buňky *C. glutamicum*. Tak mohou být výsledky technik *in vitro* a *in vivo* porovnávány.

#### 5.2.1.2.1 Konstrukce plazmidů pro transkripci *in vitro* nesoucích promotory

##### *PfrmB1*<sub>R.e.</sub> a *PfrmB2*<sub>R.e.</sub>

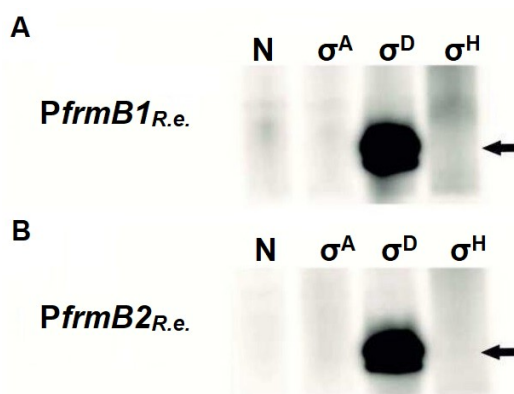
Stejně jako v přípravě konstruktů pro *in vivo* analýzu promotorů bylo klonování zahájeno asociací komplementárních oligonukleotidů o velikosti 73-74 nt odpovídajících sledovaným promotorovým sekvencím. Asociované páry PRS01090p770F + PRS01090p770R (pro promotor *PfrmB1*<sub>R.e.</sub>) a PRS25565p770F + PRS25565p770R (pro promotor *PfrmB2*<sub>R.e.</sub>) byly nejprve ligovány s vektorem pRLG770 štěpeným restrikcími endonukleázami HindIII a EcoRI. Následovala transformace *E. coli* a vysetí na pevné 2xYT



plotny s ampicilinem. Klony byly otestovány pomocí PCR prostřednictvím kombinace primerů 30F + CM3 a PCR BIO HS *Taq* Mix Red. Správnost nukleotidové sekvence izolovaných a přečištěných plazmidů předpokládaných pozitivních klonů byla ověřena sekvenováním. Purifikované plazmidy pRLG770*PfrmB1*<sub>R.e.</sub> a pRLG770*PfrmB2*<sub>R.e.</sub> byly použity pro amplifikaci oblastí, které nesly promotory *PfrmB1*<sub>R.e.</sub> a *PfrmB2*<sub>R.e.</sub> a přepisovaný úsek DNA zakončený terminátorem. Tyto oblasti sloužily jako templát pro transkripční reakci *in vitro*.

#### 5.2.1.2.2 Analýza aktivity promotorů *PfrmB1*<sub>R.e.</sub> a *PfrmB2*<sub>R.e.</sub> pomocí transkripce *in vitro*

Analýza aktivity promotorů *PfrmB1*<sub>R.e.</sub> a *PfrmB2*<sub>R.e.</sub> byla provedena pomocí transkripce *in vitro*, v níž byly použity izolované faktory  $\sigma^A$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^H$  *R. erythropolis* (izoloval Dr. Michal Grulich) a jádro RNA polymerázy *C. glutamicum* (izolovala Dr. Hana Dostálová). Každé měření obsahovalo 4 reakce, z toho 3 proběhly v přítomnosti faktoru  $\sigma^A$ ,  $\sigma^D$  nebo  $\sigma^H$  a jedna bez  $\sigma$  faktoru jako negativní kontrola (Obr. 21). Výsledky reakcí byly analyzovány gelovou elektroforézou a elektroforetogram byl vizualizován pomocí skeneru Amersham Typhoon.



**Obrázek 21.** *In vitro* transkripční analýza promotorů (radioaktivně značené transkripty detegované na laserovém skeneru). Dráha N ukazuje výsledek reakce s jádrem RNAP *C. glutamicum* bez přítomnosti  $\sigma$  faktoru (negativní kontrola). Zbývající dráhy ukazují produkty reakcí v přítomnosti faktorů  $\sigma^A$ ,  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  *R. erythropolis* a jádrem RNAP *C. glutamicum*. Šipka udává pozici očekávaného transkriptu (150 nt).

Během sledování aktivity promotorů *in vitro* byla prokázána silná transkripce z promotorů *PfrmB1*<sub>R.e.</sub> a *PfrmB2*<sub>R.e.</sub> s faktorem  $\sigma^D$ <sub>R.e.</sub> (Obr. 21). S přihlédnutím k výsledku měření aktivity těchto promotorů *in vivo* (Obr. 19, 20) můžeme jednoznačně potvrdit, že *PfrmB1*<sub>R.e.</sub> a *PfrmB2*<sub>R.e.</sub> jsou  $\sigma^D$ -dependentní promotory. Zároveň se potvrdila spolehlivost heterologních systémů *in vivo* a *in vitro* pro sledování aktivity promotorů *R. erythropolis*.

## 5.2.2 Regulační síť $\sigma$ faktorů RNA polymerázy *R. erythropolis*

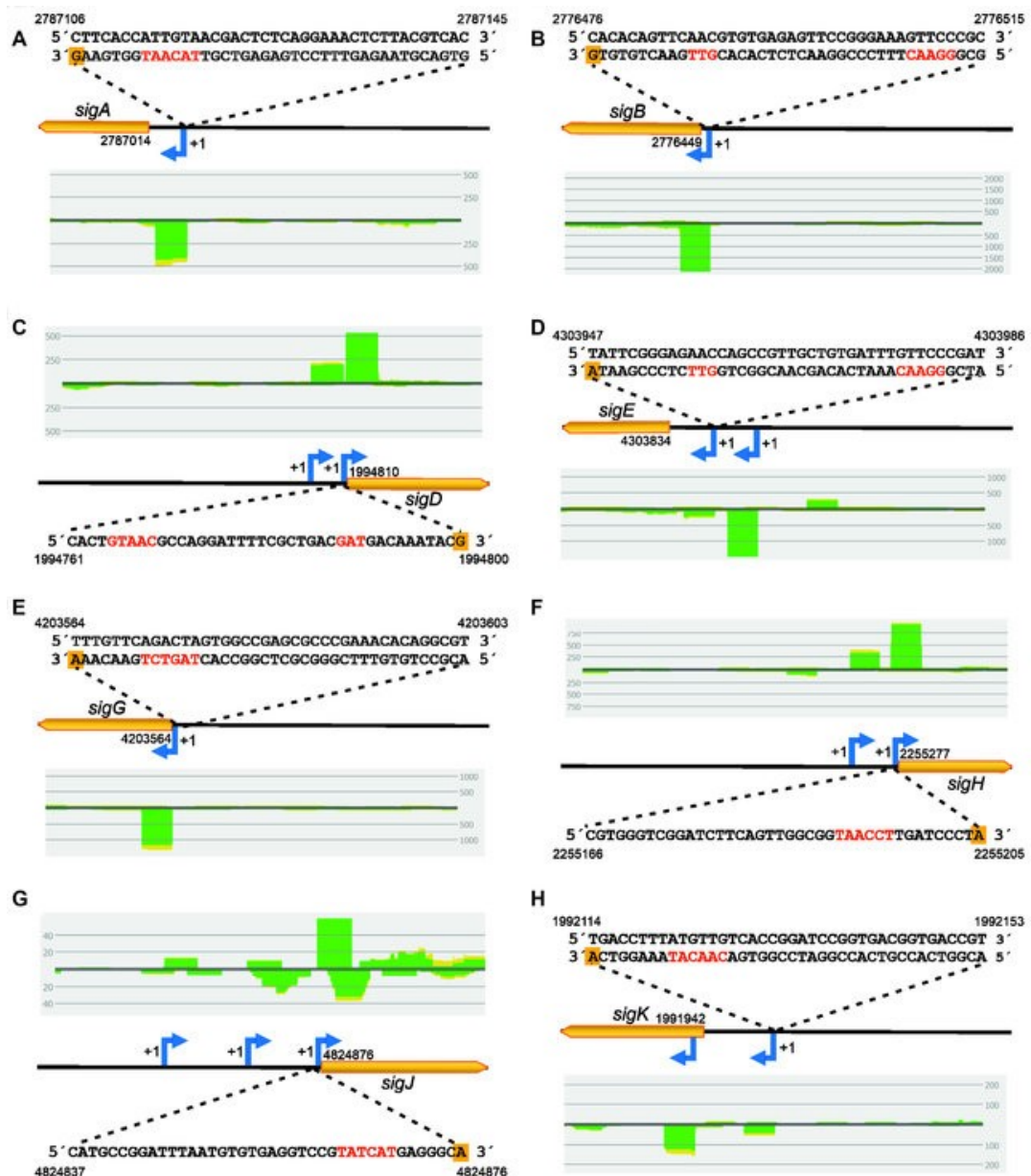
Studium  $\sigma$  faktorů u *C. glutamicum* prokázalo, že příslušné geny se vzájemně transkripčně regulují. Příkladem je faktor  $\sigma^H$ , který prostřednictvím  $\sigma^H$ -dependentních promotorů řídí transkripci *sigM* a *sigB* (společně se  $\sigma^E$ ). Předmětem našeho zájmu bylo zjistit, zda se regulační síť  $\sigma$  faktorů u příbuzných bakterií *C. glutamicum* a *R. erythropolis* podobají či zda jsou zcela odlišné. K tomu bylo třeba analyzovat promotory, které řídí expresi genů pro  $\sigma$  faktory *R. erythropolis*. Vzhledem k tomu, že u *R. erythropolis* je podle anotace genomu přítomno 21  $\sigma$  faktorů, vybrali jsme pro analýzu ty, které mají alespoň 54% podobnost známým  $\sigma$  faktorům, jejichž funkce byly určeny u *M. tuberculosis*. Tyto  $\sigma$  faktory jsou nejvíce konzervovány u příbuzných bakterií (rody *Rhodococcus*, *Corynebacterium* a *Mycobacterium*), řídí velký počet genů a tvoří pravděpodobně základ regulace metabolismu při exponenciálním růstu i při různých stresových odpovědích. Jsou to faktory  $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^J$  a  $\sigma^K$ . Využili jsme k tomu jak techniku globálního sekvenování transkriptomu (*RNA-seq*), tak analýzu aktivity jednotlivých promotorů *in vivo* či sledování aktivity s využitím *in vitro* transkripce.

Zásadním krokem pro nalezení transkripčních počátků a následně i promotorových sekvencí bylo sekvenování transkriptomu (*RNA-seq; high-throughput cDNA sequencing*) *R. erythropolis*. Po kultivaci kmene *R. erythropolis* CCM2595 v minimálním BSM médiu s glycerolem a nárůstu kultury do  $OD_{600} = 1,2$  následovalo zamražení peletu kultury (Dr. Hana Dostálová). Z této kultury byla izolována RNA a vytvořena cDNA knihovna určená k sekvenování RNA, které bylo provedeno ve spolupráci s *Laboratoří mikrobiální genomiky a biotechnologií* na Univerzitě v Bielefeldu (Německo). Kromě standardního sekvenování transkriptů byla použita metoda specifického sekvenování primárních 5'-konců knihovny cDNA (*sequencing of primary 5'-end-specific cDNA library*). Výsledky tohoto sekvenování 5'-konců transkriptů byly zpracovány pomocí softwaru ReadXplorer, díky čemuž se podařilo zmapovat starty transkriptů, a nakonec i sekvence promotorů genů *sigA*, *sigB*, *sigD*, *sigE*, *sigG*, *sigH*, *sigJ* a *sigK* (Obr. 22). Z analýzy sekvencí transkriptomu zároveň vyplynulo, že u všech detegovaných genů pro  $\sigma$  faktory s výjimkou *sigB* jsou přítomny vegetativní  $\sigma^A/\sigma^B$ -dependentní promotory (s charakteristickými konsenzuálními sekvencemi -35 ttgnc a -10 TAnnnT) (Obr. 23). Stresové promotory genů ECF  $\sigma$  faktorů P1*sigB*<sub>R.e.</sub>, P1*sigD*<sub>R.e.</sub>, P1*sigE*<sub>R.e.</sub> a P2*sigH*<sub>R.e.</sub> (Tab. 18) byly dále analyzovány prostřednictvím heterologních systémů *in vivo* a *in vitro* pro sledování aktivity promotorů v přítomnosti základních stresových faktorů skupiny 2 ( $\sigma^B$ <sub>R.e.</sub>) a skupiny 4 ( $\sigma^D$ <sub>R.e.</sub>,  $\sigma^E$ <sub>R.e.</sub> a  $\sigma^H$ <sub>R.e.</sub>).

**Tabulka 18.** Analyzované oblasti stresových promotorů genů pro faktory  $\sigma^B$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  *R. erythropolis*.

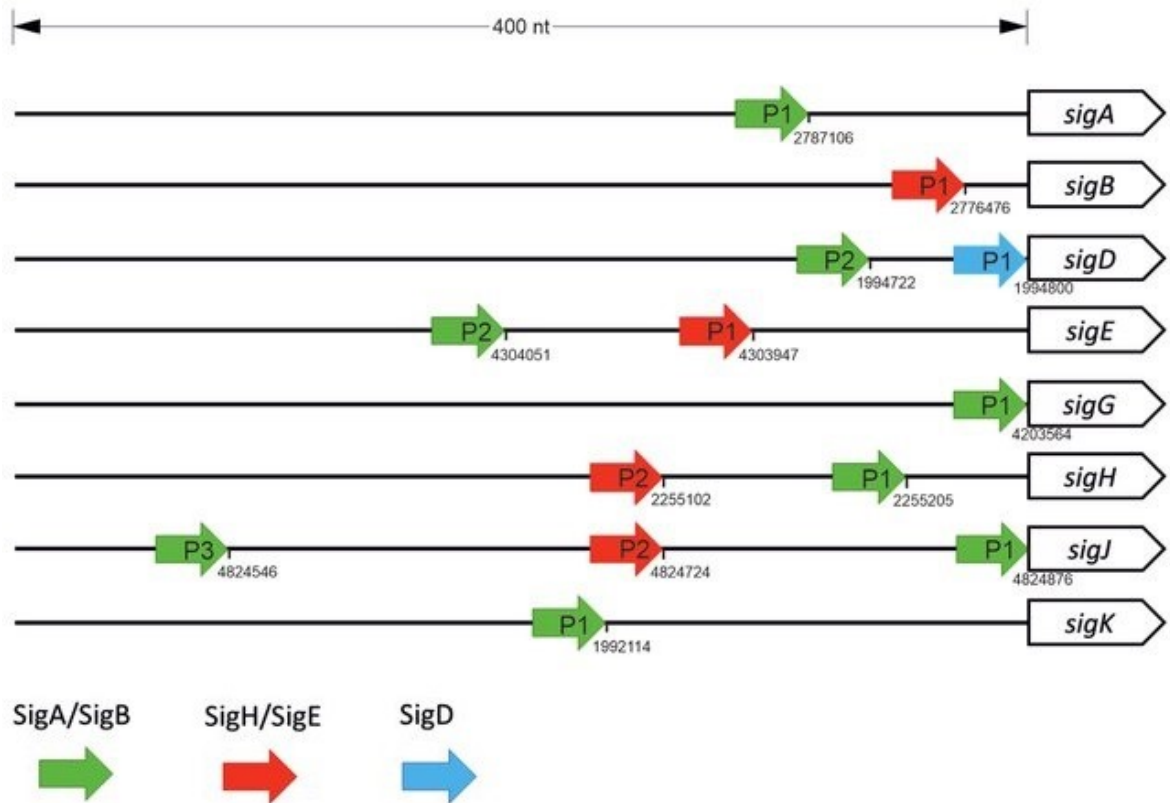
Promotor	Sekvence promotoru <sup>a</sup>
P1 <i>sigB</i> <sub>R.e.</sub>	GGAAATCGGCGCGGGAACTTTCCC GGAACTCTCACACGTTGAACTGTGTG
P1 <i>sigD</i> <sub>R.e.</sub>	CGGGAGGTGCCACTGTAACGCCAGGATTTTCGCTGACGATGACAAATACG
P1 <i>sigE</i> <sub>R.e.</sub>	CAGCTCGGTGATCGGGAACAAATCACAGCAACGGCTGTTCTCCCGAATA
P2 <i>sigH</i> <sub>R.e.</sub>	TCCGACCAGGCCGGGAACAGAGTCGCAGACTCCCGTGTGGTACCAGTTG

<sup>a</sup> Tučným a podtrženým písmem jsou vyznačeny klíčové nukleotidy definující promotor, tedy oblast -35, oblast -10 a transkripční start (TSS).



**Obrázek 22.** Příklady stanovení transkripčních startů (TSS) genů pro  $\sigma$  *R. erythropolis* CCM2595 na základě výsledku sekvenování RNA a mapování 5' konců transkriptů pomocí programu ReadXplorer. Žluté je označen gen pro konkrétní  $\sigma$  faktor. Modrá šipka označuje pozici TSS promotoru daného genu, která byla určena na základě zvýšeného signálu odpovídajícímu množství 5' konce transkriptu (zelená barva). Signály znázorňující transkripty (zeleně) jsou nad nebo pod středovou linií podle polohy (a tím orientace) genu v horním nebo spodním vlákně.

Podle charakteristických sekvencí jsme identifikovali před *sig* geny *R. erythropolis* také vegetativní promotory ( $\sigma^A$ -dependentní) (Obr. 23). Další analýzu těchto promotorů jsme však neprováděli vzhledem k tomu, že systém *in vivo* neposkytuje jednoznačné výsledky. To je zřejmě způsobeno tím, že vysoká hladina faktoru  $\sigma^A$  během celé doby kultivace způsobuje vysokou aktivitu promotoru a jeho nadprodukce nemá na hodnoty aktivity vliv.



Obrázek 23. Lokalizace nalezených potenciálních promotorů *sig* genů *R. erythropolis* CCM2595 pomocí analýzy oblasti 400 nt před translačními starty strukturálních genů kódujících  $\sigma$  faktory.

### 5.2.2.1 Konstrukce plazmidů s promotory $P1sigB_{R.e.}$ , $P1sigD_{R.e.}$ , $P1sigE_{R.e.}$ a $P2sigH_{R.e.}$ pro měření aktivity *in vivo*

Komplementární oligonukleotidy odpovídající vybraným promotorům (Tab. 19) v délce 72-80 nt byly po vzájemné asociaci v cyklu ligovány s plazmidem pEPR1 štěpeným enzymy BamHI-HF a NsiI-HF. Další postup byl shodný s postupem v kapitole 5.2.1.1.1. Izolované a purifikované konstrukty pEPR1P1*sigB*<sub>R.e.</sub>, pEPR1P1*sigD*<sub>R.e.</sub>, pEPR1P1*sigE*<sub>R.e.</sub> a pEPR1P2*sigH*<sub>R.e.</sub> byly využity k tvorbě dvouplazmidových kmenů *C. glutamicum*.

**Tabulka 19.** Oligonukleotidy použité pro klonování promotorů.

Oligonukleotid	Promotor
PSigB70REF	P1 <i>sigB</i> <sub>R.e.</sub>
PSigB70RER	
PSigD70REF1/2	P1 <i>sigD</i> <sub>R.e.</sub>
PSigD70RER1/2	
PSigE70REF	P1 <i>sigE</i> <sub>R.e.</sub>
PSigE70RER	
PSigH70REF	P1 <i>sigH</i> <sub>R.e.</sub>
PSigH70RER	

### 5.2.2.2 Konstrukce plazmidů s geny $\sigma$ faktorů *sigA*<sub>R.e.</sub>, *sigB*<sub>R.e.</sub> a *sigE*<sub>R.e.</sub> z *R. erythropolis*

S využitím odpovídajících dvojic primerů (Tab. 20) byly pomocí Q5 polymerázy amplifikovány z izolované chromozomální DNA *R. erythropolis* CCM2595 fragmenty obsahující geny *sigA*<sub>R.e.</sub>, *sigB*<sub>R.e.</sub> a *sigE*<sub>R.e.</sub>. Správná velikost amplifikovaných fragmentů byla ověřena elektroforézou a následovala purifikace. Poté byly fragmenty štěpeny restriktčními endonukleázami EcoRI a XbaI a ligovány s vektorem pEC-XT99A štěpeným stejnými enzymy. Následující kroky byly stejné jako v případě kapitoly 5.2.1.1.2. Sekvenované přečištěné plazmidy pEC-XT99A*sigA*<sub>R.e.</sub>, pEC-XT99A*sigB*<sub>R.e.</sub> a pEC-XT99A*sigE*<sub>R.e.</sub> posloužily k tvorbě dvouplazmidových systémů v *C. glutamicum*.

**Tabulka 20.** Primery použité pro klonování a ověření klonů.

Primer	PCR produkt
SIGAREPECF2	Amplikon nesoucí gen <i>sigA</i> <sub>R.e.</sub>
SIGAREPECR	
SIGBREPECF	Amplikon nesoucí gen <i>sigB</i> <sub>R.e.</sub>
SIGBREPECR	
SIGEREPECF	Amplikon nesoucí gen <i>sigE</i> <sub>R.e.</sub>
SIGEREPECR	
SIGAREPECF2	Gen <i>sigA</i> <sub>R.e.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	
SIGBREPECF	Gen <i>sigB</i> <sub>R.e.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	
SIGEREPECF	Gen <i>sigE</i> <sub>R.e.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	

### 5.2.2.3 Konstrukce plazmidů s promotory $P1sigB_{R.e.}$ , $P1sigD_{R.e.}$ , $P1sigE_{R.e.}$ a $P2sigH_{R.e.}$ pro *in vitro* analýzu aktivity promotorů

Komplementární páry oligonukleotidů odpovídající analyzovaným promotorům (Tab. 21) o délce 77-78 nt byly po vzájemné asociaci v termocykleru klonovány ve vektoru pRLG770 štěpeném restričními endonukleázami HindIII a EcoRI. Další postup byl stejný jako v kapitole 5.2.1.2.1. Purifikované plazmidy pRLG770 $P1sigB_{R.e.}$ , pRLG770 $P1sigD_{R.e.}$ , pRLG770 $P1sigE_{R.e.}$  a pRLG770 $P2sigH_{R.e.}$  byly použity pro amplifikaci oblastí nesoucích sledované promotory  $P1sigB_{R.e.}$ ,  $P1sigD_{R.e.}$ ,  $P1sigE_{R.e.}$ ,  $P2sigH_{R.e.}$  a přepisovaný úsek DNA zakončený terminátorem. Tyto oblasti sloužily jako templát pro transkripční reakci *in vitro*.

Tabulka 21. Oligonukleotidy použité pro klonování promotorů.

Oligonukleotid	Promotor
PSIGBP770REF	$P1sigB_{R.e.}$
PSIGBP770RER	
P1SIGDP770REF	$P1sigD_{R.e.}$
P1SIGDP770RER	
PSIGHP770REF	$P1sigH_{R.e.}$
PSIGHP770RER	

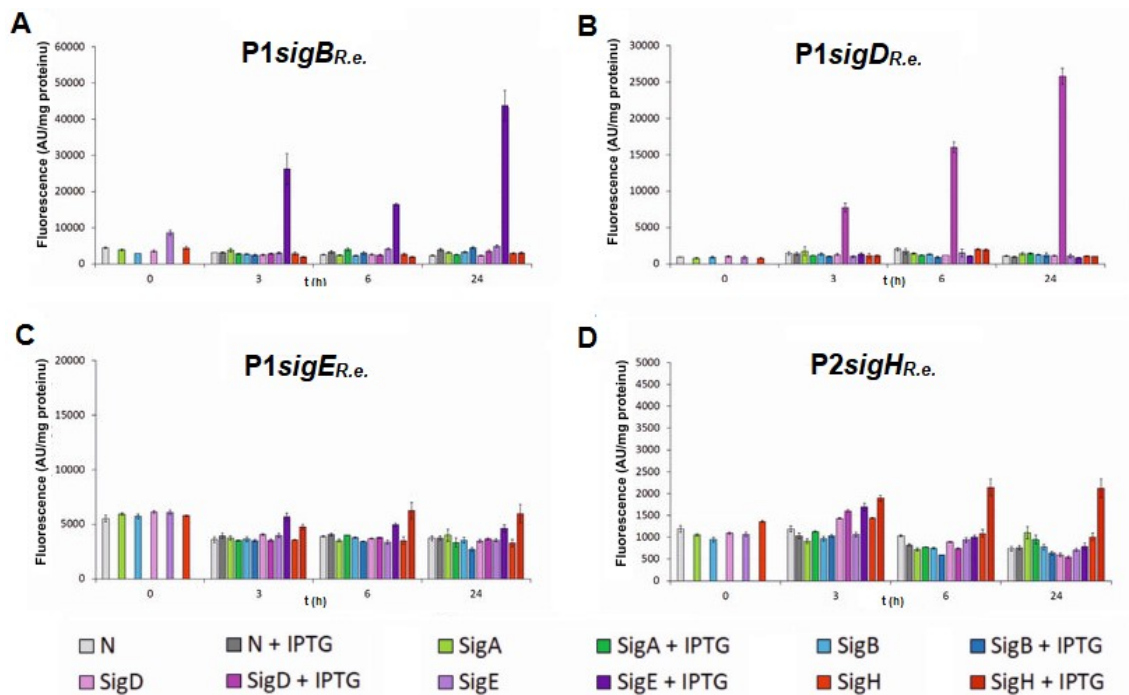
### 5.2.2.4 Měření aktivity promotorů $P1sigB_{R.e.}$ , $P1sigD_{R.e.}$ , $P1sigE_{R.e.}$ a $P2sigH_{R.e.}$ v heterologních systémech *in vivo*

Dvouplazmidové kmeny *C. glutamicum* obsahující plazmid pEC-XT99A s vloženými geny  $sigA_{R.e.}$ ,  $sigB_{R.e.}$ ,  $sigD_{R.e.}$ ,  $sigE_{R.e.}$ ,  $sigH_{R.e.}$  v kombinaci se všemi testovanými promotory klonovanými v pEPR1 byly vytvořeny obdobným způsobem jako v předchozích kapitolách. Postup měření byl stejný jako v kapitole 5.2.1.1.4.

Při měření aktivity promotoru  $P1sigB_{R.e.}$  *in vivo* ve dvouplazmidových kmenech *C. glutamicum* (Obr. 24A) došlo po indukci k výraznému nárůstu aktivity promotoru v přítomnosti nadprodukovaného faktoru  $\sigma^{E_{R.e.}}$  (indukční poměr IP = 9), zatímco exprese  $sigB_{R.e.}$ ,  $sigD_{R.e.}$  a  $sigH_{R.e.}$  hodnotu aktivity nezměnila.

Při měření aktivity promotoru  $P1sigD_{R.e.}$  v *C. glutamicum* došlo po přidání induktoru ke zvýšení aktivity promotoru výhradně v přítomnosti nadprodukovaného faktoru  $\sigma^{D_{R.e.}}$  (IP = 27) (Obr. 24B). V ostatních případech nebyla pozorována zvýšená aktivita promotoru po přidání induktoru.

Aktivita promotoru  $P1sigE_{R.e.}$  se zvýšila jen při nadprodukci faktorů  $\sigma^{E_{R.e.}}$  a  $\sigma^{H_{R.e.}}$  (Obr. 24C). IP však v těchto případech byl pouze cca 1,5. V případě  $P2sigH_{R.e.}$  byl naměřen nárůst aktivity promotoru pouze v buňkách nadprodukujících  $\sigma^{H_{R.e.}}$  (IP = 2).



**Obrázek 24. Aktivita promotorů  $P1sigB_{R.e.}$ ,  $P1sigD_{R.e.}$ ,  $P1sigE_{R.e.}$  a  $P2sigH_{R.e.}$  *in vivo*.** N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.

### 5.2.2.5 Analýza aktivity promotorů $P1sigB_{R.e.}$ , $P1sigD_{R.e.}$ , $P1sigE_{R.e.}$ a $P2sigH_{R.e.}$ pomocí *in vitro* transkripce

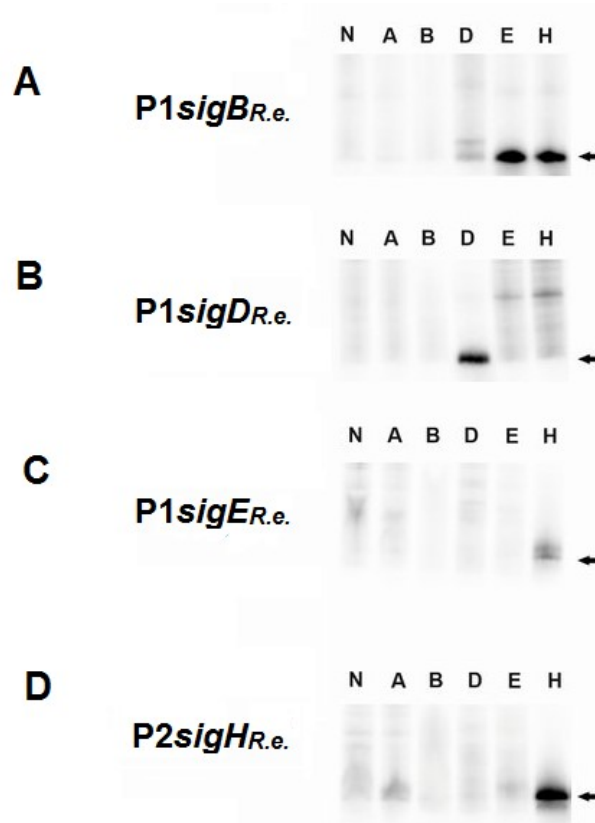
Pro analýzu aktivity promotorů  $P1sigB_{R.e.}$ ,  $P1sigD_{R.e.}$ ,  $P1sigE_{R.e.}$  a  $P2sigH_{R.e.}$  *in vitro* byly použity izolované faktory  $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  z *R. erythropolis* a jádro RNAP z *C. glutamicum*. Jako negativní kontrola byla použita reakce bez přítomnosti izolovaného  $\sigma$  faktoru. Postup měření byl stejný jako v kapitole 5.2.1.2.2.

Detekcí aktivity promotoru  $P1sigB_{R.e.}$  *in vitro* byl prokázán vznik transkriptu jak v přítomnosti  $\sigma^E_{R.e.}$ , tak i  $\sigma^H_{R.e.}$  (Obr. 25A). Pokud srovnáme výsledky *in vivo* (Obr. 24A) a *in vitro* (Obr. 25A), je zřejmé, že promotor  $P1sigB_{R.e.}$  je  $\sigma^E_{R.e.}$ -dependentní a za určitých podmínek též  $\sigma^H_{R.e.}$ -dependentní.

Sledování aktivity  $P1sigD_{R.e.}$  *in vitro* prokázalo vznik transkriptu pouze v přítomnosti  $\sigma^D_{R.e.}$  (Obr. 25B), což je v souladu i s analýzou *in vivo* (Obr. 24B).  $P1sigD_{R.e.}$  je tedy velmi silný specifický  $\sigma^D$ -dependentní promotor.

Promotor  $P1sigE_{R.e.}$  byl při analýze *in vitro* aktivní pouze, když byl v transkripční reakci přítomen faktor  $\sigma^H_{R.e.}$  (Obr. 25C). Při analýze *in vivo* byl  $P1sigE_{R.e.}$  aktivní jak v přítomnosti  $\sigma^E_{R.e.}$ , tak se  $\sigma^H_{R.e.}$  (Obr. 24C). Závěr je tedy podobný jako v případě  $P1sigB_{R.e.}$ .

V případě analýzy *in vitro* posledního sledovaného promotoru,  $P2sigH_{R.e.}$ , byl transkript detekován pouze s faktorem  $\sigma^H_{R.e.}$  (Obr. 25D). Jelikož analýza promotoru *in vivo* ukázala stejný výsledek (Obr. 24D), bylo potvrzeno, že se skutečně jedná o  $\sigma^H$ -dependentní promotor.



**Obrázek 25.** *In vitro* transkripční analýza promotorů: **A)  $P1sigB_{R.e.}$ , B)  $P1sigD_{R.e.}$ , C)  $P1sigE_{R.e.}$  a D)  $P2sigH_{R.e.}$ .** Pro stanovení aktivity promotorů *in vitro* bylo provedeno 6 transkripčních reakcí pro všechny sledované promotory. (N) kontrola, výsledek reakce s jádrem RNAP *C. glutamicum* bez  $\sigma$  faktoru. (A, B, D, E H), produkty reakcí v přítomnosti faktorů  $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  *R. erythropolis* a jádra RNAP *C. glutamicum*. Šipka udává pozici očekávaného transkriptu (150 nt). Templáty pro reakci byly fragmenty DNA obsahující promotory  $P1sigB_{R.e.}$ ,  $P1sigD_{R.e.}$ ,  $P1sigE_{R.e.}$  a  $P2sigH_{R.e.}$ .

Výsledky *in vivo* a *in vitro* analýz prokázaly, že s výjimkou  $sigB_{R.e.}$ , jehož promotor byl charakterizován jako  $\sigma^E_{R.e.}/\sigma^H_{R.e.}$ -dependentní, byly ostatní analyzované geny pro  $\sigma$  faktory autoregulovány.

### 5.2.3 $\sigma^H$ - (a $\sigma^E$ -) dependentní promotory *R. erythropolis*

Z předchozího studia *sig* genů *R. erythropolis* vyplývalo, že podobně jako u *C. glutamicum* se rekogniční specifita faktorů  $\sigma^E_{R.e.}/\sigma^H_{R.e.}$  překrývá. U *C. glutamicum* faktory  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  regulují odpovědi na teplotní, oxidativní a povrchové stresy a jejich regulony se částečně překrývají (Busche *et al*, 2023). U *R. erythropolis* tyto regulony nebyly dosud



popsány, proto jsme zahájili jejich studium analýzou regulonu faktoru  $\sigma^H$ , který je u příbuzných bakterií globálním regulátorem.

Využili jsme při tom sekvenování RNA transkriptomu u kmene *R. erythropolis* CCM2595 nadprodukujícího faktor  $\sigma^H$  a měření aktivity *in vivo* ve dvouplazmidových systémech *C. glutamicum*.

### 5.2.3.1 Identifikace $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentních promotorů v přítomnosti nadprodukovaného faktoru $\sigma^H$

Kmen *R. erythropolis* CCM2595 byl elektroporací transformován expresním plazmidem pEC-XT99A*sigH<sub>R.e.</sub>*. Takto vytvořený kmen byl kultivován v minimálním BSM médiu s glycerolem a tetracyklinem. Po dosažení  $OD_{600} = 1$  byla exprese *sigH<sub>R.e.</sub>* indukována IPTG a kultura byla rozdělena na kontrolní a indukovanou. Po dosažení  $OD_{600} = 2$  byly pelety kultur zamrazeny. Z takto sklizených buněk byla izolována RNA a vytvořena knihovna cDNA určená k sekvenování RNA. Další postup byl stejný jako v kapitole 5.2.2. Zmapovali jsme tak transkriptom *R. erythropolis* CCM2595 se zaměřením na  $\sigma^H$  regulon. Analýzou transkriptomu jsme identifikovali 51 nadexprimovaných a 8 podexprimovaných genů. U 10 nadexprimovaných genů jsme našli sekvence potenciálních  $\sigma^H$ -dependentních promotorů, tedy těch obsahujících motiv GGAA v oblasti -35 a motiv GTT v oblasti -10 (Tab. 22). Tyto promotory byly podrobeny další analýze.

**Tabulka 22.** Výčet  $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentních promotorů genů se zvýšenou expresí při nadprodukci faktoru  $\sigma^H$  *R. erythropolis*.

Promotor	ID genu	Sekvence promotoru <sup>a</sup>
P1RS03175 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS03175	ACGTGACTCG <u>GGACT</u> AATCCCGACCCTGTTTCGTT <u>GTT</u> GCACCTTCGG
P1RS06830 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS06830	ACCCCTCGCTCC <u>GGAA</u> GTTTTTCAGGC-TGGGGGAGC <u>GTT</u> GACCAGATTCA
P1RS07285 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS07285	TTGACCAGGG <u>GGAAA</u> TAGGAAAGCCGCCAGATG <u>GTT</u> GCACCTTCCA
P0RS08240 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS08240	TTAGGCGTCC <u>GGATG</u> AAACTTTCC-GAATTCCTT <u>GTT</u> GCTCCGAGAG
P1RS11800 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS11800	GACTGCCTCC <u>GGAAC</u> AAACCGGCCGCACGGCGTC <u>GTT</u> GGTGCAGATA
P1RS15250 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS15250	ATCGGCTCAG <u>GGAA</u> GAATCAGCGG-TTCCGGGGC <u>GTT</u> GCACACACCA
P1RS15955 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS15955	CCGTCTCGG <u>GGAA</u> TATCGCTTCC-CCGAGGACG <u>GTT</u> GCGCGAGACA
P1RS17335 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS17335	GGACCGCCGG <u>GGAAC</u> AAATCCGATGCGCGGCGCT <u>GTT</u> GCACCCACCG
P1RS21305 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS21305	AGTCAGGCGAC <u>GGAA</u> TAGGTCGAGG-GTCCGCCGC <u>GTT</u> GAACAAACCCG
P1RS21310 <sub>R.e.</sub>	O5Y_RS21310	AGGTTCCGGTGG <u>GGAA</u> TGCCTCCTG-GCGCCCGTGC <u>GTT</u> GGATCCACATA

<sup>a</sup>Tučným a podtrženým písmem jsou vyznačeny klíčové oblasti definující promotorovou sekvenci, tedy oblast -35, oblast -10 a TSS.

Předpokládanými proteinovými produkty těchto genů byly oxidoreduktáza rodiny DsbA (O5Y\_RS03175), N-acetyltransferáza rodiny GNAT (O5Y\_RS06830),

flavin-dependentní oxidoreduktáza třídy LLM (O5Y\_RS07285 a O5Y\_RS08240), F420-dependentní oxidoreduktáza třídy PPOX (O5Y\_RS11800), thioredoxin (O5Y\_RS15250), NADP-dependentní oxidoreduktáza (O5Y\_RS15955), NADH oxidáza (O5Y\_RS17335), oxidoreduktáza (O5Y\_RS21305) a aldo/keto reduktáza (O5Y\_RS21310). S přihlédnutím k roli faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  u *C. glutamicum* (Kim *et al.*, 2005; Busche *et al.*, 2023) lze předpokládat, že tyto geny mají úlohu v redoxních procesech a odpovědi na teplotní či oxidativní stres.

### 5.2.3.2 Příprava konstruktů s potenciálními $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentními promotory z *R. erythropolis*

Páry oligonukleotidů (Tab. 23) o délce 70-78 nt byly po vzájemné asociaci v termocyklu klonovány ve vektoru pEPR1 štěpeném restričními endonukleázami BamHI a NsiI. Další kroky byly stejné jako v případě kapitoly 5.2.1.1.1. Purifikované plazmidy s vybranými promotory P1RS03175<sub>R.e.</sub>, P1RS06830<sub>R.e.</sub>, P1RS07285<sub>R.e.</sub>, P1RS11800<sub>R.e.</sub> a P1RS15250<sub>R.e.</sub> byly použity k tvorbě dvouplazmidových systémů v *C. glutamicum*.

**Tabulka 23.** Oligonukleotidy použité pro klonování sledovaných promotorů.

Oligonukleotid	Promotor
O5YRS03175F	P1RS03175 <sub>R.e.</sub>
O5YRS03175R	
O5YRS06830F	P1RS06830 <sub>R.e.</sub>
O5YRS06830R	
O5YRS07285F	P1RS07285 <sub>R.e.</sub>
O5YRS07285R	
O5YRS11800F	P1RS11800 <sub>R.e.</sub>
O5YRS11800R	
O5YRS15250F	P1RS15250 <sub>R.e.</sub>
O5YRS15250R	

### 5.2.3.3 Měření aktivity potenciálních $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentních promotorů ve dvouplazmidovém systému *C. glutamicum*

Aktivita promotorů z *R. erythropolis* klonových ve vektoru pEPR1 v kmenech *C. glutamicum* nesoucích geny *sigA*<sub>R.e.</sub>, *sigE*<sub>R.e.</sub> a *sigH*<sub>R.e.</sub> v expresním vektoru pEC-XT99A byla stanovena stejně jako v předchozích kapitolách. Jako negativní kontrola měření aktivity promotoru byly použity dvouplazmidové kmeny obsahující prázdný vektor pEC-XT99A.

V případě analýzy promotoru P1RS03175 (Obr. 26A) došlo po indukci k největšímu nárůstu aktivity (IP = 1,84) v buňkách s nadprodukovaným faktorem  $\sigma^{E_{R.e}}$  ve 3. hodině. K nárůstu aktivity promotoru, i když podstatně nižšímu, došlo i v případě buněk s nadprodukovaným faktorem  $\sigma^{H_{R.e}}$  (IP = 1,26). Z tohoto měření vyplývá, že promotor P1RS3175<sub>R.e.</sub> je jak  $\sigma^{E_{R.e}}$ -, tak i  $\sigma^{H_{R.e}}$ -dependentní.

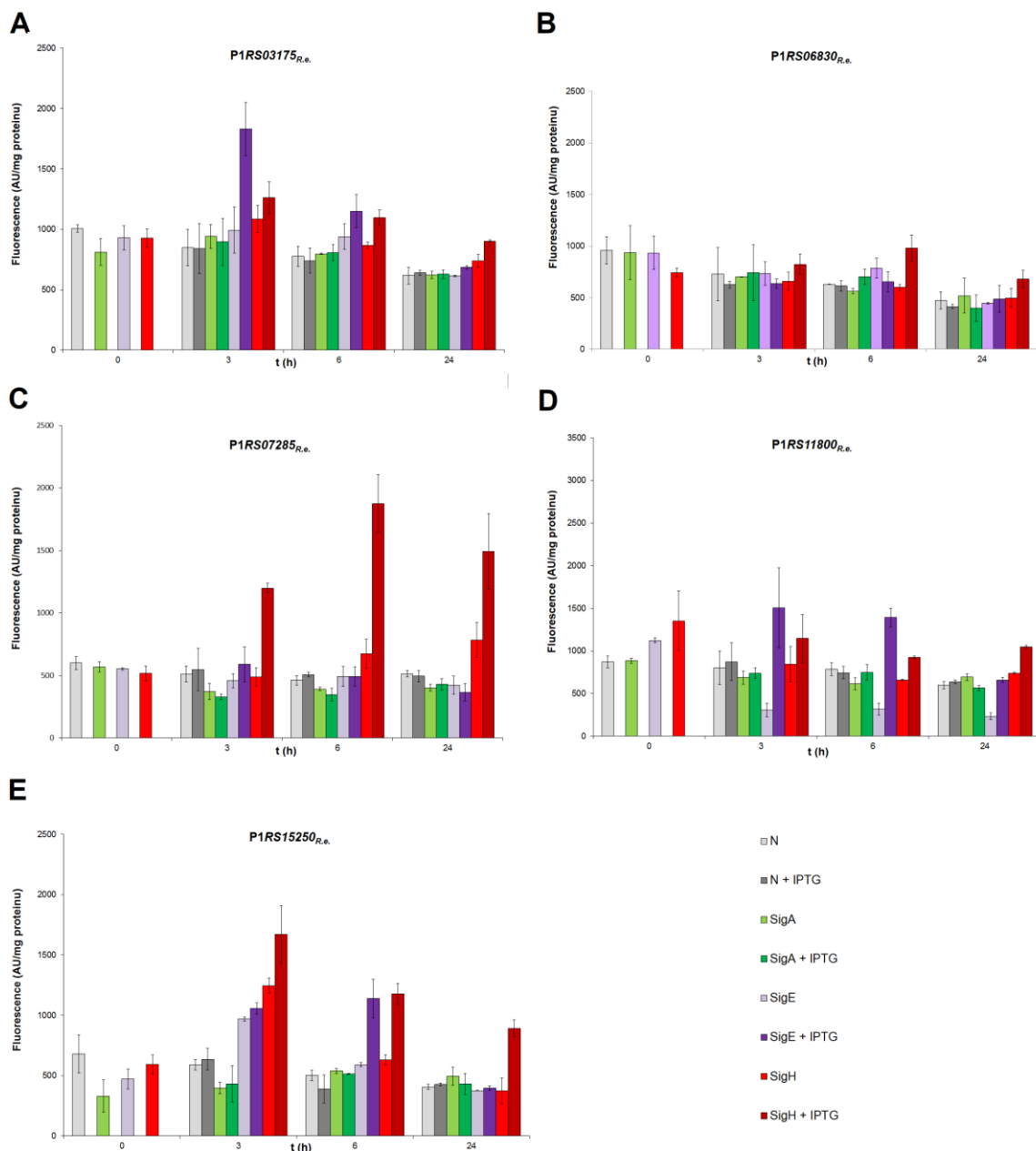
Při *in vivo* analýze P1RS06830<sub>R.e.</sub> (Obr. 26B) byl po přidání induktoru pozorován nárůst aktivity promotoru pouze v buňkách nadprodukujících faktor  $\sigma^{H_{R.e}}$  (IP = 1,63 v 6. hodině po indukci). Ostatní kmeny vykazovaly aktivitu promotoru srovnatelnou s negativní kontrolou.

P1RS07285<sub>R.e.</sub> se ukázal jako nejsilnější a nejspecifičtější  $\sigma^{H_{R.e}}$ -dependentní promotor (Obr. 26C). Po indukci došlo k nárůstu aktivity promotoru pouze v buňkách nadprodukujících  $\sigma^{H_{R.e}}$ , přičemž v 6. hodině byl tento nárůst nejvyšší (IP = 3). Ostatní dvouplazmidové kmeny vykazovaly po indukci aktivitu srovnatelnou s hodnotou negativní kontroly.

Při analýze P1RS11800<sub>R.e.</sub> (Obr.26D) byl zjištěn největší nárůst aktivity promotoru v buňkách nadprodukujících faktory  $\sigma^{E_{R.e}}$  (IP = 5) a  $\sigma^{H_{R.e}}$  (IP = 1,4). Jedná se tak o další  $\sigma^{H_{R.e.}}/\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependentní promotor, i když je evidentní, že na aktivitu promotoru *in vivo* má větší vliv nadprodukce  $\sigma^{E_{R.e}}$  než nadprodukce  $\sigma^{H_{R.e}}$ .

K  $\sigma^{H_{R.e.}}/\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependentním promotorům zjevně patří i promotor P1RS15250<sub>R.e.</sub>, avšak v jeho případě byl vyšší nárůst aktivity v buňkách nadprodukujících  $\sigma^{H_{R.e}}$  (IP = 1,9 v 6. hodině a IP = 2,4 ve 24. hodině po indukci) než v buňkách nadprodukujících  $\sigma^{E_{R.e}}$  (IP = 1,8 v 6. hodině). Jedná se tak o promotor více  $\sigma^{H_{R.e}}$ - než  $\sigma^{E_{R.e}}$ -dependentní (Obr. 26E).

Aktivita zbývajících promotorů (Tab. 22) byla měřena v disertační práci kolegy Ing. Lukáše Plašila. Z výsledků vyplynulo, že všechny sledované promotory vykazovaly překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^H/\sigma^E$ . Jediným čistě  $\sigma^H$ -dependentním byl promotor genu pro NADP-dependentní oxidoreduktázu P1RS15955<sub>R.e.</sub>



**Obrázek 26. Aktivita promotorů P1RS03175<sub>R.e.</sub>, P1RS06830<sub>R.e.</sub>, P1RS07285<sub>R.e.</sub>, P1RS11800<sub>R.e.</sub> a P1RS15250<sub>R.e.</sub> *in vivo*. N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.**

## 5.2.4 Analýza překryvu rekogniční specifity faktorů $\sigma^E$ a $\sigma^H$

### *R. erythropolis*

V předchozích měřeních byly analyzovány promotory genů pro stresové  $\sigma$  faktory *R. erythropolis* CCM2595 (kapitola 5.2.2) a promotory genů nalezených při sekvenování transkriptomu indukovaného faktorem  $\sigma^H_{R.e.}$  (kapitola 5.2.3). Byly určeny sekvence  $\sigma^E_{R.e.}$ - a  $\sigma^H_{R.e.}$ -dependentních promotorů *R. erythropolis* a pomocí *in vivo* měření aktivity promotoru

v heterologním dvouplazmidovém systému *C. glutamicum* byla tato skutečnost potvrzena (Tab. 24). Výsledky měření aktivity promotorů *in vivo* ukázaly, že pokud se u těchto promotorů v pozici -31 před TSS nachází nukleotid C, je pravděpodobnější, že promotor bude  $\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependentní. V případě promotoru  $P1sigB_{R.e.}$  obsahujícího na pozici -31 také C byla jeho aktivita měřená *in vivo* dokonce striktně  $\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependentní (Obr. 24A). Jako striktně  $\sigma^{H_{R.e.}}$ -dependentní promotor se *in vivo* (Obr. 26C) prokázal promotor  $P1RS07285_{R.e.}$ , který má v pozici -31 přítomný A. Pro potvrzení významu pozice -31 v sekvencích  $\sigma^{E_{R.e.}}$ -/ $\sigma^{H_{R.e.}}$ -dependentních promotorů byly vybrány  $P1sigB_{R.e.}$  a  $P1RS07285_{R.e.}$ , u nichž byla dále v této pozici provedena bodová mutagenese.

**Tabulka 24.** Přřazení  $\sigma^E$ -/ $\sigma^H$ -dependentních promotorů z *R. erythropolis* k  $\sigma$  faktorům.

Promotor	-35 <sup>a</sup>	-10	$\sigma$ faktor
$P1sigB_{R.e.}$	GGAAC	GTT	$\sigma^E$
$P1sigE_{R.e.}$	GGAAC	GTT	$\sigma^E/\sigma^H$
$P2sigH_{R.e.}$	GGAAC	GTT	$\sigma^H$
$P1RS03175_{R.e.}$	GGACT	GTT	$\sigma^E/\sigma^H$
$P1RS06830_{R.e.}$	GGAAG	GTT	$\sigma^H$
$P1RS07285_{R.e.}$	GGAAA	GTT	$\sigma^H$
$P1RS11800_{R.e.}$	GGAAC	GTT	$\sigma^E/\sigma^H$
$P1RS15250_{R.e.}$	GGAAG	GTT	$\sigma^E/\sigma^H$

<sup>a</sup> Žlutou barvou jsou vyznačeny nukleotidy v pozici -31 před TSS.

#### 5.2.4.1 Mutantní varianty promotorů $P1sigB_{R.e.}$ a $P1RS07285_{R.e.}$

Navrhli jsme několik mutantních variant  $P1sigB_{R.e.}$  a  $P1RS07285_{R.e.}$  se záměnami v oblasti -35 obou promotorů (Tab. 25). Takové mutace by měly vést ke změně rozpoznávání promotorů faktory  $\sigma^{E_{R.e.}}$  a  $\sigma^{H_{R.e.}}$ . Předpokládali jsme, že záměna nukleotidu -31 GGAAC → GGAAA promotoru  $P1sigB_{R.e.}$  způsobí, že z tohoto  $\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependentního promotoru se stane  $\sigma^{H_{R.e.}}$ -dependentní promotor. U záměny nukleotidu -31 GGAAA → GGAAC promotoru  $P1RS07285_{R.e.}$  se naopak předpokládalo, že ze striktního  $\sigma^{H_{R.e.}}$ -dependentního promotoru se stane promotor s alespoň částečnou  $\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependencí.

**Tabulka 25.** Sekvence promotorů P1sigB<sub>R.e.</sub>, P1RS07285<sub>R.e.</sub> a jejich mutantních variant.

Promotor	Sekvence promotoru <sup>a</sup>
P1sigB <sub>R.e.</sub>	AATCGGCGCG <u>GGAAC</u> TTTCCCAGAACTCTCACAC <u>GTT</u> GAACTGTGT <u>G</u>
P1RS07285 <sub>R.e.</sub>	TTGACCAGGG <u>GGAAA</u> TAGGAAAGCCGGCCAGATG <u>GTT</u> GCACCTTCC <u>A</u>
P1sigB <sub>R.e.</sub> G <sub>-31</sub>	AATCGGCGCG <u>GGAAC</u> <b>G</b> TTTCCCAGAACTCTCACAC <u>GTT</u> GAACTGTGT <u>G</u>
P1sigB <sub>R.e.</sub> A <sub>-31</sub>	AATCGGCGCG <u>GGAA</u> <b>A</b> TTTCCCAGAACTCTCACAC <u>GTT</u> GAACTGTGT <u>G</u>
P1sigB <sub>R.e.</sub> T <sub>-31</sub>	AATCGGCGCG <u>GGAA</u> <b>T</b> TTTCCCAGAACTCTCACAC <u>GTT</u> GAACTGTGT <u>G</u>
P1RS07285 <sub>R.e.</sub> G <sub>-31</sub>	TTGACCAGGG <u>GGAA</u> <b>G</b> TAGGAAAGCCGGCCAGATG <u>GTT</u> GCACCTTCC <u>A</u>
P1RS07285 <sub>R.e.</sub> C <sub>-31</sub>	TTGACCAGGG <u>GGAA</u> <b>C</b> TAGGAAAGCCGGCCAGATG <u>GTT</u> GCACCTTCC <u>A</u>
P1RS07285 <sub>R.e.</sub> T <sub>-31</sub>	TTGACCAGGG <u>GGAA</u> <b>T</b> TAGGAAAGCCGGCCAGATG <u>GTT</u> GCACCTTCC <u>A</u>

<sup>a</sup>Klíčové oblasti promotoru oblastí -35 a -10 a TSS jsou podtrženy. Červeně je vyznačena změna v konkrétní pozici nukleotidu oproti původnímu promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub> a fialově je vyznačena změna v promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub>.

#### 5.2.4.2 Tvorba konstruktů nesoucích mutantní varianty promotorů P1sigB<sub>R.e.</sub> a P1RS07285<sub>R.e.</sub>

K vytvoření mutantních variant promotorů P1sigB<sub>R.e.</sub> a P1RS07285<sub>R.e.</sub> byly jako templáty pro PCR použity plazmidy pEPR1P1sigB<sub>R.e.</sub> a pEPR1P1RS07285<sub>R.e.</sub>. Amplifikace mutantních variant P1sigB<sub>R.e.</sub> pomocí soupravy Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit proběhla s dvojicemi primerů: P1sigBREmut-35GPEPRF + P1sigBREmut-35GPEPRF (G<sub>-31</sub>), P1sigBREmut-35APEPRF + P1sigBREmut-35APEPRR (A<sub>-31</sub>) a P1sigBREmut-35TPEPRF + P1sigBREmut-35TPEPRR (T<sub>-31</sub>). Pro mutaci promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub> byly použity tyto dvojice primerů: PRS07285mut-35GPEPRF + PRS07285mut-35GPEPRR (G<sub>-31</sub>), PRS07285mut-35CPEPRF + PRS07285mut-35CPEPRR (C<sub>-31</sub>) a PRS07285mut-35TPEPRF + PRS07285mut-35TPEPRR (T<sub>-31</sub>). Plazmidový konstrukt s mutací v promotoru byl připraven dle postupu doporučeného výrobcem soupravy pro mutagenézi (fosforylace, ligace a eliminace templátu). Konstruktem byly pak transformovány buňky *E. coli* TOP10. Přítomnost očekávaného konstruktů byla v buňkách transformantů prokázána PCR s použitím vektorových primerů TRPTCGF1 + GFP1 a mixtu PCR BIO HS Taq. Mutace v promotoru byla pak ověřena sekvenováním. Získané plazmidy pEPR1 nesoucí promotory P1sigB<sub>R.e.</sub>G<sub>-31</sub>, P1sigB<sub>R.e.</sub>A<sub>-31</sub>, P1sigB<sub>R.e.</sub>T<sub>-31</sub>, P1RS07285<sub>R.e.</sub>G<sub>-31</sub>, P1RS07285<sub>R.e.</sub>C<sub>-31</sub> a P1RS07285<sub>R.e.</sub>T<sub>-31</sub> byly použity k tvorbě dvouplazmidových kmenů *C. glutamicum*.

### 5.2.4.3 Měření aktivity mutantních variant promotorů P1sigB<sub>R.e.</sub> a P1RS07285<sub>R.e.</sub> ve dvouplazmidovém systému *C. glutamicum*

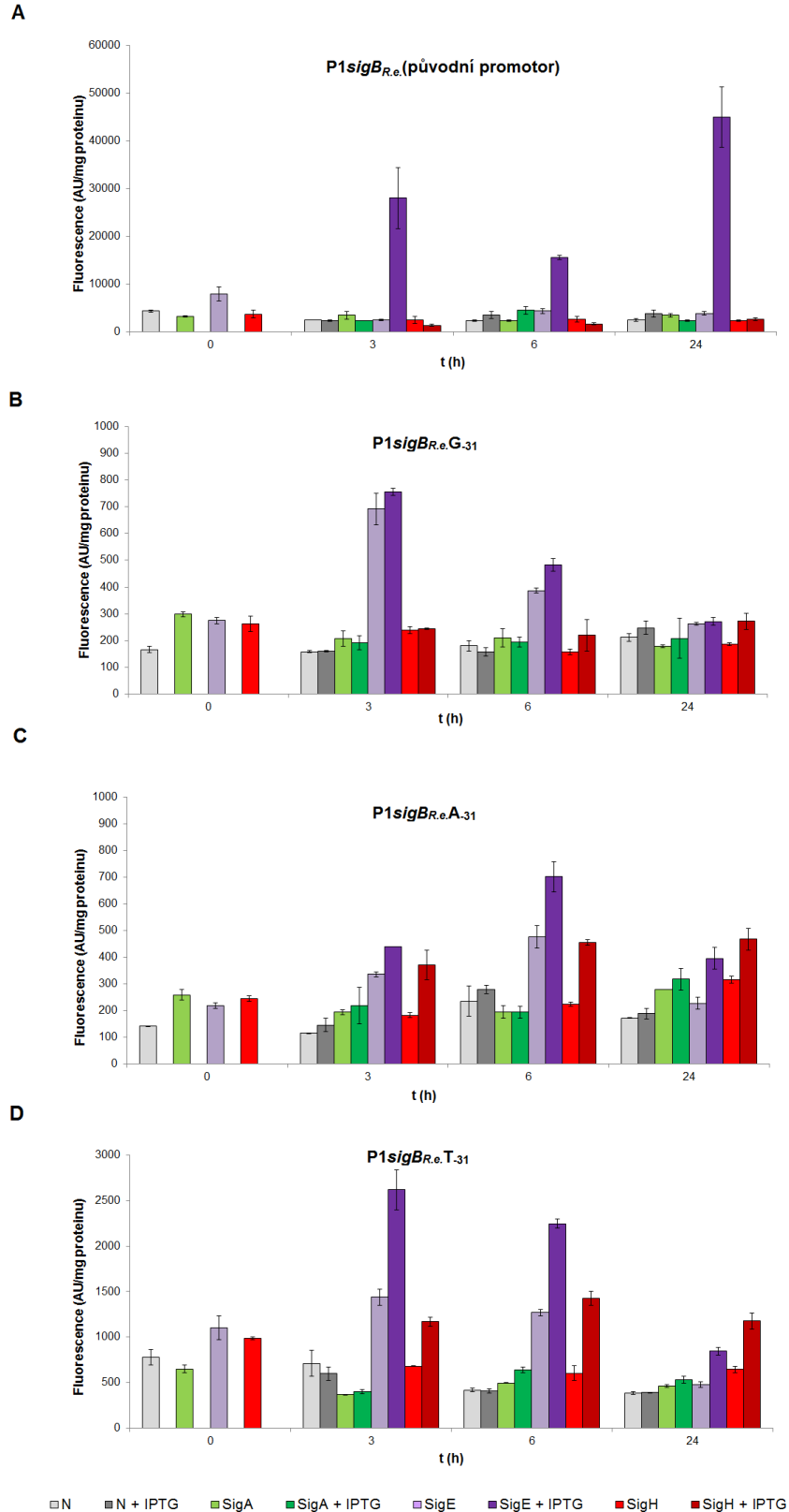
Příprava a *in vivo* měření aktivity promotorů v systémech *C. glutamicum* nesoucích mutantní promotory z kapitoly 5.2.4.2 a plazmidově lokalizované geny sigA<sub>R.e.</sub>, sigE<sub>R.e.</sub> a sigH<sub>R.e.</sub> byly stejné jako v předchozích kapitolách. Jako negativní kontrola byly použity buňky obsahující sledovaný promotor a prázdný vektor pEC-XT99A.

První sledovaná mutantní varianta P1sigB<sub>R.e.</sub>G<sub>-31</sub> měla záměnu -31 GGAAC → GGAAG v promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub> (Obr. 27B). Jak ukazují výsledky měření, nárůst aktivity promotoru v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^{E_{R.e.}}$  byl snížen (IP = 1,25) ve srovnání s hodnotami naměřenými v *in vivo* analýze původního promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub> (IP = 9) (Obr. 27A). Kupodivu i v neindukovaném kmeni s plazmidem pEC-XT99A nesoucím gen pro faktor  $\sigma^{E_{R.e.}}$ , byla naměřená přibližně čtyřnásobná aktivita promotoru oproti buňkám nesoucím prázdný vektor pEC-XT99A. V kmenech nadprodukcujícím faktor  $\sigma^{H_{R.e.}}$  došlo pouze k nepatrnému nárůstu aktivity promotoru v 6. a 24. hodině (IP = 1,4).

Záměna -31 GGAAC → GGAAA promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub> vytvořila  $\sigma^{H_{R.e.}}/\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependentní promotor P1sigB<sub>R.e.</sub>A<sub>-31</sub> (Obr. 27C). Lehký nárůst aktivity promotoru nastal u buněk nadprodukcujících faktor  $\sigma^{E_{R.e.}}$  v 6. (IP = 1,47) a 24. hodině (IP = 1,75), tedy daleko slabší než v případě původního promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub>. U těchto buněk také byla naměřena poměrně vysoká aktivita promotoru v neindukovaném stavu, při kterém hodnoty naměřené v 6. hodině dosáhly přibližně dvojnásobku aktivity promotoru negativní kontroly. V systému nadprodukcujícím faktor  $\sigma^{H_{R.e.}}$  byl největší nárůst aktivity promotoru zaznamenán v 6. hodině (IP = 2).

Jako  $\sigma^{H_{R.e.}}/\sigma^{E_{R.e.}}$ -dependentní promotor se projevila i mutantní varianta P1sigB<sub>R.e.</sub>T<sub>-31</sub> se záměnou -31 GGAAC → GGAAT v sekvenci promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub> (Obr. 27D). Největší nárůst aktivity promotoru byl v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^{E_{R.e.}}$  ve 3. hodině po indukci (IP = 1,82). V případě kmene nadprodukcujícího faktor  $\sigma^{H_{R.e.}}$  byl největší nárůst aktivity promotoru v 6. hodině po indukci (IP = 2,4).

Z výsledků měření aktivity promotorů P1sigB<sub>R.e.</sub>G<sub>-31</sub>, P1sigB<sub>R.e.</sub>A<sub>-31</sub> a P1sigB<sub>R.e.</sub>T<sub>-31</sub> ve dvouplazmidových kmenech *C. glutamicum* vychází, že pokud je v pozici -31 promotoru přítomen nukleotid A nebo T, tak dochází k lepšímu rozpoznání promotoru faktorem  $\sigma^{H_{R.e.}}$ . Nicméně ani tato záměna zcela neruší závislost promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub> na faktoru  $\sigma^{E_{R.e.}}$ .



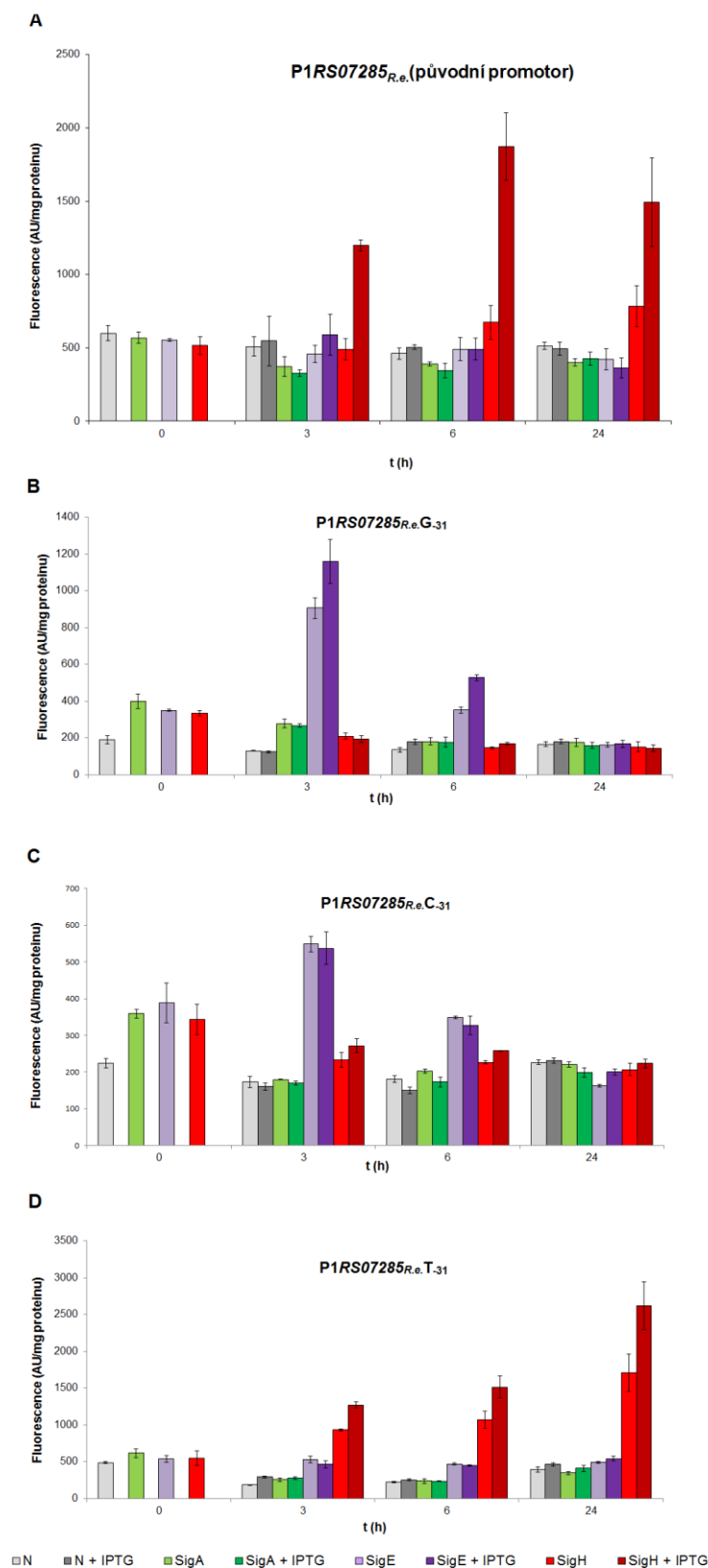
**Obrázek 27. Aktivita mutantních variant promotoru *P1sigB<sub>R.e.</sub>* se záměnou v pozici -31 promotoru v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^{A_{R.e.}}$ ,  $\sigma^{E_{R.e.}}$  a  $\sigma^{H_{R.e.}}$ . N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.**



Mutantní varianta P1RS07285<sub>R.e.</sub>G-31 nesla záměnu -31 GGAAA → GGAAGG v sekvenci promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub>. Při sledování aktivity promotoru *in vivo* byl nejvyšší nárůst aktivity zaznamenán v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^E_{R.e.}$  ve 3. (IP = 1,3) a 6. hodině (IP = 1,5) po indukci exprese (Obr. 28B). V tomto případě však došlo i ve stavu bez indukce až k sedminásobnému nárůstu aktivity ve srovnání s negativní kontrolou. Aktivita P1RS07285<sub>R.e.</sub>G-31 v přítomnosti nadprodukovaného faktoru  $\sigma^H_{R.e.}$  byla oproti původnímu promotoru (Obr. 28A) úplně potlačena.

U mutantní varianty P1RS07285<sub>R.e.</sub>C-31 se záměnou -31 GGAAA → GGAACC v sekvenci promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub> jsme očekávali nejvyšší naměřenou aktivitu v případě buněk nadprodukcujících faktor  $\sigma^E_{R.e.}$ . Sice aktivita v těchto kmenech byla ve 3. hodině třikrát vyšší než aktivita negativní kontroly, ale nebyl zde rozdíl mezi indukovaným a neindukovaným stavem (Obr. 28C). Aktivita promotoru v přítomnosti nadprodukovaného faktoru  $\sigma^H_{R.e.}$  byla opět zcela potlačena a její úroveň byla srovnatelná s negativní kontrolou.

Poslední sledovaná mutantní varianta P1RS07285<sub>R.e.</sub>T-31 se záměnou -31 GGAAA → GGAATI v sekvenci promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub> se jako jediná pozměněná varianta promotoru projevila jako  $\sigma^H_{R.e.}$ -dependentní promotor (Obr. 28D). Největší nárůst aktivity po indukci byl naměřen v buňkách s nadprodukovaným faktorem  $\sigma^H_{R.e.}$  ve 24. hodině po indukci (IP = 1,53). Aktivita v těchto buňkách při neindukovaném stavu byla šestkrát vyšší než hodnoty negativní kontroly. V buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^E$  byla po celou dobu kultivace aktivita na úrovni negativní kontroly.



**Obrázek 28. Aktivita mutantních variant promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub> se záměnou v pozici -31 promotoru v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^{A_{R.e.}}$ ,  $\sigma^{E_{R.e.}}$  a  $\sigma^{H_{R.e.}}$  N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.**

## 5.2.5 Stresové $\sigma$ regulony *R. opacus* PD630 v přítomnosti telluričitanu draselného

Další biotechnologicky významný mikroorganismus, který byl zahrnut do našeho studia stresových regulonů rhodokoků, byl *R. opacus*. Stejně jako *R. erythropolis* je i *R. opacus* studován díky své odolnosti vůči řadě stresových podmínek a biodegradačnímu potenciálu. Ve spolupráci s *Laboratoří molekulární environmentální mikrobiologie* (Universita di Bologna, Itálie) a *Laboratoří mikrobiální genomiky a biotechnologií* (Univerzita Bielefeld, Německo) bylo provedeno sekvenování RNA transkriptomu kmene *R. opacus* PD630 v přítomnosti telluričitanu draselného. Sloučeniny telluru se do prostředí dostávají lidskou činností (elektronika, těžba ropy, výroba fotočlánků, či polovodičový průmysl). Je známo, že jsou velmi toxické a některé bakterie rodu *Rhodococcus* je dokážou zpracovat na méně toxické formy (Presentato *et al.*, 2016).

K identifikaci a potvrzení stresových promotorů bylo využito mapování 5' konce transkriptů (viz předchozí kapitoly) a měření aktivity *in vivo* ve dvouplazmidových systémech *C. glutamicum*.

### 5.2.5.1 Identifikace ECF-dependentních promotorů genů *R. opacus* PD630 se zvýšenou expresí v přítomnosti telluričitanu draselného

Výsledky sekvenování RNA transkriptomu *R. opacus* PD630 ukázaly, že během kultivace v minimálním médiu s glukózou a telluričitanem draselným došlo k nadexpresi 1821 genů a podexpresi 1943 genů ve srovnání s kontrolní kultivací (médiu s glukózou bez přítomnosti telluričitanu draselného). Mapováním 5' konců transkriptů nadexprimovaných genů byly determinovány TSS a následně i potenciální promotorové sekvence (program ReadXplorer), a to na základě předpokládaných shodných konsenzuálních sekvencí pro -35 a -10 oblasti promotoru s odpovídajícími známými konsenzuálními sekvencemi promotorů *C. glutamicum* a u *R. erythropolis*. I přes to, že většina promotorů byla vegetativní, podařilo se nám identifikovat 10 promotorů s potenciální dependencí pro ECF-faktory  $\sigma^D_{R.o.}$ ,  $\sigma^E_{R.o.}$  a  $\sigma^H_{R.o.}$  (Tab. 26).

**Tabulka 26.** ECF-dependentní promotory genů se zvýšenou expresí v přítomnosti telluričitanu draselného u *R. opacus* PD630.

Promotor	Sekvence promotoru <sup>a</sup>	Gen
P1RS13650 <sub>R.o.</sub>	GGGGAGGTGCCACT <b>CTAAC</b> GCCAGGATATTCAGCAA <b>CGAT</b> GACTAATAC <b>G</b>	<i>sigD</i>
P1RS19340 <sub>R.o.</sub>	CTGCGGCCTCTTCG <b>CTAAC</b> GATAGGGGAGTTTCGCT <b>CGAT</b> ATCGTCATC <b>A</b>	<i>K2Z90_RS19340</i>
P0RS25360 <sub>R.o.</sub>	TTCCGGTCTCCCT <b>CTAAC</b> TCCCCGCCGATGTAGGAGG <b>CGAC</b> TGTGGCGA <b>C</b>	<i>K2Z90_RS25360</i>
P2RS01905 <sub>R.o.</sub>	AACTTTCCTTTGCG <b>CGAA</b> TCGCTCCGTGACCCCAACT <b>CTT</b> GCGCAGGGT <b>G</b>	<i>K2Z90_RS01905</i>
P1RS06830 <sub>R.o.</sub>	CCCTGCCGTGAGCG <b>GGAA</b> GATCCGGGTTCTGTCTGT <b>CTT</b> GGACCGAGT <b>C</b>	<i>K2Z90_RS06830</i>
P2RS07365 <sub>R.o.</sub>	ATTCTGAGACGGCG <b>GGAA</b> CATCTGGTCCGGGAGCCCG <b>CTT</b> GGACAGTCC <b>C</b>	<i>K2Z90_RS07365</i>
P2RS15515 <sub>R.o.</sub>	GGGACGTCCGGAG <b>GGAA</b> GTTCGAGGGGTCTCCGGT <b>CTT</b> GTCGACATAA <b>G</b>	<i>rlmN</i>
P1RS16460 <sub>R.o.</sub>	AAATTACCGCCG <b>GGAA</b> CTTTCCAGGCCTTCGGTGC <b>CTT</b> GATCCATAT <b>G</b>	<i>sigB</i>
P1RS25935 <sub>R.o.</sub>	CGAGCGGGTCTCCG <b>GGAA</b> GGATTCCCGGCAGGGAGGT <b>CTT</b> GACTGGAC <b>G</b>	<i>K2Z90_RS25935</i>
P0RS39075 <sub>R.o.</sub>	CCAGATTTGAACAA <b>GGAA</b> TAGATTACTTGCCGATGTG <b>CTT</b> GTTGACGGCA <b>A</b>	<i>K2Z90_RS39075</i>

<sup>a</sup>Tučným a podtrženým písmem jsou vyznačeny klíčové oblasti definující promotorovou sekvenci, tedy oblast -35, oblast -10 a TSS. Fialové jsou vyznačeny sekvence odpovídající potenciálním  $\sigma^D$ -dependentním promotorům a červeně sekvence odpovídající potenciálním  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -dependentním promotorům.

Předpokládané proteinové produkty genů těchto promotorů byly faktor  $\sigma^D$  (promotor P1RS13650<sub>R.o.</sub>), transkripční regulátor z rodiny OmpR (promotor P1RS19340<sub>R.o.</sub>), sulfatáza (promotor P0RS25360<sub>R.o.</sub>), ATP-vazebná podjednotka Clp proteázy (promotor P1RS06830<sub>R.o.</sub>), aldo/ketoreduktáza (promotor P2RS07365<sub>R.o.</sub>), superoxiddismutáza (promotor P2RS01905<sub>R.o.</sub>), transkripční regulátor z rodiny AraC (promotor P0RS39075<sub>R.o.</sub>), faktor  $\sigma^B$  (promotor P1RS16460<sub>R.o.</sub>), adenin C2-metyláza pro 23S RNA (promotor P2RS15515<sub>R.o.</sub>) a dithiol-disulfidizomeráza (P1RS25935<sub>R.o.</sub>). K zjištění aktivit těchto promotorů *in vivo* byl testován heterologní dvouplazmidový systém, kdy v buňce *C. glutamicum* byl nadprodukován  $\sigma$  faktor *R. opacus* a analyzován promotor *R. opacus*.

### 5.2.5.2 Konstrukce expresních vektorů s geny $\sigma$ faktorů *R. opacus*

S využitím odpovídajících dvojic primerů (Tab. 27) byly pomocí Q5 polymerázy amplifikovány z izolované chromozomální DNA *R. opacus* PD630 fragmenty obsahující geny *sigA*<sub>R.o.</sub>, *sigB*<sub>R.o.</sub>, *sigD*<sub>R.o.</sub>, *sigE*<sub>R.o.</sub> a *sigH*<sub>R.o.</sub>. Správná velikost amplifikovaných fragmentů byla ověřena elektroforézou a následovala purifikace. Poté byly fragmenty štěpeny restrikními endonukleázami EcoRI a XbaI a ligovány s vektorem pEC-XT99A štěpeným stejnými enzymy. Amplikon nesoucí gen *sigH*<sub>R.o.</sub> byl jako jediný štěpen enzymy SacI a XbaI a získaný fragment byl ligován s vektorem pEC-XT99A štěpeným stejnými enzymy. Následující kroky byly stejné jako v případě kapitoly 5.2.1.1.2. Sekvenované přečištěné plazmidy pEC-XT99A*sigA*<sub>R.o.</sub>, pEC-XT99A*sigB*<sub>R.o.</sub>, pEC-XT99A*sigD*<sub>R.o.</sub>, pEC-XT99A*sigE*<sub>R.o.</sub> a pEC-XT99A*sigH*<sub>R.o.</sub> posloužily k tvorbě dvouplazmidových systémů v *C. glutamicum*.

**Tabulka 27.** Primery použité pro klonování a ověření klonů.

Primer	PCR produkt
SIGAPD630pECF	Amplikon nesoucí gen <i>sigA</i> <sub>R.o.</sub>
SIGAPD630pECR	
SIGBPD630pECF	Amplikon nesoucí gen <i>sigB</i> <sub>R.o.</sub>
SIGBPD630pECR	
SIGDPD630pECF	Amplikon nesoucí gen <i>sigD</i> <sub>R.o.</sub>
SIGDPD630pECR	
SIGEPD630pECF	Amplikon nesoucí gen <i>sigE</i> <sub>R.o.</sub>
SIGEPD630pECR	
SIGHPD630pECF	Amplikon nesoucí gen <i>sigH</i> <sub>R.o.</sub>
SIGHPD630pECR	
SIGAPD630pECF	Gen <i>sigA</i> <sub>R.o.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	
SIGBPD630pECF	Gen <i>sigB</i> <sub>R.o.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	
SIGDPD630pECF	Gen <i>sigD</i> <sub>R.o.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	
SIGEPD630pECF	Gen <i>sigE</i> <sub>R.o.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	
SIGHPD630pECF	Gen <i>sigH</i> <sub>R.o.</sub> klonovaný v pEC-XT99A
ECXT99AR	

### 5.2.5.3 Příprava konstruktů s potenciálními ECF-dependentními promotory z *R. opacus*

Páry oligonukleotidů (Tab. 28) o délce 72-80 nt byly po vzájemné asociaci v termocyklu klonovány ve vektoru pEPR1 štěpeném restričními enzymy BamHI a NsiI. Další kroky byly stejné jako v případě kapitoly 5.2.1.1.1. Purifikované plazmidy s vybranými promotory pEPR1P1RS13650<sub>R.o.</sub>, pEPR1P1RS19340<sub>R.o.</sub>, pEPR1P0RS25360<sub>R.o.</sub>, pEPR1P1RS06830<sub>R.o.</sub>, pEPR1P2RS07365<sub>R.o.</sub>, pEPR1P2RS01905<sub>R.o.</sub>, pEPR1P0RS39075<sub>R.o.</sub>, pEPR1P1RS16460<sub>R.o.</sub>, pEPR1P2RS15515<sub>R.o.</sub> a pEPR1P1RS25935<sub>R.o.</sub> byly použity k tvorbě dvouplazmidových systémů v *C. glutamicum*.

**Tabulka 28.** Oligonukleotidy použité pro klonování sledovaných promotorů.

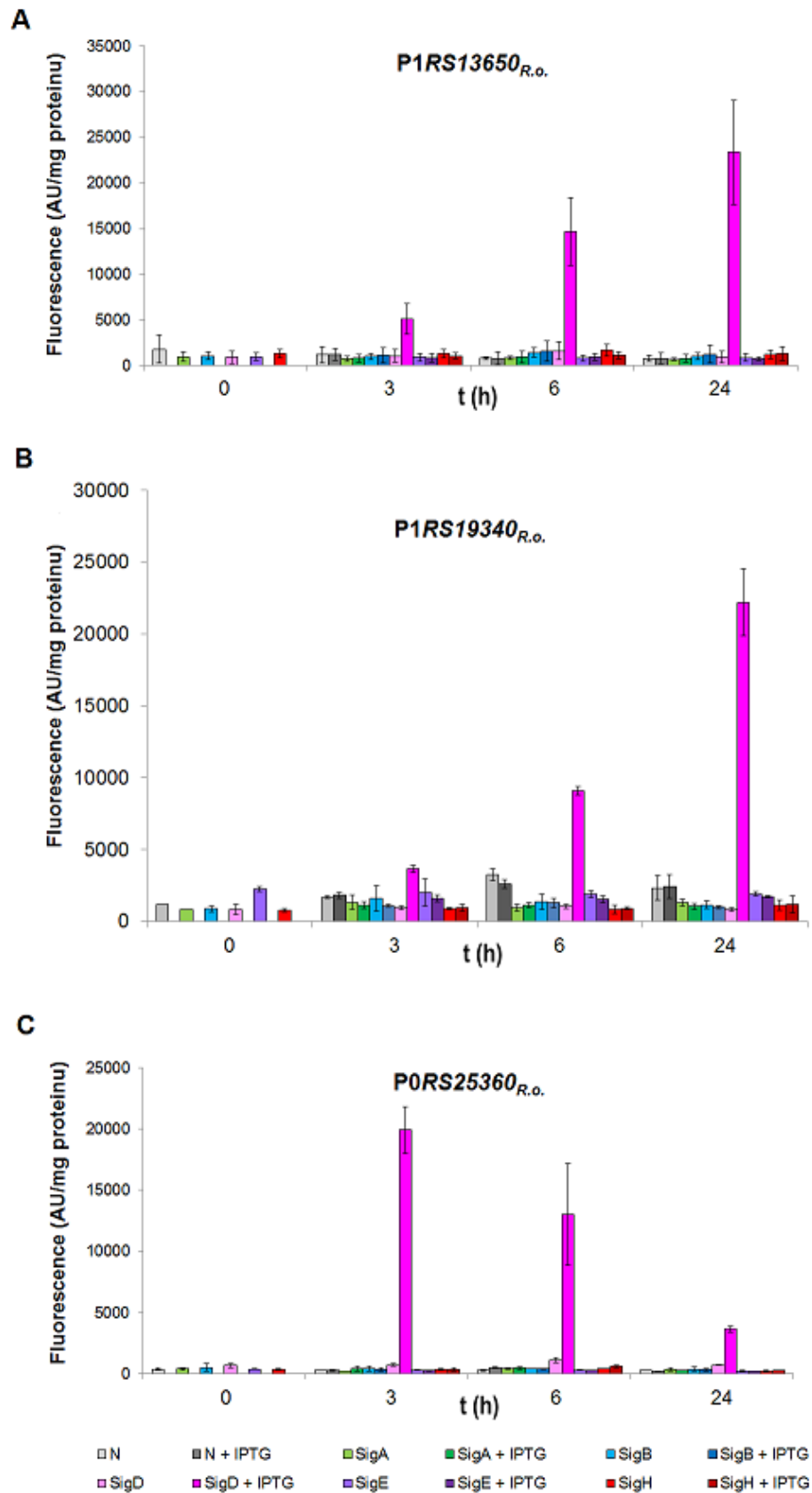
Oligonukleotid	Promotor
P2RS01905PD630pEPRF	P2RS01905 <sub>R.o.</sub>
P2RS01905PD630pEPRR	
P1RS06830PD630pEPRF	P1RS06830 <sub>R.o.</sub>
P1RS06830PD630pEPRR	
P1RS13650PD630pEPRF	P1RS13650 <sub>R.o.</sub>
P1RS13650PD630pEPRR	
P2RS15515PD630pEPRF	P2RS15515 <sub>R.o.</sub>
P2RS15515PD630pEPRR	
P1RS16460PD630pEPRF	P1RS16460 <sub>R.o.</sub>
P1RS16460PD630pEPRR	
P1RS19340PD630pEPRF	P1RS19340 <sub>R.o.</sub>
P1RS19340PD630pEPRR	
P0RS25360PD630pEPRF	P0RS25360 <sub>R.o.</sub>
P0RS25360PD630pEPRR	
P0RS39075PD630pEPRF	P0RS39075 <sub>R.o.</sub>
P0RS39075PD630pEPRR	

#### 5.2.5.4 Měření aktivity ECF-dependentních promotorů z *R. opacus* v *C. glutamicum*

Dvouplazmidové kmeny *C. glutamicum* obsahující plazmid pEC-XT99A s vloženými geny *sigA<sub>R.o.</sub>*, *sigB<sub>R.o.</sub>*, *sigD<sub>R.o.</sub>*, *sigE<sub>R.o.</sub>*, *sigH<sub>R.o.</sub>* v kombinaci se všemi testovanými promotory klonovanými v pEPR1 byly vytvořeny obdobným způsobem jako v předchozích kapitolách. I samotný způsob měření byl stejný jako v případě měření aktivity promotorů *R. erythropolis* *in vivo*. Kmeny obsahující prázdný vektor pEC-XT99A byly použity jako negativní kontrola.

Prvním studovaným promotorem byl potenciální  $\sigma^D$ -dependentní promotor P1RS13650<sub>R.o.</sub> (Obr. 29A). Dle očekávání nejvyšší nárůst aktivity promotoru byl zjištěn v buňkách nadprodukcujících  $\sigma^D_{R.o.}$ . V těchto buňkách aktivita stoupala v čase a ve 24. hodině dosáhla svého maxima (IP = 25). V ostatních kmenech byly aktivity promotoru srovnatelné s negativní kontrolou. Prokázalo se, že P1RS13650<sub>R.o.</sub> je velmi silný a specifický  $\sigma^D_{R.o.}$ -dependentní promotor *R. opacus* PD630.

Silná  $\sigma^D_{R.o.}$ -dependence byla prokázána i u zbývajících dvou promotorů P1RS19340<sub>R.o.</sub> a P0RS25360<sub>R.o.</sub> (Obr. 29B, C), které rovněž nesly konsenzuální sekvence obvyklé pro  $\sigma^D$ -dependentní promotory *C. glutamicum* či *R. erythropolis*. Přesto se však mezi sebou lišily v trendu aktivit promotorů po indukci. Zatímco promotor P1RS19340<sub>R.o.</sub> v podstatě kopíroval průběh nárůstu aktivity pozorovaný u promotoru P1RS13650<sub>R.o.</sub>, tj. hodnoty u systému nadprodukcujícího  $\sigma^D_{R.o.}$  stoupaly v čase, promotor P0RS25360<sub>R.o.</sub> se choval zcela opačně, tj. hodnoty specifické intenzity fluorescence u systému nadprodukcujícího  $\sigma^D_{R.o.}$  v čase klesaly a maxima bylo dosaženo již ve 3. hodině od indukce (IP = 28).



**Obrázek 29.** Aktivita  $\sigma^D$ -dependentních promotorů *R. opacus* PD630 *in vivo*. N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.

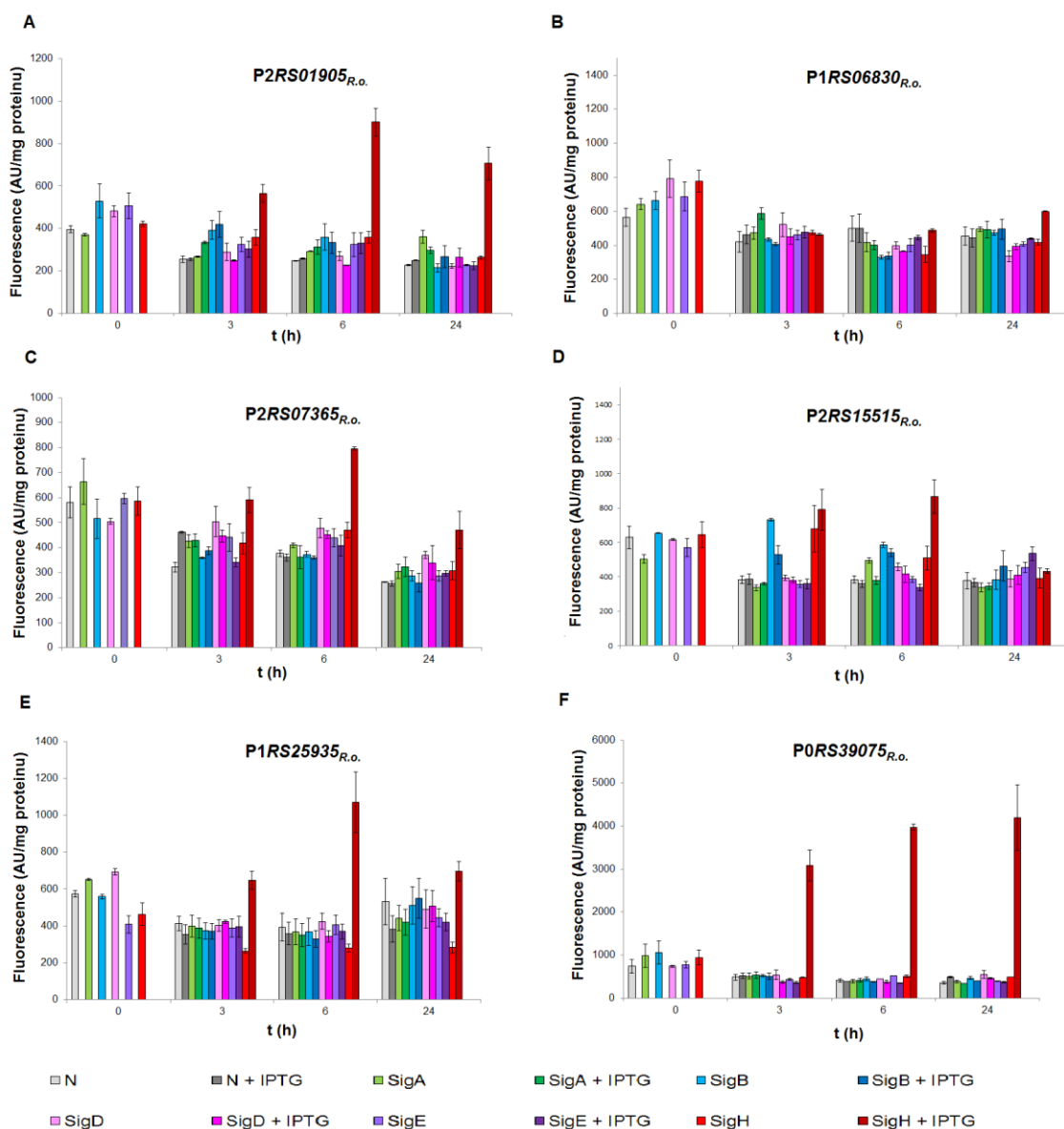
Potenciální  $\sigma^E_{R.o.}/\sigma^H_{R.o.}$ -dependentní promotor P1RS06830<sub>R.o.</sub>, u něhož byla změřena aktivita ve dvouplazmidovém systému *in vivo* (Obr. 30B), neprokázal uspokojivé výsledky. Po přidání induktoru došlo jen ke slabému nárůstu aktivity promotoru v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^H_{R.o.}$  (IP = 1,2). Je však nutné podotknout, že aktivita promotoru takřka nepřekročila hodnoty srovnatelné s negativní kontrolou, takže přiřazení klonované promotorové oblasti k jakémukoliv z testovaných  $\sigma$  faktorů *R. opacus* je sporné.

V případě promotoru P2RS07365<sub>R.o.</sub> (Obr. 30C) došlo k výraznějšímu nárůstu aktivity promotoru v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^H_{R.o.}$  v 6. hodině (IP = 1,7). Jelikož aktivita promotoru v ostatních kmenech odpovídala aktivitě negativní kontroly, lze konstatovat, že tento promotor patří mezi  $\sigma^H_{R.o.}$ -dependentní.

Za silné  $\sigma^H_{R.o.}$ -dependentní promotory lze považovat 3 promotory a to: P2RS01905<sub>R.o.</sub>, P1RS25935<sub>R.o.</sub> a P0RS39075<sub>R.o.</sub> (Obr. 30 A,E,F). Během měření těchto promotorů totiž došlo k obrovskému nárůstu aktivity v buňkách nadprodukcujících faktor  $\sigma^H_{R.o.}$ , zatímco ostatní dvouplazmidové systémy vykazovaly jen aktivitu srovnatelnou s negativní kontrolou. Ve 24. hodině dokonce dosáhla aktivita promotoru P0RS39075<sub>R.o.</sub> (Obr. 30F) v kmenech nadprodukcujících  $\sigma^H_{R.o.}$  IP = 8,6.

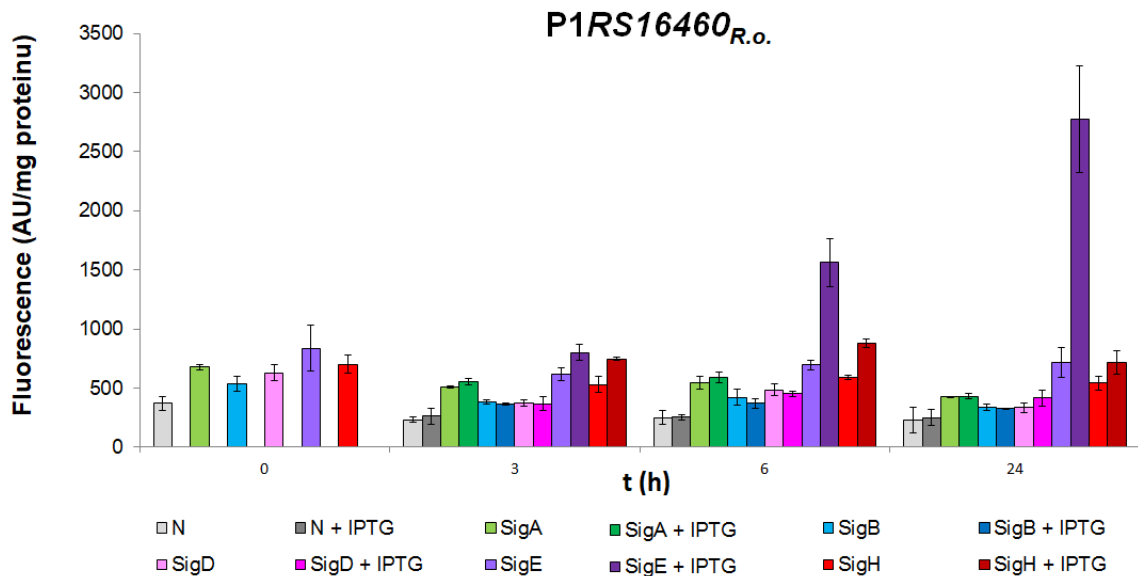
Z měření aktivity promotoru P2RS15515<sub>R.o.</sub> *in vivo* (Obr. 30D) vyplynulo, že tento promotor sice vykazuje jistou míru  $\sigma^H_{R.o.}$ -dependence, avšak s horší průkazností, neboť tato  $\sigma^H_{R.o.}$ -dependence se zřetelně projevila pouze v 6. hodině po indukci (IP = 1,7). Ostatní kmene s tímto promotorem opět projevily pouze aktivitu srovnatelnou s hodnotami negativní kontroly.





**Obrázek 30. Aktivita  $\sigma^H$ -dependentních promotorů *R. opacus* PD630 *in vivo*.** N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.

Jako jediný převážně  $\sigma^E_{R.o.}$ -dependentní promotor se ukázal P1RS16460<sub>R.o.</sub>, tedy promotor *sigB* genu *R. opacus* (Obr. 31), jehož aktivita za nadprodukce  $\sigma^E_{R.o.}$  vykazovala značně stoupající trend, který dosáhl svého vrcholu ve 24. hodině po indukci (IP = 3,9). Zároveň však bylo zjištěno, že slabý nárůst aktivity promotoru nastal i v systému nadprodukujícím faktor  $\sigma^H_{R.o.}$  (IP = 1,5), což dokazuje, že promotor P1RS16460<sub>R.o.</sub> není striktně  $\sigma^E_{R.o.}$ -dependentní. Z této analýzy vyplývá, že i u *R. opacus* dochází k překryvu rekogniční specifity faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  jako u *R. erythropolis* a *C. glutamicum*.



**Obrázek 31. Aktivita promotoru P1RS16460<sub>R.o.</sub> v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory  $\sigma^A_{R.o.}$ ,  $\sigma^B_{R.o.}$ ,  $\sigma^D_{R.o.}$ ,  $\sigma^E_{R.o.}$  a  $\sigma^H_{R.o.}$ .** N (šedá) je kontrola (prázdný expresní vektor pEC-XT99A). Světlé odstíny platí vždy pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků a směrodatná odchylka je v grafu znázorněna chybovou úsečkou.

Výše uvedené výsledky měření aktivity stresových promotorů *R. opacus* PD630 ve dvouplazmidových systémech potvrdilo nejen uplatnění 3 základních ECF  $\sigma$  faktorů, tj.  $\sigma^D_{R.o.}$ ,  $\sigma^E_{R.o.}$  a  $\sigma^H_{R.o.}$ , v odpovědi na stres vyvolaný telluričitanem draselným, ale i skutečnost, že sekvence oblastí -35 a -10 promotorů rozpoznávaných  $\sigma^D_{R.o.}$ ,  $\sigma^E_{R.o.}$  a  $\sigma^H_{R.o.}$  jsou v podstatě totožné s odpovídajícími konsenzuálními sekvencemi oblastí -35 a -10 promotorů určenými u *C. glutamicum* a *R. erythropolis*.

## 6 Diskuze

Iniciace transkripce je jednou z klíčových úrovní exprese genů a její komplikovaná regulace je proto ovládána řadou buněčných mechanismů. Integrací těchto mechanismů je zajištěno, že úroveň exprese všech genů a funkce metabolismu jsou v každé situaci a okamžiku (vnějších a vnitřních podmínkách, kvalitě a stavu živin) optimálně nastaveny. Mezi regulátory transkripce patří hlavně represorové či aktivátorové proteiny, dvousložkové systémy, malé nekódující RNA a dále  $\sigma$  podjednotky RNAP. Sigma faktory RNAP jsou nezbytnou součástí transkripčního aparátu a vyskytují se u všech bakterií (Paget, 2015) a také v chloroplastech rostlin (Troxler *et al.*, 1994) jako pozůstatek endosymbiotického procesu. Jsou rozděleny do dvou rodin, a to do méně časté  $\sigma^{54}$  a běžnější  $\sigma^{70}$ , která se vyskytuje u všech bakterií a je lépe prozkoumaná.

Rodina  $\sigma^{70}$  se dělí na základě struktury a funkce na 4 skupiny. Faktorům skupiny 4 se také říká faktory s extracytoplazmatickou funkcí (ECF). Jsou strukturně nejjednodušší a uplatňují se zejména během reakcí na stresové podněty. Název ECF je odvozený od funkce faktoru  $\sigma^E$  *E. coli*, který se uplatňuje při reakci na teplotní šok v periplazmatickém prostoru (Hiratsu *et al.*, 1995).

Struktura ECF faktorů je tvořena pouze dvěma doménami:  $\sigma_4$ , která interaguje s oblastí -35 promotoru (svým regionem  $\sigma R4.2$ ), a  $\sigma_2$  interagující s oblastí -10 promotoru (regionem  $\sigma R2.4$ ). Znalost sekvence motivů -35 a -10 na netemplátovém vlákně DNA je klíčová, neboť nám umožňuje zařazení promotoru do příslušné třídy a genu do  $\sigma$  regulonu. Zajímavostí je, že promotory rozeznávané mnohými ECF  $\sigma$  faktory různých bakterií sdílejí sekvenční podobnosti, a to především přítomnost G v pozici -35 a A v pozici -33. To naznačuje i částečnou evoluční konzervovanost jak klíčových elementů promotoru, tak domény  $\sigma_4$ , která je právě zodpovědná za interakci s oblastí -35 promotorů (Tab. 29).

**Tabulka 29.** Příklady ECF  $\sigma$  faktorů a jimi rozeznávané konsenzuální sekvence oblastí -35 a -10 promotorů bakterií.

Organismus	$\sigma$ faktor	-35 <sup>a</sup>	-10	Funkce	Publikace
<i>E. coli</i>	$\sigma^E$	GAACTT	TCTRA	Odpověď na teplotní šok	Hiratsu <i>et al.</i> , 1995
<i>C. crescentus</i>	$\sigma^T$	GGAAC	CGTTG	Odpověď na osmotický stres	Alvarez-Martinez <i>et al.</i> , 2007
<i>B. subtilis</i>	$\sigma^V$	GAAACY	CGTC	Rezistence k lysozymu	Guariglia-Oropeza a Helmann, 2011
<i>S. coelicolor</i>	$\sigma^R$	GGAAY	GTT	Odpověď na oxidativní stres	Paget <i>et al.</i> , 1998
<i>M. tuberculosis</i>	$\sigma^H$	GGAAY	GTT	Odpověď na teplotní šok	Sharp <i>et al.</i> , 2016
<i>C. glutamicum</i>	$\sigma^D$	GTAAC	GAT	Integrita buněčné stěny	Dostálová <i>et al.</i> , 2019

<sup>a</sup> Nukleotidy vyskytující se ve všech motivech jsou vyznačeny žlutě.

Skupina genů, která je regulována konkrétním  $\sigma$  faktorem se označuje jako  $\sigma$  regulon (někdy taky sigmulon)(Cho *et al.*, 2014). Zajímavostí je, že regulony ECF  $\sigma$  faktorů se mohou překrývat, tedy že geny regulonu jsou pod kontrolou dvou nebo více  $\sigma$  faktorů. Tato situace je známá u *C. crescentus* (Alvarez-Martinez *et al.*, 2007), *B. subtilis* (Luo a Helmann, 2009), *L. monocytogenes* (Chaturongakul *et al.*, 2011), *M. tuberculosis* (Dainese *et al.*, 2006; Manganelli *et al.*, 2002, 2001) i *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023; Šilar *et al.*, 2016). Vzhledem k příbuznosti rodů *Corynebacterium*, *Mycobacterium* a *Rhodococcus* jsme očekávali, že regulony ECF faktorů *R. erythropolis* či *R. opacus* ponесou řadu podobností s regulony u *C. glutamicum*. Stejně tak jsme předpokládali i přítomnost jejich překryvů.

## 6.1 Překryvy stresových $\sigma$ regulonů u *C. glutamicum*

### 6.1.1 Překryvy rekogniční specifity faktorů $\sigma^D$ a $\sigma^H$

Faktor  $\sigma^D$  hraje velmi důležitou úlohu ve stresové odpovědi. O jeho významu vypovídá i to, že sekvence jeho domény  $\sigma_4$ , která je klíčová pro rozpoznání oblasti -35 promotoru, je konzervována u *C. glutamicum*, *R. erythropolis* i *R. opacus* (Obr. 35). Navíc se v této práci experimentálně potvrdilo, že sekvence  $\sigma^D$ -dependentního promotoru definovaná oblastmi -35 (GTAAC) a -10 (GAT) je shodná pro všechny 3 zmiňované mikroorganismy. Společnou vlastností promotorů genů spadajících do  $\sigma^D$  regulonů je vysoká specifita a síla promotoru, což se projevuje vysokými hodnotami fluorescence po indukci exprese genu *sigD* při měření aktivity promotoru *in vivo* ve dvouplazmidových systémech *C. glutamicum* (Obr. 9C).

Nález dvou přirozených hybridních promotorů u *C. glutamicum* byl proto trochu překvapením. Prvním je *Pcg0607*, jehož -35 oblast (GGAA) je typická pro  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -dependentní promotory a -10 oblast (GAT) je typická pro  $\sigma^D$ -dependentní promotory. Druhým přirozeně hybridním promotorem je *Pcg0441* (*PlpD*), jehož -35 CTAAC (až na první C) odpovídá  $\sigma^D$ -dependentním promotorům a -10 GTT  $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentním promotorům, které jen podle sekvence nelze přiřadit k  $\sigma$  faktoru (Dostálová *et al.*, 2019). V případě promotoru *Pcg0607* dřívější experimenty sledování aktivity promotoru *in vitro* i *in vivo* v naší laboratoři ukázaly, že je rozpoznáván jak faktorem  $\sigma^D$ , tak slaběji i faktorem  $\sigma^H$  (Dostálová *et al.*, 2019). Aktivita promotoru *Pcg0607 in vivo* s faktorem  $\sigma^D$  byla přibližně 11x vyšší než jeho aktivita se  $\sigma^H$ . Ke studiu interakce mezi  $\sigma$  faktorem a DNA promotorem byly na základě homologního modelování vytvořeny dvě mutantní varianty faktoru  $\sigma^H$ : 1)  $\sigma^H$ Lys-53-Ala se záměnou v doméně  $\sigma_2$  ( $K^{53} \rightarrow A^{53}$ ), která měla vést k lepšímu rozpoznání elementu -10

promotoru *Pcg0607* jinak rozpoznávaného doménou  $\sigma_2$  faktoru  $\sigma^D$ , a 2)  $\sigma^H$ \_4AA s mutací v doméně  $\sigma_4$  ( $T^{168}M^{170}S^{171}R^{172} \rightarrow A^{168}R^{170}V^{171}A^{172}$ ), která měla naopak oslabit interakci mezi doménou  $\sigma_4$  a elementem -35 promotoru *Pcg0607*. Očekávaný efekt obou mutantních variant se projevil při měření aktivity promotoru *in vivo*. Interpretaci výsledků doplnilo využití simulace molekulární dynamiky mezi DNA a aminokyselinami. Zlepšenou interakci mezi  $\sigma^H$  a motivem -10 *Pcg0607* (GAT) způsobenou mutací  $K^{53} \rightarrow A^{53}$  lze vysvětlit specifickou interakcí alaninu  $A^{53}$ , který se jinak nachází v doméně  $\sigma_2$  faktoru  $\sigma^D$ , s nukleotidem A v druhé pozici motivu -10. Mutantní varianta  $\sigma^H$ Lys-53-Ala tedy fungovala jako hybridní  $\sigma$  faktor, ve kterém nezměněná doména  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  interagovala s motivem -35 GGAA, který odpovídá sekvencím  $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentních promotorů, a pozměněná doména  $\sigma_2$  imitující doménu  $\sigma_2$  faktoru  $\sigma^D$  interagovala s motivem -10 GAT, který odpovídá sekvencím  $\sigma^D$ -dependentních promotorů. Druhá mutantní varianta,  $\sigma^H$ \_4AA, naopak způsobila ztrátu schopnosti faktoru  $\sigma^H$  interagovat s oblastí -35 promotoru *Pcg0607*, neboť zásluhou aminokyselinové sekvence v doméně  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^H$  ( $T^{168}M^{170}S^{171}R^{172} \rightarrow A^{168}R^{170}V^{171}A^{172}$ ) došlo ke ztrátě stabilizační interakce mezi cukr-fosfátovou kostrou DNA a pozitivně nabitým postranním řetězcem  $R^{172}$ , který byl nahrazen  $A^{172}$  (Dostálová *et al.*, 2019). Na tyto výsledky, ve kterých sehrála důležitou roli kombinace metod RNA sekvenování, mapování 5' konců transkriptů, *in vitro/in vivo* sledování aktivity promotorů a *in silico* homologní modelování se simulací molekulární dynamiky, navazovaly výsledky mé diplomové práce (Blumenstein, 2019) a tato disertační práce.

Kromě přirozeného hybridního promotoru *Pcg0441* a mutantní varianty  $\sigma^H$ \_4AA jsme využili umělý hybridní promotor *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* a složitější mutantní varianty faktoru  $\sigma^H$ , tedy  $\sigma^H$ \_4AA + K,  $\sigma^H$ \_6AA a  $\sigma^H$ \_6AA + K (Obr. 8), které byly opět vytvořeny na základě *in silico* homologního modelování. Zajímavý výsledek poskytlo měření aktivity hybridních promotorů *Pcg0441* a *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* v přítomnosti  $\sigma^D$ ,  $\sigma^H$  a jeho čtyř zmiňovaných mutantních variant (Obr. 9A a 9D). Ačkoliv tyto dva promotory (Tab. 14) sdílí téměř stejné sekvence -35 a -10 (rozdíl jen v  $C_{-35} \rightarrow G_{-35}$ ), nejedná se o zcela sekvencně identické promotory. *Pcg0441* je přirozený hybridní promotor, který však obsahuje sekvenci oblasti -10 podobnou  $\sigma^H$ -dependentním promotorům. *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* je však umělý hybridní promotor, přičemž první polovina obsahující motiv GTAAC typický pro oblasti -35  $\sigma^D$ -dependentních promotorů je tvořena sekvencí  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *PrsdA*, zatímco jeho druhá polovina obsahující motiv GTT typický pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory je tvořena sekvencí  $\sigma^H$ -dependentního promotoru *PuvrD3* (Tab. 14). S výjimkou sekvencních motivů -35 a -10 promotorové oblasti se tedy jedná o sekvencně zcela odlišné promotory, což vedlo k odlišným výsledkům měření aktivity promotorů (Obr. 9A a 9D). Roli zde může hrát sekvence mezerníku. Promotor *Pcg0441* má mezi motivy -35 a -10 sekvenci TTTT, která by mohla umožnit výrazné ohnutí duplexu mezerníku vzhledem k slabým vazbám A-T.

Gaballa a spol. klasifikovali homopolymerní sekvence T v blízkosti oblasti -35 u promotorů *B. subtilis* jako další promotorový element, který se podílí na rozeznávání promotorů ECF faktory (Gaballa *et al.*, 2018). Díky přítomnosti homopolymerní sekvence čtyř T v oblasti mezerníku pravděpodobně došlo k výraznému nárůstu aktivity promotoru *Pcg0441* v přítomnosti faktoru  $\sigma^D$  (Obr. 9A), zatímco u syntetického hybridního promotoru *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* nebyl nárůst aktivity se  $\sigma^D$  vůbec zaznamenán (Obr. 9D). Dalším významným prvkem mohl být rozdíl v samotné sekvenci oblasti -35 promotorů. Ty jsou téměř identické, avšak promotor *Pcg0441* obsahuje v pozici -35 netemplátového vlákna C namísto G (Obr. 14), který je striktně konzervován v ostatních  $\sigma^D$ -dependentních promotorech. S přihlédnutím k výsledkům simulace molekulární dynamiky lze předpokládat, že TTTT v sekvenci mezerníku a C<sub>-35</sub> způsobily schopnost interakce přirozeného faktoru  $\sigma^D$  s oblastí -10 promotoru *Pcg0441*, která je tvořena sekvencí GTT konsenzuální pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory. Tyto výsledky jsou v kontextu fungování ostatních známých  $\sigma^D$ -dependentních promotorů (Dostálová *et al.*, 2019) pozoruhodné. K výjimečně silné interakci mezi přirozeným faktorem  $\sigma^D$  a promotorem *Pcg0441* tedy dochází pravděpodobně z důvodu záměny jednoho nt v každém z klíčových motivů, které jsou jinak silně konzervovány, a zvláštní sekvence mezerníku. Dalším pozoruhodným jevem byla téměř nedetekovatelná aktivita tohoto promotoru v přítomnosti mutantních variant  $\sigma^H$ \_4AA a  $\sigma^H$ \_6AA (Obr. 9A), tedy těch, které nemají záměnu E<sup>140</sup> na K<sup>140</sup> v doméně  $\sigma_4$  (Obr. 8). U syntetického promotoru *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* byla zaznamenána vysoká aktivita v přítomnosti všech čtyř mutantních variant faktoru  $\sigma^H$  ( $\sigma^H$ \_4AA,  $\sigma^H$ \_4AA + K,  $\sigma^H$ \_6AA a  $\sigma^H$ \_6AA + K). Velmi nízký nárůst aktivity promotoru byl naměřen s faktorem  $\sigma^H$  a žádný nárůst nebyl pozorován se  $\sigma^D$  (Obr. 9D). Sekvence oblastí -35 a -10 promotorů *Pcg0441* a *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* jsou takřka totožné a na efektivitě transkripce se tedy zřejmě podílejí i ostatní sekvenční prvky těchto ECF-dependentních promotorů. Tyto vedlejší sekvence jsou daleko méně popsány než přídatné prvky u vegetativních promotorů bakterií, např. UP element (Ross *et al.*, 1993), rozšiřující TGn motiv (Barne *et al.*, 1997) či motiv diskriminátoru (Haugen *et al.*, 2006).

Striktní  $\sigma^D$ -dependentní promotor *PrsdA* (Obr. 9C) a  $\sigma^H$ -dependentní promotor *PuvrD3* (Obr. 9B) *C. glutamicum* posloužily jako kontroly, neboť každý z nich je rozeznáván pouze jedním  $\sigma$  faktorem, do jehož regulonu jejich geny spadají. To byl i důvod, proč byly využity k tvorbě hybridního promotoru *PD<sub>35</sub>H<sub>10</sub>* za účelem vytvoření expresního systému, ve kterém hybridní  $\sigma$  faktor rozpoznává specificky pouze odpovídající hybridní promotor a zároveň hybridní promotor není rozpoznáván jiným než hybridním  $\sigma$  faktorem (Blumenstein, 2019).

Ačkoliv přirozený hybridní promotor *Pcg0441* nese typickou sekvenci pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory v oblasti -10 (GTT), nebyl během *in vivo* analýzy v této práci zaznamenán takřka žádný nárůst aktivity v přítomnosti  $\sigma^H$  (Obr. 9A). Oproti tomu dříve

analyzované  $\sigma^D$ -dependentní promotory *PlppS*, *PfaD2* (Tab. 30), které naopak neměly v žádné z oblastí -35 či -10 sekvenční motiv typický pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory, vykazovaly aktivitu i v přítomnosti faktoru  $\sigma^H$  (Dostálová *et al.*, 2019). Komplikovanost fenoménu překryvu regulonů  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  nám ukazuje, jak důležité je kombinovat metody analýzy transkriptomu (RNA sekvenování), *in vivo/in vitro* analýzu promotorů, cílenou mutagenézi a *in silico* metody. Pro pochopení interakce mezi DNA a  $\sigma$  podjednotkou RNAP se nestačí spoléhat na opakující se motivy, neboť se v případě obou molekul jedná o dynamické struktury, kde každá aminokyselina/nukleotid přispívá za různých podmínek menším či větším dílem k iniciaci transkripce, a tedy i k charakteru exprese genu studovaného promotoru.

**Tabulka 30.**  $\sigma^D/\sigma^H$  promiskuitní promotory *C. glutamicum*.

Promotor	Sekvence promotoru <sup>1</sup>	$\sigma$ faktor
<i>Pcg0607</i> (Dostálová <i>et al.</i> , 2019)	TTGCGCGTTAATAA <b>GGAA</b> CAATATCGGTGTGATTTCGC <b>GAT</b> ATATTAATCA	$\sigma^D/\sigma^H$
<i>Pcg0441</i>	ATTTTCGGCAGAGTG <b>CTAAC</b> GGTTAGGCACTATTTTCC <b>CTT</b> AGTTCCTTTTG	$\sigma^D$
<i>PlppS</i> (Dostálová <i>et al.</i> , 2019)	AGGCATTCTGGAC <b>GTAAC</b> GCTCCGG-CATCTACAAGG <b>GAT</b> GATCAAAATA	$\sigma^D/\sigma^H$
<i>PfadH2</i> (Dostálová <i>et al.</i> , 2019)	GTTAGTTTGCAAAA <b>GTAAT</b> AAAATGT-TCATCTTTGTC <b>GAT</b> GGTCACAATA	$\sigma^D/\sigma^H$

<sup>1</sup>Zeleně jsou vyznačeny oblasti typické pro  $\sigma^D$ -dependentní promotory a červeně oblasti typické pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory. Podtržené jsou klíčové oblasti promotoru -35, -10 a TSS.

### 6.1.2 Překryvy regulonů faktorů $\sigma^M$ , $\sigma^E$ , $\sigma^H$ u *C. glutamicum*

Nejméně prozkoumaným  $\sigma$  faktorem *C. glutamicum* je ECF faktor  $\sigma^M$ . Dosud byla publikována jen jedna studie, která se zabývala regulonem tohoto faktoru (Nakunst *et al.*, 2007). V této publikaci byla také stanovena konsenzuální sekvence pro oblasti -35 (gGGAAT) a -10 (YGTTGR)  $\sigma^M$ -dependentních promotorů, která se velmi podobá konsenzuálním sekvencím  $\sigma^E$ -/ $\sigma^H$ -dependentních promotorů *C. glutamicum*. Tři ze 4 předpokládaných  $\sigma^M$ -dependentních promotorů byly později popsány jako  $\sigma^H$ -dependentní (Ehira *et al.* 2009). V naší laboratoři se všechny 4 předpokládané  $\sigma^M$ -dependentní geny (*PtrxB*, *PtrxC*, *PtrxB1* a *PsufR*) ukázaly výhradně jako  $\sigma^H$ -dependentní (Dostálová *et al.*, 2017). Žádnou naší metodou se nám nepodařilo ani jediný opravdu  $\sigma^M$ -dependentní promotor nalézt.

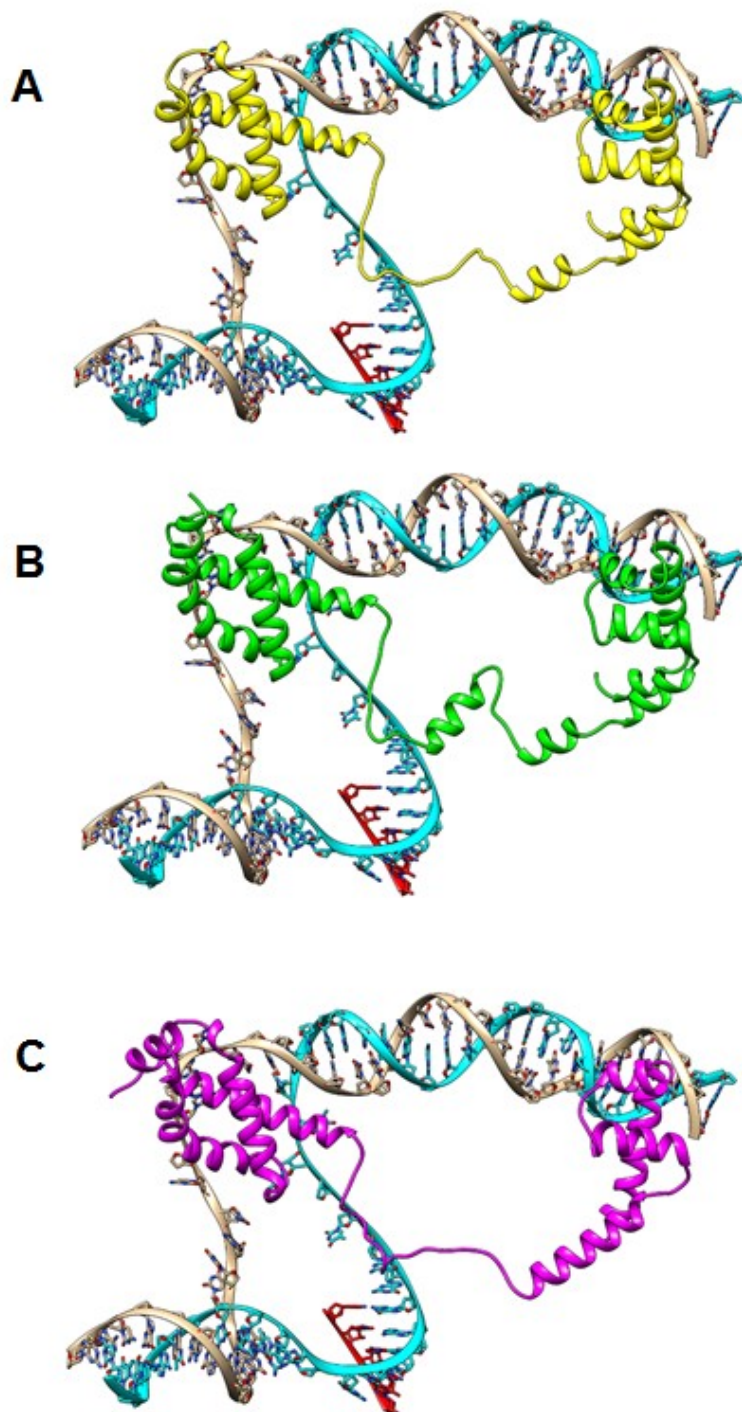
Naši kolegové z Univerzity v Bielefeldu za naší spolupráce vyvinuli pro *C. glutamicum* metodu označenou jako ROSE (*In Vitro* Run-Off Transcription/RNA-seq). Podstatou této techniky je sekvenování specifického transkriptomu vytvořeného při *in vitro* reakci, jíž se účastní jádro RNAP a jeden ze  $\sigma$  faktorů z *C. glutamicum* a celý genom *C. glutamicum* jako templát. Metoda byla zatím publikována pouze při příležitosti konstrukce regulační sítě *E. coli* (Schmidt *et al.*, 2023). Pro *C. glutamicum* byla testována metoda s použitím proteinů  $\sigma^M$  a  $\sigma^E$ , které jsme pro *in vitro* transkripci izolovali.

Metodou ROSE se  $\sigma^M$  byly nalezeny 3 TSS a příslušné promotory, které měly být  $\sigma^M$ -dependentní. To se skutečně našimi metodami ověřilo. Navíc se ukázalo, že jsou i  $\sigma^E$ -dependentní, což naznačovala i metoda ROSE (Dostálová, 2020). Celkově bylo nakonec nalezeno 5  $\sigma^M$ -dependentních promotorů s neobvykle dlouhými konsenzuálními sekvencemi -35 **GGGAACC** a -10 **GTC**<sub>-10</sub>AAA. Jádra těchto sekvencí se lišila jen jedním nt (**C**<sub>-10</sub>, tučně, podtrženo) od konsenzuálních sekvencí  $\sigma^H$ - a  $\sigma^E$ -dependentních promotorů: -35 GGAAC a -10 **GTI**<sub>-10</sub>.

V této práci jsem pro podrobnější analýzu zvolil promotor *Pcg0668*, tedy promotor genu pro segregaci ATPázu z FtsK/SpoIIIE rodiny (Tab. 16). Nejprve jsme provedli měření aktivity promotoru s nezměněnou sekvencí -35 GGGAACC a -10 GTC (Obr. 15). Zajímavý trend, který se projevil při měření aktivity promotoru *in vivo*, byla změna rekogniční specifity faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  v průběhu kultivace. V exponenciální fázi převládalo rozpoznávání promotoru faktorem  $\sigma^H$  a ve stacionární převládalo rozpoznávání faktorem  $\sigma^M$  (Obr. 15). Zajímá nás vztah mezi faktory  $\sigma^M$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  z hlediska rozpoznávání promotoru a možné změny rekogniční specifity záměnou pouhého jednoho nukleotidu. K této analýze jsme vytvořili mutantní varianty promotoru, kde byly provedeny jednonukleotidové záměny v **GTC**<sub>-10</sub> a **GGGAAC**<sub>-31</sub> (Tab. 16). K podrobnějšímu vysvětlení interakcí, které se projevily při měřeních aktivit mutantních variant *in vivo*, nám pomohlo homologní modelování a simulace molekulární dynamiky (Dr. Ivan Barvík). Jako vzor pro homologní modelování byla cryoEM struktura s kódem 6JBQ (Fang *et al.*, 2019), která zachycuje komplex *E. coli* RNAP (včetně podjednotky  $\sigma^E$ ), a krystalová struktura faktoru  $\sigma^H$  *M. tuberculosis* (6JCX).

Představu o tom, jak se váže  $\sigma^M$  z *C. glutamicum* k promotoru *Pcg0668* (Obr. 32C), si můžeme udělat na základě cryoEM struktury s kódem 6JBQ (Fang *et al.*, 2019), která zachycuje komplex *E. coli* RNAP (včetně podjednotky  $\sigma^E$ ) s kompletní transkripční bublinou (sestavující jak z templátového tak i netemplátového vlákna DNA od pozice -34 po pozici +14) a krátkého fragmentu RNA o délce 5 nt. Podstatné je, že ve struktuře 6JBQ jsou sekvence DNA v oblastech -10 a -35 promotoru úplně stejné jako ty, které nalézáme u  $\sigma^M$ -dependentního promotoru *C. glutamicum* *Pcg0668* (tj. -35 **GGAAC** a -10 **GTC**AAA). Porovnání sekvencí  $\sigma^M$  *C. glutamicum* a  $\sigma^E$  *E. coli* (Obr. 33) pak dokládá, že i klíčové aminokyseliny rozpoznávající tyto oblasti jsou stejné nebo velmi podobné (oblast -10:  $\sigma^E$  **FRGDSAFYTW** [*E. coli*] vs.  $\sigma^M$  **YRAEALGTW** [*C. glutamicum*] a oblast -35:  $\sigma^E$  **GTVRSRIFRAR** [*E. coli*] vs.  $\sigma^M$  **GTVKSRRGRAR** [*C. glutamicum*]). Je zde tedy zřejmá evoluční konzervovanost a je pravděpodobné, že jakákoliv provedená mutace v oblasti -10 či -35 elementu transkripci stimulovanou prostřednictvím  $\sigma^M$  vypíná (Obr. 16 a 17).





Obrázek 32. Homologní modely  $\sigma$  podjednotek A)  $\sigma^E$  *C. glutamicum*, B)  $\sigma^H$  *C. glutamicum*, C)  $\sigma^M$  *C. glutamicum* rozpoznávajících oblasti -10 a -35 promotorů zobrazené v komplexu s transkripční bublinou: templátová DNA (bleděmodrá), netemplátová DNA (bronzová), RNA (červená),  $\sigma^E$  (žlutá),  $\sigma^H$  (zelená),  $\sigma^M$  (fialová).

Ec	E	6JBQ_5 Chain	-----MSSY---YHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMAMSEQLTDQVLVERVQKGDQKA	49
Cg	E	CAD32043.1	MTYMKKKSRRDDAPVVIETVQAEHAELTGTAA----FDAG-----QADMP	42
Cg	M	CAD32030.1	-----MENLPIILSRIRDTCVPPAGDLMT---VLPKNHDLSDTQLVKQFISGDSRA	49
Cg	H	CAD32033.1	-----M-----AENRTGTVDG-----DALAAR	17
Mt	H	6JCX_5 Chain	-----GA-----MADIDGVTGSAG---LQPGPSEETD-----EELTAR	30
Ec	E	6JBQ_5 Chain	FNLLVVRYQHKNVASLVSRYVPSGDVPDVVQEAFFIKAYRALDSFRCDSAFYTWLYRIAVN	108
Cg	E	CAD32043.1	WGELVAEHADSVMYRLAYRLSGNQHDAEDLTQETFMRVFRSLKSYQGT-FEGWLHRITTN	101
Cg	M	CAD32030.1	FSTI IHRHERHMMQAARKYGRKPEDAQDILQEALFRASRNMHLYRFAALGTTWLHKLVLN	109
Cg	H	CAD32033.1	FEFEALPLLDQLYGGALRMTRNPAEDAEDLVQDTYIKAYQAFASFKPGTNLKAWLYRIMTN	77
Mt	H	6JCX_5 Chain	FERDAIPLLDQLYGGALRMTRNPAEDAEDLLQETMVKAYAGFRSFRHGTNLKAWLYRILTN	90
			: : . : * . * : * : . . : : : : * : : *	
Ec	E	6JBQ_5 Chain	TKNYLVAQGRPPSSDVAIEAENFESGGAL--KEISNPENLMLSEELRQIVFRTIESL	166
Cg	E	CAD32043.1	LFLDMVRHRGKIRMEALPE---DYERVPNGDI-----TPEQAYTEANLDPALQAALDEL	152
Cg	M	CAD32030.1	SFDWATHRSQVEFPILNEPTIDLEKDPRLATD-----PLGYLD--VAMTIRSAIDQL	160
Cg	H	CAD32033.1	TYINMYRKKQRQPSQTSADAITDYQLVESQSHTSTGLESAAVEALKNLPDGGKIGDAMNQL	137
Mt	H	6JCX_5 Chain	TYINSYRKKQRQPAEYPTETDQWQLASNAEHSSTGLRSAEVEALEALPDTEIKEALQAL	150
			: : : : : : : : : : : : : : : *	
Ec	E	6JBQ_5 Chain	PEDLRMAITLRELDGLSYEEIAAIMDCPVGTVRSRIFRAREAIDNKVQPLIRR-----	219
Cg	E	CAD32043.1	SPDFRVAVILCDVVGMSYDEIAETLGVKMGTVRSRIHRGRSQRASLEAAAMTSEEVSL	212
Cg	M	CAD32030.1	HPDQRIALILVDLGGYTVEDVAEIEGKIVGTVKSRGRARKALRALLHADFFGPEPDGSIQ	220
Cg	H	CAD32033.1	SPEYRMVVYADVEDLAYKEIAEIMDVLGTVMSRLHRGRKQLRGMLKEVAKEQ-GIGLE	196
Mt	H	6JCX_5 Chain	PEEFRMAVYADVEGFYKEIAEIMDTPIGTVMSRLHRGRRQLRGLLADVARDR-GFARG	209
			: * : : : : . . : : * . : * * * * * . * : : :	
Ec	E	6JBQ_5 Chain	-----	219
Cg	E	CAD32043.1	VPTH-----	216
Cg	M	CAD32030.1	CESN-----	224
Cg	H	CAD32033.1	HPDMKKNSEA	206
Mt	H	6JCX_5 Chain	EQAHEGVSS-	218

**Obrázek 33. Porovnání aminokyselinových sekvencí faktorů  $\sigma^E$  *E. coli* (Ec E 6JBQ\_5|Chain),  $\sigma^E$  *C. glutamicum* (Cg E CAD32043.1),  $\sigma^M$  *C. glutamicum* (Cg M CAD32030.1),  $\sigma^H$  *C. glutamicum* (Cg H CAD32033.1) a  $\sigma^H$  *M. tuberculosis* (Mt H 6JCX\_5|Chain). Zeleně jsou vyznačeny konzervované aminokyseliny typické pro  $\sigma^E$  *E. coli* a modře aminokyseliny typické pro  $\sigma^H$  *M. tuberculosis*. Vytvořeno internetovým softwarem CLUSTAL O (1.2.4).**

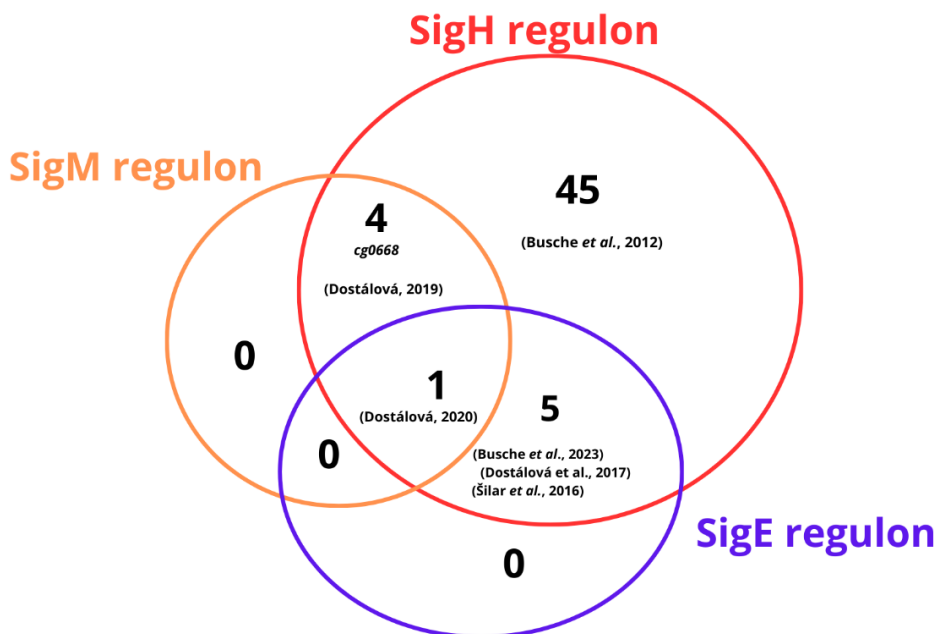
$\sigma^E$ -dependentní promotory *C. glutamicum* mají v oblasti -35 konsenzuální sekvenci **GGAAC** odpovídající sekvenci, kterou nacházíme u promotoru *Pcg0668*. Není proto překvapující, že transkripci z promotoru *Pcg0668* stimulovanou faktorem  $\sigma^E$  zapíná mutace v oblasti -10 **GTC** → **GTI** (Obr. 16C), díky které i zde vzniká sekvence odpovídající konsenzuální sekvenci  $\sigma^E$ -dependentních promotorů z *C. glutamicum*. Poněkud obtížněji vysvětlitelné je, proč  $\sigma^E$  do jisté míry funguje i s mutanty A<sub>-31</sub> a T<sub>-31</sub> promotoru *Pcg0668* (Obr. 17B a 17C), u kterých není přítomna konsenzuální sekvence v oblasti -10 ani -35. Přičítáme to specifické sekvenci promotoru *Pcg0668* v oblasti mezerníku a v oblasti tzv. diskriminátoru (tj. mezi oblastí -10 a TSS). Jde o to, že v obou případech je zde neobvykle vysoký počet A/T, které vytvářejí relativně slabé páry AT. Konkrétně v případě mezerníku 10 ze 17 nt a v případě diskriminátoru 7 z 10 nt je buď T nebo A. Tyto nukleotidy A/T v sekvenci *Pcg0668* vytvářejí souvislé shluky o délce 5-6 nt (Tab. 16). Předpokládáme, že v důsledku toho promotor *Pcg0668* vytváří transkripční bublinu s oddělenými vlákny DNA velmi snadno. Její tvorbu je tak zřejmě do jisté míry schopen stimulovat faktor  $\sigma^E$  i v situaci, kdy ani v jedné z oblastí -10/-35 není přítomná konsenzuální sekvence.

Promiskuita promotoru *Pcg0668* se zřejmě ještě výrazněji projevuje v případě podjednotky  $\sigma^H$ , která je schopná z něj zahájit transkripci i přesto, že ani v jedné z jeho oblastí -35 a -10 není úplně konsenzuální sekvence  $\sigma^H$ -dependentních promotorů GGAAT a GTT (Obr. 15). Rozpoznávání *Pcg0668* faktorem  $\sigma^H$  se navíc nepodařilo vypnout ani žádnou z provedených mutací *Pcg0668* (Obr. 16 a 17), a to ať už v oblasti -10, či -35 (Tab 16). Porovnání sekvencí (Obr. 33) a homologní modelování ukazují, že důvodem může být robustnost interakce  $\sigma^H$  a DNA v oblasti, která se nalézá nejbližší aktivnímu místu RNAP, a která interaguje se syntetizovaným vláknem RNA již od okamžiku, kdy dosáhne délky cca. 6-7 nukleotidů.  $\sigma^H$  *C. glutamicum* se v tomto ohledu podobá vzorové podjednotce  $\sigma^H$  *M. tuberculosis*, pro kterou je k dispozici krystalová struktura 6JCX. V daném místě lze proto předpokládat přítomnost krátkého  $\alpha$ -helixu a *stacking* aromatické aminokyseliny s bází nukleové kyseliny, tak jako to pozorujeme ve struktuře 6JCX, kde dochází ke *stackingu* mezi postranním řetězcem aminokyseliny  $W^{112}$  ze  $\sigma^H$  a bází nukleotidu  $G_{-21}$  z templátového vlákna DNA. Porovnání sekvencí a homologní model ukazují, že v případě  $\sigma^H$  *C. glutamicum* bude analogickou úlohu hrát postranní řetězec  $Y^{101}$ . Porovnání aminokyselinových sekvencí dále ukazuje, že v případě  $\sigma^E$  či  $\sigma^M$  *C. glutamicum* v tomto místě schází cca. 9 aminokyselin (Obr. 33), takže tyto podjednotky  $\sigma$  zřejmě nejsou schopné tak efektivně stabilizovat otevřenou transkripční bublinu, a to už vůbec ne prostřednictvím *stackingu* mezi postranním řetězcem aromatické aminokyseliny a bází templátového vlákna DNA.

Všechny dosavadní studie vztahů  $\sigma$  faktorů a promotorů a dále  $\sigma$  regulonů provedené v naší laboratoři ukazují (Obr. 34), že regulon faktoru  $\sigma^H$  *C. glutamicum* tvoří do jisté míry překryvy se všemi ECF regulony *C. glutamicum*, tedy se  $\sigma^C$  regulonem (nepublikované výsledky laboratoře),  $\sigma^D$  regulonem (Dostálová *et al.*, 2019),  $\sigma^E$  (Busche *et al.*, 2023; Dostálová *et al.*, 2017; Šilar *et al.*, 2016) a  $\sigma^M$ . Díky tomu, že faktor  $\sigma^H$  je schopen stimulovat transkripci i z promotorů, jejichž konsenzuální sekvence neodpovídá typické sekvenci  $\sigma^H$ -dependentních promotorů, můžeme potvrdit, že na jeho rekogniční specifitu mají vliv i jiné oblasti promotorů než -35 a -10. Výsledky analýzy jednoho z mála potvrzených  $\sigma^M$ -dependentních promotorů nás tak ještě více utvrzují o funkci  $\sigma^H$  jakožto důležitého globálního regulátoru stresové odpovědi (Schröder a Tauch, 2010).

Důvody, proč v předchozí práci zabývající se  $\sigma^M$  z *C. glutamicum* (Nakunst *et al.*, 2007) byly 4 geny označeny jako  $\sigma^M$ -dependentní, zatímco v práci japonských kolegů (Ehira *et al.*, 2009) i v naší byly shledány  $\sigma^H$ -dependentními, jsme nezjistili. Je možné, že rozdílné metody dávají poněkud odlišné výsledky. Z námi pozorovaných překryvů rekogničních specifit  $\sigma$  faktorů je zřejmé, že vysoká podobnost molekul  $\sigma$  faktorů způsobuje, že jejich afinity (a tedy specifity) se díky jemným rozdílům ve vazbách klíčových aminokyselin a nukleotidů za různého fyziologického stavu buňky (nebo různých podmínek experimentů)

mohou proměnit. V tom by mohla spočívat i strategie regulace exprese  $\sigma$  faktory, kterou evoluce nastavila.



**Obrázek 34.** Schématické znázornění překryvu  $\sigma^E$ -,  $\sigma^H$ - a  $\sigma^M$ -regulonů *C. glutamicum*. V každém kruhu je uveden počet genů spadajících do příslušného regulonu a práce, ve kterých byly tyto příslušnosti prokázány.

## 6.2 Stresové $\sigma$ regulony bakterií rodu

### *Rhodococcus*

Ačkoliv bakterie rodu *Rhodococcus* díky svému bioremediačnímu potenciálu a vysoké odolnosti k řadě stresů patří k biotechnologicky perspektivním mikroorganismům, jejich specifické mechanismy regulace genové exprese jsou velmi málo prozkoumané. U řady druhů jsou osekvenované genomy a na základě jejich sekvencí anotovány geny kódující velké množství předpokládaných transkripčních regulátorů. V této práci jsem věnoval pozornost především zvláštnímu typu regulátorů, a to ECF  $\sigma$  faktorům RNAP.

*R. erythropolis* je půdní bakterie jejíž velký genom (6,3 Mbp) nese 21 genů kódujících  $\sigma$  faktory. ECF faktory, které jsou společné pro *C. glutamicum* a *R. erythropolis* jsou  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ . Geny pro tyto faktory nese i další zástupce tohoto rodu, *R. opacus*. U žádného z nich však nebyla dosud zjištěna úloha ani jednoho ze  $\sigma$  faktorů či konsenzuální sekvence -35 a -10 příslušných, jimi řízených promotorů.

K hledání funkce jednotlivých  $\sigma$  faktorů a příslušnosti jednotlivých genů do  $\sigma$  regulonů *C. glutamicum* používáme v naší laboratoři *in vivo* a *in vitro* metody. *In vivo*

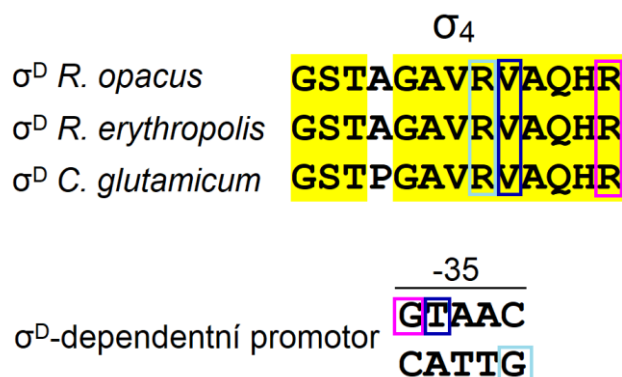
metodu představuje dvouplazmidový systém zahrnující expresní vektor produkující sledovaný  $\sigma$  faktor a promotor-test vektor s vloženým zkoumaným promotorem před reportérovým genem *gfpUV*, což nám umožňuje aktivitu měřit (Dostálová *et al.*, 2017). Tato metoda vychází z dvouplazmidových systémů určených pro klasifikaci promotorů a  $\sigma$  faktorů v *E. coli* (Rezuchova a Kormanec, 2001). Pro potvrzení interakce promotoru se  $\sigma$  faktorem využíváme transkripční reakce *in vitro*, kde systém obsahuje izolovanou RNAP,  $\sigma$  faktor a fragment nesoucí sledovaný promotor (Holátko *et al.*, 2012). Tyto spolehlivé metody *in vivo* a *in vitro* jsme se rozhodli aplikovat při tvorbě heterologního systému pro studium promotorů a  $\sigma$  faktorů *R. erythropolis*. Heterologní systém *in vivo* pro *R. erythropolis* se skládal z expresního vektoru obsahujícího *sig* gen z *R. erythropolis* a promotor-test vektoru nesoucího sledovaný promotor taktéž z *R. erythropolis*, přičemž se oba plazmidy replikují v buňce *C. glutamicum*. Sigma faktor *R. erythropolis* tak v buňce interaguje s hostitelskou RNAP. Hlavním důvodem využití heterologního, a nikoliv homologního dvouplazmidového systému *R. erythropolis*, byla obtížná transformace *R. erythropolis* a následná nestabilita dvou plazmidů v buňce *R. erythropolis*, a také obtížná kultivace *R. erythropolis* v tekutém médiu (pomalý růst a tvorba buněčných agregátů). Předešlá měření v homologním dvouplazmidovém systému *R. erythropolis* neposkytovala uspokojivé výsledky, a to ani u kmenů s delecí v genech pro faktory  $\sigma^B$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  (Křenková, 2023). Při využití heterologního systému pro detekci aktivity promotoru *in vitro* jsme předpokládali, že izolovaná RNAP *C. glutamicum* bude schopna spustit transkripci z promotoru *R. erythropolis* v komplexu se  $\sigma$  faktorem *R. erythropolis*. Podobně byly již dříve úspěšné kombinace RNAP z *B. subtilis* a  $\sigma$  faktor a promotor z *C. glutamicum* (Holátko *et al.*, 2012). Využití takových systémů se prokázalo také u RNAP z *E. coli* a promotorů z mykobakterií (Homerová *et al.*, 2004a) a ze *Staphylococcus aureus* (Homerová *et al.*, 2004b). Během *in vitro* analýzy promotorů a  $\sigma$  faktorů *R. erythropolis* se náš předpoklad potvrdil a reakce skutečně probíhala efektivně v přítomnosti RNAP *C. glutamicum* (Obr. 21).

### 6.2.1 Faktor $\sigma^D$ a jeho regulon u *R. erythropolis* a *R. opacus*

Je třeba zdůraznit, že označování  $\sigma$  faktorů různých bakterií jako  $\sigma^D$  může být zavádějící, neboť se jedná často o  $\sigma$  podjednotky RNA polymerázy velmi odlišné struktury i funkce. Příkladem je faktor  $\sigma^D$  modelové grampozitivní bakterie *B. subtilis*, u které tento faktor patří do skupiny 3, a podílí se na expresi genů důležitých pro syntézu bičíku (Márquez-Magaña a Chamberlin, 1994). Do skupiny 3 patří i faktor  $\sigma^D$  grampozitivní patogenní bakterie *Clostridium difficile*, do jehož regulonu spadají jak geny důležité pro buněčný pohyb, tak i geny kódující toxiny (El Meouche *et al.*, 2013). U gramnegativní bakterie *Mixococcus xanthus*, která je známá pro svou schopnost diferenciaci, patří  $\sigma^D$  do

skupiny 2 a uplatňuje se během stacionární fáze či odpovědi na osmotický nebo oxidativní stres (Ueki a Inouye, 1998). Při studiu  $\sigma^D$  *R. erythropolis* a *R. opacus* jsme proto vycházeli z poznatků o příbuzných bakteriích *M. tuberculosis* a *C. glutamicum*, jejichž faktory  $\sigma^D$  patří do skupiny 4 (ECF) a mají výraznou strukturní podobnost se  $\sigma^D$  rhodokoků (Pátek *et al.*, 2021).

Faktor  $\sigma^D$  představuje účinný nástroj regulace stresové odpovědi v *C. glutamicum*, protože reaguje na poškození buněčné stěny spouštěním exprese genů, jejichž produkty se podílí na syntéze a modifikacích mykologických kyselin (Toyoda a Inui, 2018). Výsledky sledování aktivity potenciálních  $\sigma^D$ -dependentních promotorů *in vivo* (Obr. 19, 20, 24B a 29) i *in vitro* (Obr. 21 a 25B) potvrdily, že konsenzuální sekvence pro oblasti -35 (GTAAC) a -10 (GAT)  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *C. glutamicum* (Dostálová *et al.*, 2019) platí i pro *R. erythropolis* a *R. opacus*. Pokud srovnáme aminokyselinovou sekvenci domény  $\sigma_4$  faktorů  $\sigma^D$  *C. glutamicum*, *R. erythropolis* a *R. opacus* a vezmeme v úvahu výsledky homologního modelování interakce mezi  $\sigma^D$  a oblastí -35  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *C. glutamicum* (Obr. 11, 13 a 14), tak si všimneme sekvenční shody v aminokyselinách klíčových pro interakci s nukleotidy promotoru (Obr. 35). Je vysoce pravděpodobné, že sekvenčně specifické interakce mezi aminokyselinami domény  $\sigma_4$  a nukleotidy oblasti -35  $\sigma^D$ -dependentního promotoru *C. glutamicum* (R<sup>170</sup> s G<sub>-31</sub> na templátovém vlákně DNA, V<sup>171</sup> s T<sub>-34</sub> na netemplátovém vlákně DNA a R<sup>175</sup> s G<sub>-35</sub> na netemplátovém vlákně) se vytvářejí i u *R. erythropolis* a *R. opacus* (Obr. 35).



**Obrázek 35. Porovnání sekvence aminokyselin domény  $\sigma_4$  faktoru  $\sigma^D$  *R. erythropolis*, *R. opacus* a *C. glutamicum* zodpovědné za interakci s nukleotidy  $\sigma^D$ -dependentního promotoru. Žlutě jsou zvýrazněny aminokyseliny přítomné u všech 3 mikroorganismů. Stejnou barvou jsou rámovány aminokyseliny a nukleotidy, které spolu specificky interagují.**

Funkcí faktoru  $\sigma^D$  v *C. glutamicum* je zajištění exprese genů, jejichž produkty se účastní udržení integrity buněčné stěny (Toyoda a Inui, 2018). Není překvapením, že když byl stanoven transkriptom delečního kmene  $\Delta sigD$  *C. glutamicum*, byly mezi geny se sníženou expresí i dva geny pro korynemykolyltransferázu (*cmt1*, *cmt2*), jejichž příslušnost do  $\sigma^D$ -regulonu byla potvrzena stanovením aktivity promotorů *in vivo* i *in vitro* (Dostálová *et*

al., 2019). Stejně metody jsme využili pro potvrzení příslušnosti homologů těchto dvou genů (*frmB1*, *frmB2*) k regulonu  $\sigma^D$  z *R. erythropolis* (Obr. 19, 20 a 21). Dalším zajímavým poznatkem je, že po provedení analýzy transkriptomu kmene *R. erythropolis* CCM2595 kultivovaného v přítomnosti fenolu, byly mezi nadexprimovanými geny i *frmB1* a *frmB2* (funkčně analogické genům *cmt1* a *cmt2*), což naznačuje zapojení těchto genů do stresové odpovědi vyvolané fenolem. Faktor  $\sigma^D$  tedy pravděpodobně přispívá k biodegradačnímu potenciálu a přežívání *R. erythropolis* v nepříznivých podmínkách (*Laboratoř modulace genové exprese*; nepublikované výsledky). Přispění faktoru  $\sigma^D$  k přežívání dalšího zástupce rodu *Rhodococcus* v přítomnosti toxických látek naznačily výsledky sekvenování transkriptomu kmene *R. opacus* PD630 kultivovaného v přítomnosti telluričitanu draselného. V tomto případě se stanovením TSS podařilo lokalizovat 3  $\sigma^D$ -dependentní promotory (Tab. 26) a analýzou *in vivo* potvrdit příslušnost odpovídajících genů k  $\sigma^D$ -regulonů (Obr. 29). Zjistili jsme, že exprese genu *sigD* je v *R. opacus* i *R. erythropolis* autoregulována (je pod kontrolou  $\sigma^D$ -dependentního promotoru) (Obr. 24B, 25B a 29A). Na rozdíl od toho v *C. glutamicum* je exprese *sigD* iniciována pouze z vegetativního promotoru, ale pod kontrolou  $\sigma^D$ -dependentního promotoru je gen pro anti- $\sigma^D$ , *rsdA* (Toyoda a Inui, 2018). Je zajímavé pozorovat strategii regulace u blízkých bakterií, u nichž je stejná funkce homologních genů zajištěna a řízena jiným způsobem. Sekvenování RNA *R. erythropolis* za podmínek exponenciálního růstu ukázalo, že kromě  $\sigma^D$ -dependentního promotoru má gen *sigD* i vegetativní  $\sigma^A/\sigma^B$ -dependentní promotor, ze kterého je pravděpodobně spouštěna exprese během exponenciálního růstu buňky. Stejně tomu tak bylo i v případě genů faktorů  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^J$  *R. erythropolis* (Obr. 23). Takový jev lze vysvětlit tím, že stresové  $\sigma$  faktory *R. erythropolis* jsou syntetizovány i za nestresových podmínek a jejich aktivita je posttranslačně regulována, a to např. pomocí anti- $\sigma$  faktorů. V buňce je tedy pohotovostní hladina  $\sigma$  faktoru, který může být ihned po stresovém signálu aktivován a nemusí se teprve spouštět jeho transkripce a translace. To přispívá k rychlé reakci buňky na stresový impuls. Přestože přítomnost homologních genů kódujících anti- $\sigma$  faktory u *R. erythropolis* CCM2595 a *R. opacus* PD630 je evidentní, nebyla tato regulace na rozdíl od *C. glutamicum* (Toyoda a Inui, 2018) a *M. tuberculosis* (Schneider *et al.*, 2014) popsána.

Zajímavé je, že u další příbuzné bakterie *M. tuberculosis* byla stanovena zcela odlišná konsenzuální sekvence pro rozpoznávané  $\sigma^D$ -dependentní promotory (AGAAAG pro oblast -35 a CGTTAA pro oblast -10) (Calamita *et al.*, 2005). Na rozdíl od faktorů  $\sigma^D$  *R. erythropolis*, *R. opacus* a *C. glutamicum* se  $\sigma^D$  v *M. tuberculosis* podílí především na expresi ribozomálních genů během stacionární fáze růstu bakterie a podle experimentů s delečními kmeny  $\Delta sigD$  má také vliv na virulenci. Je pravděpodobné, že tyto rozdíly jsou dány přizpůsobením tohoto patogenního zástupce na život v hostiteli (Calamita *et al.*, 2005).

## 6.2.2 Faktor $\sigma^E$ a jeho regulon u *R. erythropolis* a *R. opacus*

Dalším ECF faktorem, který je přítomen u *C. glutamicum*, *R. erythropolis* i *R. opacus*, je  $\sigma^E$ . Fyziologická role tohoto faktoru u *C. glutamicum* spočívá v zajištění stresové odpovědi na povrchový stres, teplotní stres či hladovění na dusík (Park *et al.*, 2008). Jelikož jeho regulon má u bakterie *C. glutamicum* překryv s regulonem  $\sigma^H$  (Obr. 4), tak se nepochybně účastní odpovědi na větší množství stresů, např. oxidativní stres (Busche *et al.*, 2023; Dostálová *et al.*, 2017; Šilar *et al.*, 2016). Exprese genu *sigE* *C. glutamicum* je řízena z vegetativního promotoru a aktivita faktoru je negativně regulována na posttranslační úrovni pomocí jeho anti- $\sigma$  faktoru CseA, jehož exprese je řízena z  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentního promotoru (Busche *et al.*, 2023; Park *et al.*, 2008). Stejně jako u *C. glutamicum* jsme našli vegetativní promotor genu *sigE* i u *R. erythropolis* (Obr. 23). Na rozdíl od *C. glutamicum* jsme u *R. erythropolis* také našli  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotor genu *sigE* (Obr. 18) a pomocí *in vivo* měření aktivity promotoru v *C. glutamicum* jsme prokázali, že exprese genu kódujícího  $\sigma^E$  je autoregulována (Obr. 24C). Zároveň se ukázalo, že tento promotor je rozpoznáván i faktorem  $\sigma^H$  (Obr. 24C a 25C). U *R. erythropolis* však nebyla prokázána negativní regulace pomocí anti- $\sigma$  faktoru.

U *C. glutamicum* a *M. tuberculosis* se ukázalo, že za expresi genu pro faktor  $\sigma^B$  (skupina 2) je zodpovědný faktor  $\sigma^E$  (Dostálová *et al.*, 2017; Manganelli *et al.*, 2001). To se v této práci zjistilo i v případě *R. erythropolis* CCM2595 (Obr. 24A a 25A) a *R. opacus* PD630 (Obr. 31) pomocí měření aktivity *in vivo* v *C. glutamicum*, kdy měl promotor genu *sigB* nejvyšší aktivitu v přítomnosti  $\sigma^E$ . V případě kmene *R. opacus* se analýzou transkriptomu ukázalo, že gen *sigB<sub>R.o.</sub>* (*K2Z90\_RS16460*) je exprimován v přítomnosti telluričitanu draselného v médiu. To znamená, že jak faktor  $\sigma^E$ , tak faktor  $\sigma^B$ , se podílejí při odpovědi na stres vyvolaný sloučeninami telluru. Můžeme tedy říct, že pozitivní regulace exprese genu *sigB* faktorem  $\sigma^E$  je konzervovaný mechanismus stresové odpovědi bakterií skupiny Mycolata.

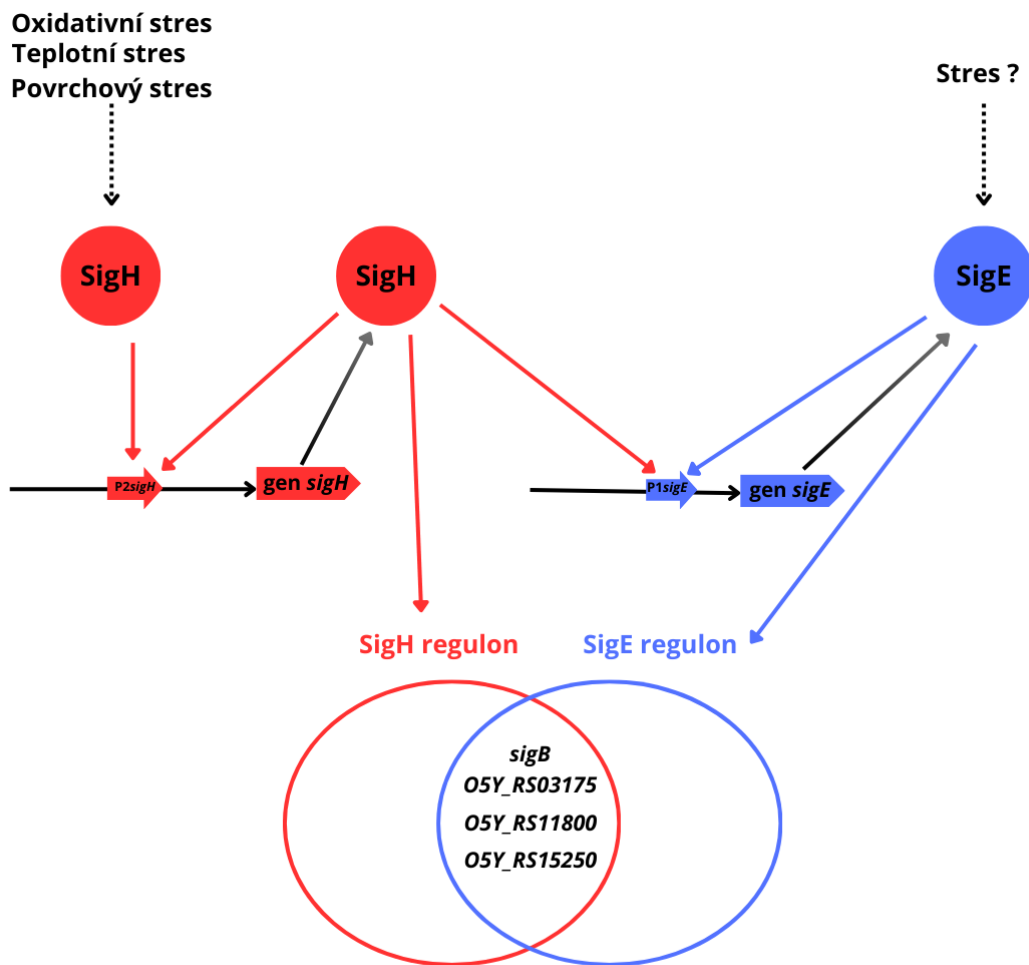
Kromě genů *sigE<sub>R.e.</sub>* a *sigB<sub>R.e.</sub>*, jejichž promotory byly analyzovány za účelem tvorby regulační sítě  $\sigma$  faktorů *R. erythropolis*, jsme další geny spadající do  $\sigma^E$  regulonu našli jako vedlejší produkt, díky RNA-sekvenování kmene *R. erythropolis* CCM2595 nadprodukujícího faktor  $\sigma^H$ . Na základě znalosti konsenzuálních sekvencí typických pro  $\sigma^E$ - i  $\sigma^H$ -dependentní promotory *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2012) a *M. tuberculosis* (Sachdeva *et al.*, 2010) jsme vybrali promotory, které měly v oblasti -35 sekvenci GGAA a v oblasti -10 sekvenci GTT (Tab. 22). Sedm z 10 bylo  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentních a pouze 3 promotory se prokázaly jako výhradně  $\sigma^H$ -dependentní. V této práci bylo analyzováno 5 promotorů (*P1RS03175<sub>R.e.</sub>*, *P1RS06830<sub>R.e.</sub>*, *P1RS07285<sub>R.e.</sub>*, *P1RS11800<sub>R.e.</sub>* a *P1RS15250<sub>R.e.</sub>*). Jako  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní se prokázaly promotory genů pro oxidoreduktázu



rodiny DsbA (P1RS03175<sub>R.e.</sub>), F420-dependentní oxidoreduktázu třídy PPOX (P1RS11800<sub>R.e.</sub>) a thioredoxin (P1RS15250<sub>R.e.</sub>) (Obr. 26). Zbývajících pět promotorů bylo analyzováno v disertační práci Ing. Lukáše Plašila, ve které se jako jediný čistě  $\sigma^H$ -dependentní prokázal promotor genu pro NADP-dependentní oxidoreduktázu (P1RS15955<sub>R.e.</sub>).

S přihlédnutím k proteinovým produktům genů, jejichž promotory se během *in vivo* analýzy prokázaly jako  $\sigma^E$ -dependentní, můžeme dedukovat, že  $\sigma^E$  *R. erythropolis* se uplatňuje v odpovědi na oxidativní, teplotní a povrchový stres podobně jako u *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023; Park *et al.*, 2008; Šilar *et al.*, 2016). Expresí genů spadajících do  $\sigma^E$ -regulonů v přítomnosti nadprodukováného faktoru  $\sigma^H$  *R. erythropolis* naznačuje, že  $\sigma^H$  ovlivňuje pozitivně i expresi genu *sigE*. Tato hypotéza je v souladu s výsledky analýzy aktivity promotoru P1*sigE*<sub>R.e.</sub> *in vivo* (24C) a *in vitro* (25C), kdy kromě faktoru  $\sigma^E$ , rozpoznal tento promotor i  $\sigma^H$ . Zajímavé je, že situace u *R. erythropolis*, kde faktor  $\sigma^H$  pozitivně reguluje produkci a aktivitu  $\sigma^E$ , je zcela jiná než u *C. glutamicum*. Faktor  $\sigma^H$  u *C. glutamicum* spouští expresi genu pro anti- $\sigma$  faktor  $\sigma^E$ , a tím způsobuje inhibici aktivity faktoru  $\sigma^E$  (Busche *et al.*, 2023).

Naší hypotézou je, že pokud na buňku *R. erythropolis* působí stresové podmínky (oxidativní stres, teplotní stres, povrchový stres), dojde k aktivaci faktoru  $\sigma^H$  (uvolnění faktoru  $\sigma^H$  přítomného i za exponenciální fáze z inhibiční vazby anti- $\sigma$  faktorem RshA) a ten poté umožní *de novo* expresi genu *sigH* a zároveň expresi genu *sigE* (Obr. 36). Dochází také k autoindukci exprese genu *sigE*, díky čemuž vzrůstá množství faktoru  $\sigma^E$  v buňce *R. erythropolis*. Zároveň se produkuje i anti- $\sigma$  faktor CseA, který se však za stresových podmínek nejspíše na  $\sigma^E$  nenaváže. Jeho vyšší hladina však zajišťuje rychlou inhibici  $\sigma^E$ , jakmile stres odezní. Oba faktory,  $\sigma^H$  i  $\sigma^E$ , poté umožňují expresi genů svých regulonů. Překryv těchto regulonů vychází z překryvu rekogniční specifity těchto dvou faktorů, který v této práci byl prokázán u promotorů genů pro faktor  $\sigma^B$  (P1*sigB*<sub>R.e.</sub>), DsbA (P1RS03175<sub>R.e.</sub>), F420-dependentní oxidoreduktázu třídy PPOX (P1RS11800<sub>R.e.</sub>) a thioredoxin (P1RS15250<sub>R.e.</sub>) (Obr. 36).



**Obrázek 36. Model vzájemné regulace faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  *R. erythropolis*.** Přerušovanou čarou je znázorněna předpokládaná posttranslační regulace faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$ . V překryvu regulonů se nachází geny, u jejichž promotorů byl v této práci prokázán překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  *R. erythropolis*.

### 6.2.3 Faktor $\sigma^H$ a jeho regulon u *R. erythropolis* a *R. opacus*

Tento ECF faktor má funkci v odpovědi na oxidativní, teplotní a povrchový stres u *C. glutamicum* (Ehira *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005). Zodpovídá za expresi velkého množství genů a také genů *sigB* a *sigM*, což z něj dělá globální regulátor stresové odpovědi *C. glutamicum* (Dostálová *et al.*, 2017; Holátko *et al.*, 2012; Nakunst *et al.*, 2007; Toyoda a Inui, 2016b). Exprese genu *sigH* *C. glutamicum* je řízena z vegetativního promotoru a aktivita faktoru je negativně regulována na posttranslační úrovni pomocí jeho anti- $\sigma$  faktoru RshA, jehož exprese je řízena ze  $\sigma^H$ -dependentního promotoru (Busche *et al.*, 2012). U *R. erythropolis* CCM2595 jsme našli vegetativní promotor, který spouští expresi *sigH*<sub>R.e.</sub> (Obr. 23). Na rozdíl od *C. glutamicum* se nám u *R. erythropolis* podařilo také nalézt  $\sigma^H$ -dependentní promotor P2*sigH* (Tab. 18) a pomocí *in vivo* (Obr. 24D) a *in vitro* (Obr. 25D)

analýzy aktivity promotoru v *C. glutamicum* jsme ukázali, že exprese genu kódujícího  $\sigma^H$  je autoregulována.

U *C. glutamicum* a *M. tuberculosis* se prokázalo, že expresi genu pro faktor  $\sigma^B$  (skupina 2) společně regulují faktory  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ , které umožňují iniciaci transkripce genu *sigB* z téhož promotoru (Dostálová *et al.*, 2017; Holátko *et al.*, 2012; Manganeli *et al.*, 2002, 2001). Analýza promotoru transkripce *in vitro* ukázala, že promotor genu *sigB* *R. erythropolis* je také  $\sigma^E/\sigma^H$ -dependentní (Obr. 25A). Tento výsledek byl ale v rozporu s měřením aktivity promotoru *in vivo*, v němž se zmíněný promotor projevil pouze jako  $\sigma^E$ -dependentní (Obr. 24A). Je však třeba si uvědomit zásadní rozdíl mezi metodami *in vitro* a *in vivo*. Transkripce *in vitro* probíhá mimo buňku a tak nejsou v reakční směsi, kromě základních komponent transkripčního aparátu, které do zkumavky vložíme (jádro RNAP,  $\sigma$  podjednotka, templátová DNA, NTPs, nezbytné kofaktory), přítomny žádné další molekuly, které v buňce transkripci spoluřídí a ovlivňují. Podle posledních poznatků může být větší počet těchto faktorů, které definují fyziologický stav buňky. Zároveň je nutno brát v potaz, že v buňce *C. glutamicum* může výsledek analýzy aktivity promotoru ovlivnit blokování  $\sigma$  faktoru anti- $\sigma$  faktorem. Předpokládáme, že testovaný promotor je rozpoznáván oběma  $\sigma$  faktory, ale s různou účinností za různých podmínek. V případě *R. opacus* PD630 došlo *in vivo* sice k silnému nárůstu aktivity promotoru genu *sigB<sub>R.o.</sub>(K2Z90\_RS16460)* s faktorem  $\sigma^E$  (Obr. 31), ale byl zde pozorován i mírný nárůst aktivity promotoru v přítomnosti  $\sigma^H$ . Můžeme tak říct, že překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  pro promotor genu *sigB* je konzervovaný mechanismus globální stresové odpovědi u skupiny Mycolata.

Za účelem popsání  $\sigma^H$ -regulonů jsme provedli sekvenování transkriptomu kmene *R. erythropolis* CCM2595 nadprodukcujícího faktor  $\sigma^H$  z téhož kmene (gen *sigH* ve vektoru pEC-XT99A). Na základě znalosti konsenzuální sekvence  $\sigma^H$ -dependentních promotorů *C. glutamicum* a analýzy výsledků sekvenování specifického pro 5' konce transkriptů jsme identifikovali potenciální  $\sigma^H$ -dependentní promotory (Tab. 22). Z 53 nadexprimovaných genů bylo vybráno 10, u jejichž promotorů se podařilo identifikovat sekvenční motivy typické pro oblast -35 (GGAA) a oblast -10 (GTT)  $\sigma^H$ -dependentních promotorů *C. glutamicum*. Jiný konzervovaný motiv nebyl v těchto oblastech 53 genů nalezen. 5 promotorů těchto genů bylo analyzováno metodou *in vivo* v této práci (Obr. 26), další pak byly analyzovány v disertační práci kolegy Ing. Lukáše Plašila. U všech promotorů analyzovaných v této práci byla prokázána  $\sigma^H$ -dependence. Jednalo se o promotory genů kódujících oxidoreduktázu rodiny DsbA (*O5Y\_RS03175*), N-acetyltransferázu rodiny GNAT (*O5Y\_RS06830*), flavin-dependentní oxidoreduktázu třídy LLM (*O5Y\_RS07285*), F420-dependentní oxidoreduktázu třídy PPOX (*O5Y\_RS11800*) a thioredoxin (*O5Y\_RS15250*) (Obr. 26). V případě práce kolegy Ing. Lukáše Plašila se jednalo o promotory genů pro flavin-dependentní oxidoreduktázu třídy LLM (*O5Y\_RS08240*), NADP-dependentní

oxidoreduktázu (O5Y\_RS15955), NADH oxidázu (O5Y\_RS17335), oxidoreduktázu (O5Y\_RS21305) a aldo/keto reduktázu (O5Y\_RS21310). Jsou to produkty genů, u nichž je známo, že mají úlohu v odpovědi na oxidativní a teplotní stres u *C. glutamicum* (Ehira *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005; Busche *et al.*, 2012). Můžeme tak předpokládat, že faktor  $\sigma^H$  má velmi podobnou úlohu ve stresových odpovědích u *R. erythropolis* a *C. glutamicum*.

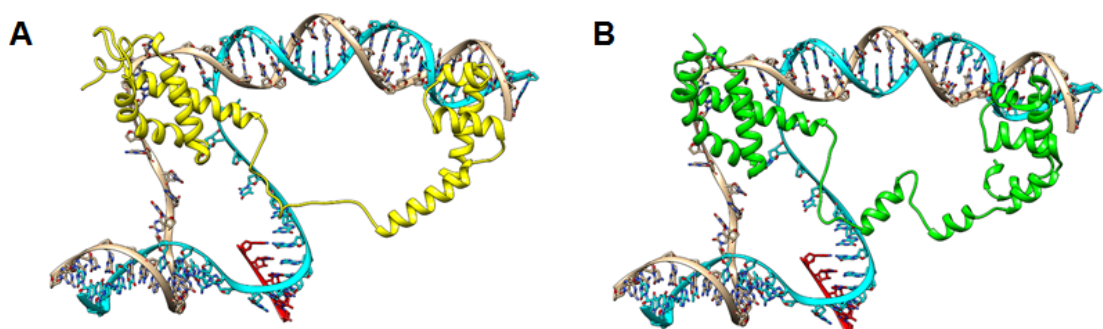
Stejným způsobem jako analýza transkriptomu kmene *R. erythropolis* CCM2595 nadprodukcujícího faktor  $\sigma^H$  byla provedena analýza transkriptomu kmene *R. opacus* PD630 kultivovaného v přítomnosti telluričitanu draselného. Modelový stresový podnět  $\sigma$  faktorem byl tak nahrazen skutečným stresovým podnětem, v daném případě toxickou sloučeninou. Stejně jako v případě *R. erythropolis*, také zde jsme pátrali po promotorech genů (Tab. 26), které byly nadexprimovány a jejichž promotory vykazovaly sekvenční charakteristiku podobnou  $\sigma^H$ -dependentním promotorům *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023). Šest ze sedmi takových promotorů vykazovalo  $\sigma^H$ -dependenci (Obr. 30 a Obr. 31). Jednalo se o promotory genů pro aldo/ketoreduktázu (promotor P2RS07365<sub>R.o.</sub>), superoxidodismutázu (promotor P2RS01905<sub>R.o.</sub>), transkripční regulátor z rodiny AraC (promotor P0RS39075<sub>R.o.</sub>), faktor  $\sigma^B$  (promotor P1RS16460<sub>R.o.</sub>), adenin C2-metylázu pro 23S RNA (promotor P2RS15515<sub>R.o.</sub>) a dithiol-disulfidizomerázu (P1RS25935<sub>R.o.</sub>). Kromě toho, že faktor  $\sigma^H$  a produkty těchto genů hrají prokazatelně úlohu v odpovědi na stres vyvolaný sloučeninou telluru, tak se pravděpodobně dle povahy enzymů podílejí i na odpovědi na oxidativní stres. Můžeme předpokládat, že stres vyvolaný toxickými sloučeninami indukuje u *R. opacus* odpověď na oxidativní stres, stejně jako u dalších rhodokoků (Pátek *et al.*, 2021). V této odpovědi pak hraje důležitou roli faktor  $\sigma^H$  jakožto globální regulátor stresové odpovědi (Schröder a Tauch, 2010). Podle sekvencí nalezených  $\sigma^H$ -/ $\sigma^E$ -dependentních promotorů (Tab. 26) je zřejmé, že zde platí podobné pravidlo rozlišení rekogniční specifity striktně  $\sigma^H$ -dependentních promotorů a  $\sigma^H$ / $\sigma^E$ -dependentních promotorů jako u *C. glutamicum*. Jediný promotor (P1RS16460<sub>R.o.</sub>), u kterého došlo k rozpoznání faktorem  $\sigma^E$  (Obr. 31), měl sekvenci GGAAC-N<sub>16-19</sub>-GTT. Právě nukleotid C v pozici -31 v sekvenci promotoru je zásadní pro rozlišení mezi  $\sigma^H$ - a  $\sigma^H$ / $\sigma^E$ -dependentními promotory *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023). U *R. erythropolis* měření aktivity promotorů *in vivo* podobné výsledky neukázalo, a proto jsme se rekogniční specifitu  $\sigma^H$ / $\sigma^E$ -dependentních promotorů rozhodli zkoumat mutagenezí v oblastech -35 a -10.

#### 6.2.4 Překryv rekogniční specifity faktorů $\sigma^E$ a $\sigma^H$ *R. erythropolis*

Překryv rekogniční specifity promotorů najdeme u *C. glutamicum* především u genů spadajících do  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -regulonů (Busche *et al.*, 2023; Šilar *et al.*, 2016). Na molekulární úrovni jsou tyto překryvy způsobeny sekvenční podobností domén  $\sigma_4$  a  $\sigma_2$  faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$

a podobnými konsenzuálními sekvencemi oblastí -35 a -10  $\sigma^H$ - a  $\sigma^E$ -dependentních promotorů *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023). Nakonec se i s pomocí mutační záměny aminokyselin v  $\sigma^H$  a homologního modelování v kombinaci se simulací molekulární dynamiky podařilo odlišit konsenzuální sekvence pro striktně  $\sigma^H$ -dependentní promotory (gGGAA $\underline{\text{t}}$ -N<sub>16-19</sub>-GTT) a pro  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotory (GGAAC-N<sub>16-19</sub>-GTT) *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023). Ze znalostí těchto sekvencí jsme vycházeli při analýze překryvu rekogniční specifity u *R. erythropolis*.

O tom, že překryvy rekogničních specifit faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  jsou častým jevem i u *R. erythropolis*, jsme se přesvědčili v kapitolách 5.2.2 a 5.2.3. Z analyzovaných promotorů se jako jediný striktní a relativně silný  $\sigma^H$ -dependentní promotor ukázal promotor genu pro flavin-dependentní oxidoreduktázu třídy LLM (promotor P1RS07285<sub>R.e.</sub>) se sekvencemi -35 GGAA $\underline{\text{A}}$  a -10 GTT (Obr. 26C). Striktní  $\sigma^E$ -dependentní promotor se v podstatě najít nepodařilo. Této představě se však alespoň přiblížil promotor genu faktoru skupiny 2 sigB (P1sigB<sub>R.e.</sub>) (Obr. 24A) se sekvencemi -35 GGAAC $\underline{\text{C}}$  a -10 GTT. Záměna nukleotidu -31 GGAAC $\underline{\text{C}}$  → GGAA $\underline{\text{A}}$  promotoru P1sigB<sub>R.e.</sub> měla způsobit, že se z tohoto  $\sigma^E$ -dependentního promotoru stane  $\sigma^H$ -dependentní promotor. U záměny nukleotidu -31 GGAA $\underline{\text{A}}$  → GGAAC $\underline{\text{C}}$  promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub> se naopak předpokládalo, že ze striktního  $\sigma^H$ -dependentního promotoru se stane promotor s alespoň částečnou  $\sigma^E$ -dependencí. K podrobnějšímu vysvětlení interakcí, které se projevily při měřeních aktivit mutantních variant promotorů, nám pomohlo homologní modelování a simulace molekulární dynamiky (Dr. Ivan Barvík). Jako vzor byla použita cryoEM struktura s kódem 6JBQ (Fang *et al.*, 2019), která zachycuje komplex *E. coli* RNAP (včetně podjednotky  $\sigma^E$ ). Na základě strukturní podobnosti se podařilo vytvořit model, který znázorňuje interakci faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  *R. erythropolis* s promotorem (Obr. 37).



**Obrázek 37.** Homologní modely domén  $\sigma$  podjednotek **A)**  $\sigma^E$  *R. erythropolis*, **B)**  $\sigma^H$  *R. erythropolis* rozpoznávajících oblasti -10 a -35 promotorů zobrazené v komplexu s transkripční bublinou: templátová DNA (bleděmodrá), netemplátová DNA (bronzová), RNA (červená),  $\sigma^E$  (žlutá),  $\sigma^H$  (zelená).

P1sigB<sub>R.e.</sub> má v oblastech -35 a -10 sekvence **GGAAC** a **CGTT**, které odpovídají konsenzuálním sekvencím nalezeným u  $\sigma^E$  *C. glutamicum* (Tab. 18). V souladu s tím ho účinně rozpoznává  $\sigma^E$  *R. erythropolis* (Obr. 27A). Jistou zbytkovou aktivitu  $\sigma^E$  *R. erythropolis* jsme ale pozorovali i u všech tří -31 mutantů P1sigB<sub>R.e.</sub> (Obr. 27B, C, D). Zřejmě na tom má podíl T<sub>-30</sub> netemplátového vlákna promotoru, díky němuž může postranní řetězec klíčového argininu R<sup>215</sup> faktoru  $\sigma^E$  vždy vytvářet alespoň stabilizující vodíkovou vazbu s A<sub>-30</sub> templátového vlákna promotoru.

Faktor  $\sigma^H$  dle očekávání způsobil nárůst aktivity u mutantní varianty PsigB<sub>R.e.</sub>T<sub>-31</sub> (27D), u které výsledná sekvence GGAAT (Tab. 25) odpovídala konsenzuální sekvenci  $\sigma^H$ -dependentních promotorů u *C. glutamicum*, ale i u mutantní varianty PsigB<sub>R.e.</sub>A<sub>-31</sub> (Obr. 27C), kde postranní řetězec klíčového methioninu M<sup>218</sup> interagoval s T<sub>-31</sub> templátového vlákna DNA. Zřejmě pak vznikají stabilizující hydrofobní interakce mezi terminální metylovou skupinou z postranního řetězce M<sup>218</sup> a metylovou skupinou z báze T<sub>-31</sub>.

Vazebnou preferenci pro A<sub>-31</sub> a T<sub>-31</sub> projevil faktor  $\sigma^H$  i v původním promotoru P1RS07285<sub>R.e.</sub> (Obr. 28A) a jeho mutantní variantě P1RS07285<sub>R.e.</sub>T<sub>-31</sub> (Obr. 28D). Faktor  $\sigma^E$  zase naopak prokázal vazebnou preferenci v mutantních variantách P1RS07285<sub>R.e.</sub>G<sub>-31</sub> a P1RS07285<sub>R.e.</sub>C<sub>-31</sub> (Obr. 28B,C). Zajímavé je, že v těchto mutantních variantách byla aktivita v přítomnosti  $\sigma^E$  vysoká i bez indukce exprese genu *sigE*. I přes to, že se předpokládá, že inducibilní promotor *Ptrc* vektoru pEC-XT99A nemá bez indukce téměř žádnou aktivitu (Kirchner a Tauch, 2003), může docházet ke slabé expresi bez přidání IPTG. Mohla tak nastat situace, že interakce prostřednictvím vodíkových můstků mezi G<sub>-31</sub> (ať už na templátovém nebo netemplátovém vlákně) a R<sup>215</sup> byla tak silná, že slabá exprese stačila k tomu, aby došlo k velkému nárůstu aktivity promotoru i bez indukce.

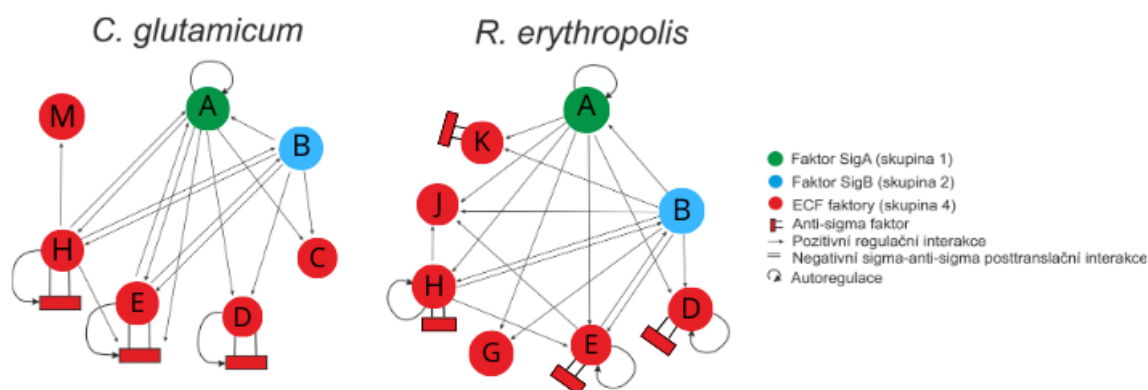
Kdybychom vzali v úvahu výsledky mutagenese a jejich interpretaci s pomocí homologního modelování, vyšlo by nám, že konsenzuální sekvence pro  $\sigma^H$ -dependentní promotor *R. erythropolis* je tvořena -35 GGAA<sup>A</sup>/T a -10 GTT a že konsenzuální sekvence pro  $\sigma^E$ -dependentní promotor je tvořena GGAA<sup>C</sup>/G (oblast -35) a GTT (oblast -10). Nutno však poznamenat, že tyto sekvence stále nevyklučují možnost, že promotor bude rozpoznán oběma faktory v komplexu s RNAP. Lze dedukovat, že pro  $\sigma^E$ -dependentní promotory *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023) a *R. erythropolis* je společné, že C v pozici -31 determinuje rozpoznání faktorem  $\sigma^E$ . Tuto sekvenci charakteristiku ale splňoval i promotor P2sigH<sub>R.e.</sub> (Tab. 18), a přesto analýza *in vivo* (24D) a *in vitro* (25D) neprokázala jeho  $\sigma^E$ -dependenci. Kromě sekvence oblastí -35 a -10 bychom tedy neměli opomíjet okolní sekvence, které mohou mít vliv na interakci promotorů a  $\sigma$  faktorů *R. erythropolis*. Zejména je to oblast mezerníku, která obsahuje více GC párů, což může mít vliv na iniciaci transkripce. Cestou pro definitivní charakterizaci rekogniční specifity faktorů  $\sigma^E/\sigma^H$

*R. erythropolis* a jejich překryvů je hledání dalších promotorů a provádění bodových mutací v různých oblastech promotorů, případně mutageneze v  $\sigma$  faktorech.

## 6.3 Porovnání transkripčních regulačních sítí řízených $\sigma$ faktory *C. glutamicum* a *R. erythropolis*

Regulace genové exprese je komplexní proces, který umožňuje bakteriím reagovat na změny vnitřního a vnějšího prostředí buňky. Exprese genů může být ovlivňována na transkripční, translační či posttranslační úrovni. S přibývajícím znalostmi v oboru mikrobiologie je více než zřejmé, že tyto úrovně jsou propojené a samotné studium veškerých typů regulací vyžaduje propojení jak experimentálních biologických metod *in vitro* a *in vivo*, tak bioinformatických metod a matematického modelování *in silico*. Poznatky zahrnující regulaci genové exprese tvoří důležitý podklad pro studium virulence, růstu, množení, mezibuněčné komunikace, evolučních vztahů a stresových odpovědí mikroorganismů. Příkladem aplikace těchto poznatků je tvorba a cílení účinku nových léčiv či využití v biotechnologiích.

Tvorba regulačních sítí řízených  $\sigma$  faktory *C. glutamicum* a *R. erythropolis* je komplikovaný proces, během kterého jsme museli experimentálně získaná data *in vitro/in vivo* zpracovávat a porovnávat bioinformatickými postupy. I přes to, že tyto bakterie jsou považovány za příbuzné, je nutné zmínit, že počet jejich  $\sigma$  faktorů se výrazně liší. Zatímco kmen *C. glutamicum* má pouze 7  $\sigma$  faktorů a žádný z nich nepatří do skupiny 3, tak *R. erythropolis* má nejméně 21 genů kódujících  $\sigma$  faktory a jsou mezi nimi zastoupeny všechny 4 skupiny (databáze MiST 4.0). Tato skutečnost spolu s rozdílnou velikostí bakteriálních genomů *C. glutamicum* ATCC 13032 (přibližně 3,3 Mbp) (Kalinowski *et al.*, 2003) a *R. erythropolis* CCM2595 (přibližně 6,3 Mbp) (Strnad *et al.*, 2014) naznačují, že regulační mechanismy genové exprese u *R. erythropolis* budou daleko složitější než u *C. glutamicum* a úplné rozluštění vztahů mezi všemi  $\sigma$  faktory v rámci transkripční regulační sítě je záležitostí dlouhodobých studií. Námí sestavená regulační síť zahrnuje vztahy mezi základními  $\sigma$  faktory, které se nám podařilo experimentálně potvrdit nebo předpovědět na základě bioinformatické analýzy (Obr. 38).



**Obrázek 38. Modely regulačních sítí *C. glutamicum* ATCC 13032 a *R. erythropolis* CCM2595 založené na bioinformatických analýzách sekvencí genomu a experimentálně získaných datech. Pomocí šipek jsou zvýrazněny pozitivní regulace ( $\sigma$  faktor účastnící se transkripce jiného *sig* genu) a dvojitá čára bez šipek značí negativní posttranslační regulaci aktivity  $\sigma$  faktorů pomocí anti- $\sigma$  faktorů.**

Faktory skupiny 1 (vegetativní faktory) jsou přítomny u všech bakterií a podílí se na expresi *housekeeping* genů, které buňka potřebuje pro základní metabolismus a exponenciální růst. Bez těchto faktorů nemůže bakteriální buňka přežít a tak není možné ani vytvořit deleční kmeny postrádající příslušný gen *sig* (Paget a Helmann, 2003). Tuto skupinu v kmenech *C. glutamicum* ATCC 13032 i *R. erythropolis* CCM2595 tvoří jediný zástupce, a to  $\sigma^A$ . Měření aktivity  $\sigma^A$ -dependentních promotorů ve dvouplazmidových kmenech *C. glutamicum* je velice komplikované kvůli tomu, že vysoká hladina faktoru  $\sigma^A$  během celé doby kultivace způsobuje vysokou aktivitu promotoru a jeho nadprodukce nemá většinou na hodnoty aktivity vliv. Proto jsou zde téměř veškeré experimentální výsledky získané detekcí aktivity pomocí transkripce *in vitro*, při které je možné porovnat reakci, kdy je přítomen faktor  $\sigma^A$ , s reakcí, při které je naopak nepřítomen (Holátko *et al.*, 2012). Pro faktor  $\sigma^A$  *C. glutamicum* bylo prokázáno, že pozitivně reguluje expresi všech *sig* genů (a to včetně vlastního) s výjimkou genů *sigB* a *sigM* (Obr. 38) (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013; Taniguchi a Wendisch, 2015; Toyoda a Inui, 2016a). Kromě toho, že je gen *sigA* *C. glutamicum* autoregulován, je jeho exprese spuštěna i ze  $\sigma^H$ -dependentního promotoru (Obr. 38) (Toyoda *et al.*, 2015). Přihlédneme-li k tomu, že mnohé  $\sigma^H$ - a  $\sigma^E$ -dependentní promotory *C. glutamicum* vykazují překryv rekogniční specifity  $\sigma$  faktorů (Busche *et al.*, 2023), nelze vyloučit, že tento promotor je i  $\sigma^E$ -dependentní. Faktor  $\sigma^A$  *R. erythropolis* CCM2595 sdílí řadu charakteristik s příbuzným  $\sigma^A$  v *C. glutamicum*. Předpokládali jsme, že *R. erythropolis* má stejnou konsenzuální sekvenci pro oblasti -35 (ttgncA) a -10 (TAnnnT)  $\sigma^A$ -dependentních promotorů jako *C. glutamicum* (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Pro všechny studované *sig* geny *R. erythropolis* jsme našli v sekvenci genomu vegetativní promotor (Obr. 23). Výjimkou byl stejně jako v případě *C. glutamicum* faktor  $\sigma^B$ . Na rozdíl od



*C. glutamicum* se však nepodařilo nalézt žádný ECF-dependentní promotor, který by byl schopný iniciovat expresi genu *sigA* *R. erythropolis*. Pro  $\sigma^A$  *C. glutamicum* i *R. erythropolis* platí, že pozitivně regulují expresi genů pro ECF faktory. Jedná se tak pravděpodobně o mechanismus, který umožňuje oběma zástupcům rychle reagovat na náhlou změnu podmínek. Díky tomu, že exprese *sig* genů ECF faktorů probíhá i za nestresových podmínek, je buňka v případě stresu ihned připravena spustit expresi genů potřebných pro patřičnou odpověď.

Skupina 2 rodiny  $\sigma^{70}$  zahrnuje faktory, které hrají roli během odpovědi na stresy spojené zejména s přechodem do stacionární fáze růstu. Oba mikroorganismy disponují jediným zástupcem této skupiny, a to  $\sigma^B$ . U *C. glutamicum* tento faktor rozpoznává stejnou sekvenci jako vegetativní faktor  $\sigma^A$  (Obr. 38). Tím pádem transkripce *in vitro* poskytuje při analýze téhož promotoru transkript jak při reakci se  $\sigma^A$ , tak se  $\sigma^B$  (Šilar *et al.*, 2016). Ani v jedné ze dvou srovnávaných bakterií není *sigB* autoregulován, ale je transkribován díky  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentnímu promotoru. Tato interakce byla experimentálně prokázána nejen u *C. glutamicum* (Dostálová *et al.*, 2017; Holátko *et al.*, 2012) a *Rhodococcus erythropolis* (Obr. 24A, Obr. 25A), ale i u *R. opacus* (Obr. 31). Jedná se tedy o velmi konzervovanou regulační interakci, kterou se buňka přizpůsobuje stresu a spouští prostřednictvím  $\sigma^H/\sigma^E$  expresi *sigB*, aby mohl faktor  $\sigma^B$  převzít roli faktoru  $\sigma^A$  během stacionární fáze.

Skupina 4 (ECF faktory) zahrnuje nejvíce  $\sigma$  faktorů u *C. glutamicum*. U všech genů *sig* ECF faktorů *C. glutamicum* s výjimkou *sigM* (Obr. 38) byl nalezen vegetativní promotor (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013; Taniguchi a Wendisch, 2015; Toyoda a Inui, 2016a). Aktivita faktorů  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  *C. glutamicum* je posttranslačně regulována anti- $\sigma$  faktory (Busche *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2008; Toyoda a Inui, 2018). Za nestresových podmínek se spouští exprese ECF *sig* genu zásluhou faktoru  $\sigma^A$ . Je možné, že z téhož promotoru se spouští i transkripce s nastávající stacionární fází růstu nebo za obecných stresových podmínek díky  $\sigma^B$ . ECF faktor pak umožňuje transkripci genu pro anti- $\sigma$  faktor. Jedná se o mechanismus negativní zpětné vazby, kdy anti- $\sigma$  posttranslačně inhibuje aktivitu ECF faktoru (Paget *et al.*, 2015). Pokud však dojde ke stresovému impulsu, dochází k uvolnění ECF faktoru z inhibiční vazby s anti- $\sigma$  faktorem (Flynn *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003; Hecker *et al.*, 2007). Exprese genu faktoru  $\sigma^M$  *C. glutamicum* není spouštěna prostřednictvím vegetativního promotoru a ani zde není negativní zpětná vazba zprostředkovaná anti- $\sigma$  faktorem. Exprese *sigM* genu je pozitivně regulována faktorem  $\sigma^H$  (Nakunst *et al.*, 2007), což odráží překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^M$  a  $\sigma^H$  a jejich koordinovanou regulaci (Obr. 34). Stejně jako většina genů pro *sig* ECF faktory *C. glutamicum* jsou i geny pro ECF faktory *R. erythropolis* pozitivně regulovány faktory  $\sigma^A/\sigma^B$  (Obr. 23). Pomocí metod *in vivo/in vitro* se nám podařilo prokázat, že geny ECF faktorů *sigD* (Obr. 24B a 25B) *sigE* (Obr. 24C) a *sigH* (24D a 25D) *R. erythropolis* jsou autoregulovány, což nebylo prokázáno u žádného genu ECF faktoru

*C. glutamicum*. Autoregulaci jsme prokázali i u *sigD* příbuzné bakterie *R. opacus* (Obr. 29A). K takové autoregulaci dochází během aktivace stresové odpovědi na přítomnost telluričitanu draselného (viz kapitola 5.2.5). Dalším rozdílem, který jsme našli pomocí *in vivo/in vitro* metod, je, že exprese genu *sigE* *R. erythropolis* je umožněna promotorem, u kterého je překryv rekogniční specifity dán faktory  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  (Obr. 24C). Jak se ukázalo i v dalších experimentech této práce, hraje překryv regulonů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$  zřejmě významnější roli ve stresových odpovědích *R. erythropolis* než *C. glutamicum*. U *C. glutamicum* byla prokázána negativní zpětnovazebná regulace genů *sigD* (Toyoda a Inui, 2018), *sigE* (Park *et al.*, 2008) a *sigH* (Busche *et al.*, 2012) pomocí anti- $\sigma$  faktorů. V genomu *R. erythropolis* byly nalezeny geny pro faktory anti- $\sigma^D$ , anti- $\sigma^E$ , anti- $\sigma^K$  a anti- $\sigma^H$  (nepublikované výsledky laboratoře), avšak způsob regulace nebyl prozkoumán. ECF faktory  $\sigma^G$ ,  $\sigma^J$  a  $\sigma^K$  se vyskytují u *R. erythropolis*, ale ne u *C. glutamicum*.

U *R. erythropolis* bylo identifikováno ještě dalších 13  $\sigma$  faktorů, mezi které patří i  $\sigma^F$  ze skupiny 3. Ty však nebyly zatím studovány.

## 6.4 Hierarchie, modularita a integrace stresových regulonů *C. glutamicum* a *R. erythropolis*

$\sigma$  faktory RNAP zajišťují rozpoznání promotoru RNAP, její interakci s DNA a vznik transkripční bubliny při iniciaci transkripce. Existence různých druhů  $\sigma$  faktorů přispívá ke schopnosti buňky efektivně měnit expresi genů v závislosti na podmínkách, ve kterých se v danou chvíli bakterie vyskytuje. Při odpovědích na stresové impulzy se uplatňují zejména faktory skupiny 4 (ECF faktory) (Staroň *et al.*, 2009). Bakterie využívané v biotechnologiích při nadprodukcii cenných organických látek (např. *C. glutamicum*) nebo při degradaci toxických látek v prostředí (např. *R. erythropolis*) se v biotechnologických procesech setkávají s řadou stresů. Proto byla v této práci pozornost soustředěna na uplatnění  $\sigma$  faktorů a příslušných regulonů (sigmulonů).

Sigmulony tvoří samostatné skupiny genů, jejichž koordinátorem je jejich řídicí  $\sigma$  faktor RNAP. Optimální funkce bakteriálních buněk v různých podmínkách je zajišťována regulačními sítěmi, které obsahují hierarchické, modulární a integrativní prvky. U sigmulonů, jako zvláštní skupiny regulonů, je otázkou, jak moc jsou funkce těchto skupin genů uspořádány hierarchicky, modulárně nebo integrativně.

*Bacillus subtilis* byl jedním z prvních bakteriálních modelů, u nichž byly funkce  $\sigma$  faktorů studovány. Sledování funkcí  $\sigma$  faktorů se zaměřilo na průběh sporulace, protože se jedná o pozoruhodný a velmi složitý proces, do něhož se zapojuje několik  $\sigma$  faktorů. Koordinace funkcí  $\sigma$  faktorů a příslušných proteinů byla popsána jako kaskáda (Errington, 2003). Sporulace začíná produkcí proteinu SpoIIIR, která je řízena faktorem  $\sigma^F$ . Dále

následuje spuštění funkce faktoru  $\sigma^E$ . V navazujících procesech se aktivuje faktor  $\sigma^G$ , jehož aktivitou vzniká mechanismus zajišťující proteolytickou aktivaci  $\sigma^K$  (Serrano *et al.*, 2015). Kromě hierarchické aktivace jednotlivých  $\sigma$  faktorů se uplatňuje i funkční propojení faktorů a jejich produktů (De Hoon *et al.*, 2010).

Z publikace zabývající se problematikou  $\sigma$  regulonů gramnegativního oportunistického patogenu *Pseudomonas aeruginosa* vyplývá, že  $\sigma$  regulony jsou velmi specifické a utváří moduly (Schulz *et al.*, 2015). Modul tvoří skupina genů a  $\sigma$  faktor zprostředkovávající jejich expresi. Expres dané skupiny genů je tak pozitivně regulována pouze jedním konkrétním  $\sigma$  faktorem a nedochází k překryvu regulonů. Hypotézou je, že *P. aeruginosa* se tak díky modulární expresi může rychle adaptovat na různá životní prostředí (lidský hostitel, voda či půda) (Binder *et al.*, 2016).

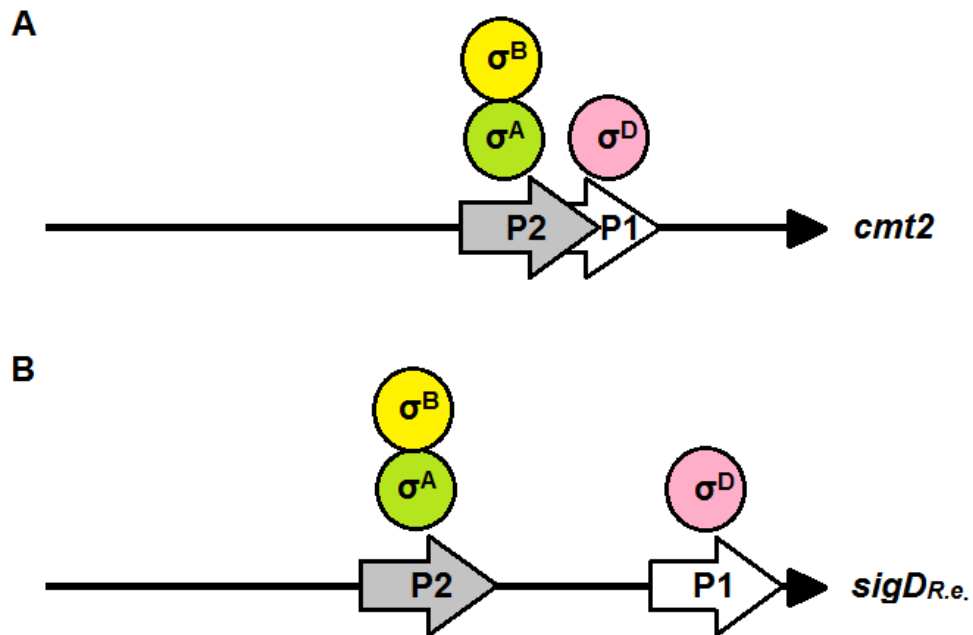
I přesto, že tento způsob striktní regulace může do jisté míry platit u *P. aeruginosa*, tak u řady bakteriálních druhů, například u *E. coli* (Cho *et al.*, 2014), *B. subtilis* (Luo a Helmann, 2009), *C. crescentus* (Alvarez-Martinez *et al.*, 2007), *L. monocytogenes* (Chaturongakul *et al.*, 2011) či *M. tuberculosis* (Dainese *et al.*, 2006; Manganelli *et al.*, 2002, 2001) se regulony  $\sigma$  faktorů mohou překrývat. Experimentální data získaná v naší laboratoři ukazují, že překryvy  $\sigma$  regulonů jsou častým jevem i u korynebakterií a rhodokoků.

Překryvy regulonů mohou nastat následkem dvou situací: A) transkripce některých genů je řízena ze dvou a více promotorů, z nichž každý je rozpoznáván jiným  $\sigma$  faktorem, B) promotory některých genů jsou alternativně rozpoznávány dvěma či více různými  $\sigma$  faktory (Cho *et al.*, 2014).

Geny, jejichž exprese je iniciována ze dvou nebo více promotorů s různou dependencí, se v genomech *C. glutamicum* a *R. erythropolis* vyskytují často. Obvykle jde o geny, které mají jeden promotor ECF-dependentní a další vegetativní  $\sigma^A/\sigma^B$ -dependentní. Příkladem jsou geny *C. glutamicum*, které dle této definice spadají jak do  $\sigma^D$ -regulonů, tak i do  $\sigma^A/\sigma^B$ -regulonů. Jsou to například geny kódující korynomykolyltransferázu (*cmt2*; Obr. 39A), L,D-transpeptidázu (*lppS*) či dihydroliipoamid dehydrogenázu (*lpd*) (Dostálová *et al.*, 2019). Předpokládá se, že  $\sigma^A/\sigma^B$ -dependentní promotor umožňuje bazální expresi genu během exponenciální (případně počátku stacionární) fáze růstu, zatímco stresový promotor se uplatní především v odpovědi na stres. Podle našich poznatků dokonce tato kombinace u stresových genů *C. glutamicum* převažuje.

Některé geny, které se účastní stresových opovědí, mají dva samostatné promotory, z nichž každý je rozpoznáván jiným ECF  $\sigma$  faktorem. Příkladem může být gen pro Acyl-CoA syntetázu, který je transkribován prostřednictvím dvou promotorů, z nichž jeden je  $\sigma^D$ -dependentní a druhý  $\sigma^H$ -dependentní (Dostálová *et al.*, 2019). Při hledání promotorů *sig* genů *R. erythropolis* CCM2595 se nám podařilo identifikovat sekvence, ve kterých dva různé promotory zajišťují transkripci jednoho genu (Obr. 23). Takové sekvence se nachází

před geny *sigD<sub>R.e.</sub>* ( $\sigma^A/\sigma^B$ - a  $\sigma^D$ -dependentní promotor; Obr. 39B), *sigE<sub>R.e.</sub>* ( $\sigma^A/\sigma^B$ - a  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotor), *sigH<sub>R.e.</sub>* ( $\sigma^A/\sigma^B$ - a  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotor) a *sigJ<sub>R.e.</sub>* ( $\sigma^A/\sigma^B$ - a  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotor). Můžeme předpokládat, že překryv vegetativních a stresových regulonů opět zajišťuje, aby alespoň slabá transkripce stresových genů probíhala i za nestresových podmínek. Bakteriální buňka si tak může zajistit větší šanci přežití za rychlé změny podmínek (přítomnost stresoru, poškození buněčné stěny, změna teploty, osmotický šok).



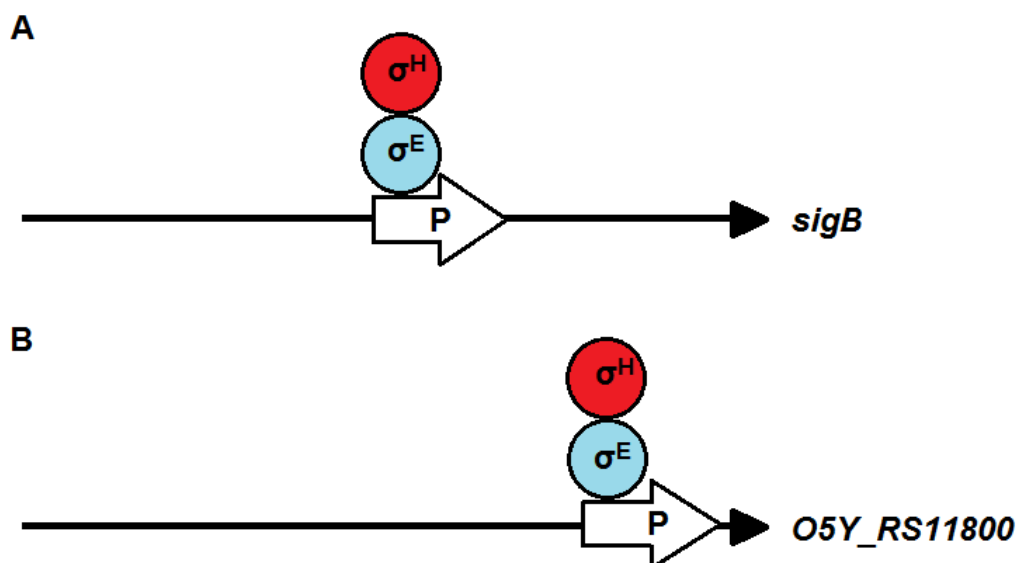
**Obrázek 39. Regulace exprese genu *C. glutamicum* a *R. erythropolis* pomocí dvou promotorů s různou dependencí** A) gen *cmt2* *C. glutamicum* B) gen *sigD* *R. erythropolis*. Černou šipkou je zvýrazněn začátek translace. Černá čára znázorňuje oblast před translatovanou oblastí. Promotory označené P1 a P2 jsou znázorněny bílou a šedou šipkou. Nad šipkami jsou dle odpovídajícího promotoru umístěny faktory  $\sigma^A$  (zeleně),  $\sigma^B$  (žlutě) a  $\sigma^D$  (růžově).

Nesmíme však zapomenout, že  $\sigma$  faktory nejsou zdaleka jediné proteinové transkripční regulátory u *C. glutamicum* a *R. erythropolis* a sekvence promotorů mohou vázat i další regulátory, které fungují jako aktivátory/represory transkripce během stresové odpovědi (Schröder a Tauch, 2010). To je dokonce velmi časté a regulace stresových regulonů DNA-vazebnými regulátory je běžná. Příkladem je proteinový regulátor z rodiny MarR, který aktivuje expresi genů podílejících se na remodelaci buněčné stěny v *C. glutamicum* (Hünnefeld *et al.*, 2019). U některých genů stresových odpovědí byla prokázána iniciace transkripce z vegetativních ( $\sigma^A/\sigma^B$ -dependentních) promotorů a regulace jejich exprese DNA-vazebnými regulátory. To se týká např. genů pro chaperony *groES* a *groEL2* z *C. glutamicum*, jejichž expresi ovládají proteinové regulátory prostřednictvím vazebných motivů CIRCE a HAIR (Barreiro *et al.*, 2013). Podobně geny

kódující enzymy pro degradaci fenolu z *R. erythropolis* jsou transkribovány z vegetativních promotorů a gen pro klíčový enzym (fenolhydroxylázu) je aktivován AraC regulátorem (Szóköi *et al.*, 2014).

S přihlédnutím k nemalému počtu genů kódujících DNA-vazebné regulátory nebo dvousložkové systémy v genomech *C. glutamicum* ATCC 13032 (cca 144 genů) a *R. erythropolis* CCM2595 (cca 600 genů) lze předpokládat, že další studie týkající se těchto regulátorů nám dále osvětlí jejich funkci v regulaci stresové odpovědi.

Tato práce byla zaměřena především na překryvy stresových  $\sigma$  regulonů korynebakterií a rhodokoků, které jsou způsobeny tím, že u některých promotorů dochází k překryvu rekogniční specifity, tj. jsou rozpoznávány dvěma nebo více různými ECF faktory (Obr. 40). Podle výsledků analýzy  $\sigma$  faktorů a promotorů *C. glutamicum* a *R. erythropolis* můžeme říct, že tato charakteristika platí zejména pro řadu promotorů genů spadajících do  $\sigma^H$ - a  $\sigma^E$ -regulonů. Překryvy rekogniční specifity  $\sigma^H/\sigma^E$  *C. glutamicum* platí pro promotory genů pro chaperony (*dnaK*, *dnaJ2*), transkripční regulátor exprese proteáz (*clgR*), faktor  $\sigma^B$  (Obr. 40A) či anti- $\sigma$  faktor  $\sigma^E$  (*cseE*) (Busche *et al.*, 2023; Dostálová *et al.*, 2017; Šilar *et al.*, 2016). Celkově je množství  $\sigma^E$ -dependentních promotorů ve srovnání se  $\sigma^H$ -dependentními promotory *C. glutamicum* malé a pokud se takový promotor podařilo nalézt, zatím vždy bylo zjištěno, že je jak  $\sigma^E$ -, tak i  $\sigma^H$ -dependentní. Predikci komplikuje i velmi podobná či totožná konsenzuální sekvence pro oblasti -35 a -10 promotoru. V publikaci naší laboratoře vzešlé ze spolupráce s pracovištěm na Univerzitě v Bielefeldu se díky podrobné analýze aktivity promotorů *in vivo/in vitro* a použití homologního modelování se simulací molekulární dynamiky podařilo odlišit konsenzuální sekvence pro  $\sigma^H$ -dependentní a  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotory (Busche *et al.*, 2023). Z odlišených konsenzuálních sekvencí pro klíčové oblasti  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotorů (GGAAC-N<sub>16-19</sub>-GTT) a  $\sigma^H$ -dependentních promotorů (gGGAAat-N<sub>16-19</sub>-GTT) jsme vycházeli při analýze překryvu rekogniční specifity u *R. erythropolis*.



**Obrázek 40.** Regulace exprese genu *C. glutamicum* a *R. erythropolis* pomocí jednoho promotoru, pro který vykazují dva ECF faktory překryv rekogniční specifity A) gen *sigB* *C. glutamicum* B) gen *O5Y\_RS11800* *R. erythropolis*. Černou šipkou je zvýrazněn začátek translace. Černá čára znázorňuje oblast před translatovanou oblastí. Promotory jsou znázorněny bílou šipkou a nad šipkou jsou umístěny faktory  $\sigma^E$  (modře) a  $\sigma^H$  (červeně) vykazující překryv rekogniční specifity.

Z výsledků (kapitoly 5.2.2 a 5.2.3) je jasné, že překryvy rekogniční specifity pro  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotory *R. erythropolis* jsou daleko častějším jevem, než je tomu u *C. glutamicum*. Ukazuje se totiž, že v případě *R. erythropolis* je daleko těžší najít čistě  $\sigma^H$ -dependentní promotor (v této práci pouze promotory P2sigH, P1RS06830<sub>R.e.</sub> a P1RS07285<sub>R.e.</sub>) než  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotory. Při *in vivo* analýze se nejvíce striktnímu  $\sigma^E$ -dependentnímu promotoru přibližoval promotor P1sigB<sub>R.e.</sub> (Obr. 24A), u něhož se ale při analýze transkripce *in vitro* ukázalo, že i tento promotor může být za určitých podmínek  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní (Obr. 25A). Promotor téhož genu (PsigB<sub>C.g.</sub>) *C. glutamicum* byl  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní jak podle *in vivo*, tak *in vitro* analýz (Dostálová *et al.*, 2017). Je třeba si uvědomit, že oba systémy pro stanovení aktivity promotorů *R. erythropolis* *in vivo* a *in vitro* jsou heterologní (jádro RNAP je z *C. glutamicum*) a drobné rozdíly mohou způsobit poněkud odlišné interakce, než by nastaly v homologním systému *R. erythropolis*. Pokud porovnáme sekvence veškerých promotorů *R. erythropolis* CCM2595, u kterých jsme v této práci prokázali překryv rekogničních specifit faktorů  $\sigma^H/\sigma^E$ , vyjdou nám konsenzuální sekvence pro oblast -35 GGAAc a pro oblast -10 GTT, tedy velmi podobné těm u *C. glutamicum* (Busche *et al.*, 2023). Pokud bychom přihlíželi k promotorům, které byly rozpoznány faktory  $\sigma^H$ , ale interakce se  $\sigma^E$  nebyla vyloučena, tak konsenzuální sekvence pro oblast -35 je GGAA<sup>C/A</sup> a pro oblast -10 je GTT. Tyto sekvence jsou tedy velmi podobné těm u *C. glutamicum* a poukazují na vysokou konzervovanost ECF faktorů  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$ , a tedy i jimi rozpoznávaných promotorů.

Úloha faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  *C. glutamicum* spočívá v expresi genů uplatňujících se během odpovědi na oxidativní, teplotní nebo povrchový stres (Park *et al.*, 2008; Ehira *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005). Podle přehledu genů, které byly indukovány nadprodukcí faktoru  $\sigma^H$  v bakteriálním kmenu *R. erythropolis* CCM2595 a u kterých jsme byli schopni identifikovat  $\sigma^H$ - nebo  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentní promotory (Tab. 22), můžeme předpokládat stejnou úlohu faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  u *R. erythropolis* jako u *C. glutamicum*. Geny *C. glutamicum* a *R. erythropolis*, jejichž promotory vykazovaly překryv rekogniční specifity faktorů  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$ , jsou často chaperony, regulátory exprese genů pro proteázy (Šilar *et al.*, 2016) či oxidoreduktázy (tato práce). Jedná se tedy o geny, které se mohou uplatňovat během povrchového, oxidativního i teplotního stresu.

Pokud naše experimentálně získaná data dáme do souvislosti s biotechnologickým a antistresovým potenciálem rhodokoků, zjistíme, že námi sledované překryvy regulonů mohou být účinným mechanismem adaptace buňky na stresovou odpověď. U bakterií rodu *Rhodococcus* byl během stresových situací pozorován jev, kterému se říká zkřížená ochrana (*crossprotection*) (Pátek *et al.*, 2021). Jedná se o situaci, kdy řada stresů vzájemně ovlivňuje různé stresové odpovědi a buňka reaguje prostřednictvím mechanismů, které jí po vyvolání určitého stresu chrání i před důsledky dalších stresů. Příkladem je mechanismus adaptace buněk *R. opacus* na vysychání, která mu umožní reagovat i na osmotický stres a hladovění (Alvarez *et al.*, 2004). Navíc se ukazuje, že známé stresory u rhodokoků, ať už je to teplotní šok (Ekpanyaskun, 2006), toxické kovy (Cappelletti *et al.*, 2016), chladový šok (Raymond-Bouchard *et al.*, 2018) či organické látky (De Carvalho, 2010), vyvolávají v konečném důsledku oxidativní stres a s ním spojenou příslušnou odpověď (Pátek *et al.*, 2021). V této disertační práci bylo také zjištěno, že mezi geny, které byly nadexprimovány během kultivace kmene *R. opacus* PD630 v přítomnosti telluričitanu draselného, byly nalezeny geny, jejichž produkty (aldo/ketoreduktáza, superoxidodismutáza či dithiol-disulfidizomeráza) se účastní odpovědi na oxidativní stres. Měřením aktivity promotorů těchto genů *in vivo* (Obr. 30) se i potvrdilo, že spadají do  $\sigma^H$ -regulonů, pro který je typická odpověď na oxidativní a teplotní stres. Všechny tyto informace ukazují, že pokud dochází u bakterií ke kombinovaným stresům (např. v kontaminovaných prostředích, vlivem stresu osmotického, teplotního a stresu při změně pH či vlivem toxických organických a anorganických látek), potom v důsledku dochází i k překryvu funkcí stresových regulonů, a to zejména u regulonů  $\sigma$  faktorů, které se účastní odpovědi na oxidativní, teplotní či povrchový stres a chemostres. Protože se bakterie rodů *Corynebacterium* a *Rhodococcus* během biotechnologických procesů často dostávají do stresových podmínek, je pravděpodobné, že bude i nadále růst zájem o praktické využití ochrany před stresem a budou přibývat poznatky týkající se překryvu jejich stresových regulonů.

# 7 Souhrn

- Tématem práce je regulace transkripce u bakterií rodů *Corynebacterium* a *Rhodococcus* prostřednictvím sigma ( $\sigma$ ) faktorů RNA polymerázy při odpovědích na různé stresové podmínky.
- V centru zájmu byly skupiny genů (regulony) řízené  $\sigma$  faktory stresových odpovědí (ECF) a jejich koordinovaná exprese. Odhalili jsme komplikovanou regulaci, při níž se dva či více  $\sigma$  faktorů účastní transkripce stejných skupin genů. Překryv (*overlap*)  $\sigma$  regulonů je způsoben přítomností dvou nebo více promotorů, které iniciují transkripci téhož genu, nebo promotorem, který je rozeznáván dvěma a více  $\sigma$  faktory. Tato promiskuita promotorů závisí na rekogniční specifitě  $\sigma$  faktorů.
- Využívali jsme metody globální analýzy (sekvenování transkriptomu), testování transkripce a funkce jednotlivých genů a jejich promotorů (metody *in vivo* s využitím plazmidových konstruktů a *in vitro* transkripce), cílené mutagenese a počítačové analýzy (*in silico*; homologní modelování a simulace molekulární dynamiky).
- Výsledky u *Corynebacterium glutamicum*:
  - 1) Popsali jsme překryv regulonů faktorů  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  u *C. glutamicum* a zjistili jeho příčiny. Identifikovali jsme klíčové interakce aminokyselina-nukleotid faktorů  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  s oblastí -35 promotorů.
  - 2) Definovali jsme překryv  $\sigma^H$ -  $\sigma^E$ - a  $\sigma^M$ -regulonů *C. glutamicum*. Mutagenézí jsme potvrdili konsenzuální sekvenci  $\sigma^M$ -dependentních promotorů. Postupy *in silico* jsme identifikovali rozdíly v interakcích  $\sigma^H$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^M$  s promotory na úrovni aminokyselina-nukleotid.
- Výsledky u *Rhodococcus erythropolis* a *Rhodococcus opacus*:
  - 1) Nalezli jsme  $\sigma^D$ -,  $\sigma^E$ - a  $\sigma^H$ -dependentní promotory a geny *R. erythropolis*. Určili jsme konsenzuální sekvence  $\sigma^D$ -,  $\sigma^H$ -,  $\sigma^H/\sigma^E$ -dependentních promotorů *R. opacus* a *R. erythropolis*.
  - 2) Na základě analyzovaných promotorů a genů jsme našli funkce faktorů  $\sigma^D$  při stresových odpovědích (integrita buněčné stěny) a  $\sigma^H/\sigma^E$  při odpovědi na oxidativní a teplotní stres u *R. erythropolis* a *R. opacus*.
  - 3) Prokázali jsme úlohu faktorů  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$  a  $\sigma^H$  během odpovědi na stres vyvolaný telluričitanem draselným.
  - 4) S využitím mutagenese jsme našli zřejmý překryv regulonů  $\sigma^H/\sigma^E$  u *R. erythropolis*.
  - 5) Získali jsme ucelenou představu o základní regulační síti  $\sigma$  faktorů *R. erythropolis* a porovnali jí s regulační sítí *C. glutamicum*.



## 8 Seznam citované literatury

- Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., Gross, C.A., 1999. The *Escherichia coli*  $\sigma^E$ -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- $\sigma$  factor. *Genes Dev.* 13, 2449–2461.
- Adham, S.A., Honrubia, P., Díaz, M., Fernández-Abalos, J.M., Santamaría, R.I., Gil, J.A., 2001. Expression of the genes coding for the xylanase Xys1 and the cellulase Cel1 from the straw-decomposing *Streptomyces halstedii* JM8 cloned into the amino-acid producer *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. *Arch. Microbiol.* 177, 91–97.
- Aggarwal, R.K., Dawar, C., Phanindranath, R., Mutnuri, L., Dayal, A.M., 2016. Draft genome sequence of a versatile hydrocarbon-degrading bacterium, *Rhodococcus pyridinivorans* Strain KG-16, collected from oil fields in India. *Genome Announc.* 4, e01704-e01715.
- Albersmeier, A., Pfeifer-Sancar, K., Rückert, C., Kalinowski, J., 2017. Genome-wide determination of transcription start sites reveals new insights into promoter structures in the actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 257, 99–109.
- Alvarez, H.M., Silva, R.A., Cesari, A.C., Zamit, A.L., Peressutti, S.R., Reichelt, R., Keller, U., Malkus, U., Rasch, C., Maskow, T., Mayer, F., Steinbüchel, A., 2004. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50, 75–86.
- Alvarez-Martinez, C.E., Lourenço, R.F., Baldini, R.L., Laub, M.T., Gomes, S.L., 2007. The ECF sigma factor  $\sigma^T$  is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 66, 1240–1255.
- An, S.J., Yim, S.S., Jeong, K.J., 2013. Development of a secretion system for the production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using the Porin B signal peptide. *Protein Expr. Purif.* 89, 251–257.
- Aristoff, P.A., Garcia, G.A., Kirchhoff, P.D., Showalter, H.D., 2010. Rifamycins - Obstacles and opportunities. *Tuberculosis (Edinb.)* 90, 94–118.
- Bahl, H., Scholz, H., Bayan, N., Chami, M., Leblon, G., Gulik-Krzywicki, T., Shechter, E., Fouet, A., Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M., Conway de Macario, E., Macario, A.J., Fernández-Herrero, L.A., Olabarría, G., Berenguer, J., Blaser, M.J., Kuen, B., Lubitz, W., Sára, M., Pouwels, P.H., Kolen, C.P., Boot, H.J., Resch, S., 1997. Molecular biology of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 47–98.
- Barne, K.A., Bown, J.A., Busby, S.J., Minchin, S.D., 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J.* 16, 4034–4040.
- Barreiro, C., González-Lavado, E., Pátek, M., Martín, J.-F., 2013. Transcriptional analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *J. Bacteriol.* 195, 2706.
- Bayan, N., Houssin, C., Chami, M., Leblon, G., 2003. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.* 104, 55–67.

- Becker, J., Schäfer, R., Kohlstedt, M., Harder, B.J., Borchert, N.S., Stöveken, N., Bremer, E., Wittmann, C., 2013. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microb. Cell Fact.* 12, 110.
- Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., Wittmann, C., 2011. From zero to hero: design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab. Eng.* 13, 159–168.
- Bej, A.K., Saul, D., Aislabie, J., 2000. Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. *Polar Biol.* 23, 100–105.
- Ben-Dov, E., Ben Yosef, D.Z., Pavlov, V., Kushmaro, A., 2009. *Corynebacterium maris* sp. nov., a marine bacterium isolated from the mucus of the coral *Fungia granulosa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2458–2463.
- Bequer Urbano, S., Albarracín, V.H., Ordoñez, O.F., Farías, M.E., Alvarez, H.M., 2013. Lipid storage in high-altitude Andean Lakes extremophiles and its mobilization under stress conditions in *Rhodococcus* sp. A5, a UV-resistant actinobacterium. *Extremophiles* 17, 217–227.
- Billman-Jacobe, H., Hodgson, A.L., Lightowers, M., Wood, P.R., Radford, A.J., 1994. Expression of ovine gamma interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1641–1645.
- Binder, S.C., Eckweiler, D., Schulz, S., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Häussler, S., Meyer-Hermann, M., 2016. Functional modules of sigma factor regulons guarantee adaptability and evolvability. *Sci. Rep.* 6, 22212.
- Blumenstein, J., 2019. Hybridní faktory sigma RNA polymerasy u *Corynebacterium glutamicum*. Praha, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, *Katedra genetiky a mikrobiologie*.
- Bott, M., Brocker, M., 2012. Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: on the way towards stimuli and targets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1131–1150.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M., Dixon, R., 1986. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* 320, 374–378.
- Bush, M., Dixon, R., 2012. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of  $\sigma^{54}$ -dependent transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 497–529.
- Busche, T., Dostálová, H., Rucká, L., Holátko, J., Barvík, I., Štěpánek, V., Pátek, M., Kalinowski, J., 2023. Overlapping SigH and SigE sigma factor regulons in *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Microbiol.* 13, 1059649.

- Busche, T., Šilar, R., Pičmanová, M., Pátek, M., Kalinowski, J., 2012. Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* 13, 445.
- Calamita, H., Ko, C., Tyagi, S., Yoshimatsu, T., Morrison, N.E., Bishai, W.R., 2005. The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. *Cell Microbiol.* 7, 233–244.
- Campbell, E.A., Greenwell, R., Anthony, J.R., Wang, S., Lim, L., Das, K., Sofia, H.J., Donohue, T.J., Darst, S.A., 2007. A conserved structural module regulates transcriptional responses to diverse stress signals in bacteria. *Mol. Cell* 27, 793–805.
- Campbell, E.A., Tupy, J.L., Gruber, T.M., Wang, S., Sharp, M.M., Gross, C.A., Darst, S.A., 2003. Crystal structure of *Escherichia coli*  $\sigma^E$  with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol. Cell* 11, 1067–1078.
- Cappelletti, M., Fedi, S., Zampolli, J., Di Canito, A., D'Ursi, P., Orro, A., Viti, C., Milanesi, L., Zannoni, D., Di Gennaro, P., 2016. Phenotype microarray analysis may unravel genetic determinants of the stress response by *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 and *Rhodococcus opacus* R7. *Res. Microbiol.* 167, 766–773.
- Collins, M.D., Burton, R.A., Jones, D., 1988. *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 349–352.
- Collins, M.D., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1982. A Survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and Related Taxa. *J. Gen. Microbiol.* 128, 129–149.
- Costales, J., Alsyuf, M., Napolitan, P., Wang, S., Hu, B., 2019. *Corynebacterium urealyticum*: rare urinary tract infection with serious complications. *Can. J. Urol.* 26, 9680–9682.
- Cuthbertson, L., Nodwell, J.R., 2013. The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 440–475.
- Daffé, M., Draper, P., 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131–203.
- Dainese, E., Rodrigue, S., Delogu, G., Provvedi, R., Laflamme, L., Brzezinski, R., Fadda, G., Smith, I., Gaudreau, L., Palù, G., Manganeli, R., 2006. Posttranslational regulation of *Mycobacterium tuberculosis* extracytoplasmic-function sigma factor  $\sigma^L$  and roles in virulence and in global regulation of gene expression. *Infect. Immun.* 74, 2457–2461.
- Date, M., Itaya, H., Matsui, H., Kikuchi, Y., 2006. Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 66–70.

- Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., Matsui, H., Kikuchi, Y., 2003. Production of native-type *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3011–3014.
- Davis, M.W., Jorgensen, E.M., 2022. ApE, A Plasmid Editor: a freely available DNA manipulation and visualization program. *Front. Bioinform.* 2, 818619.
- De Carvalho, C.C.C.R., 2010. Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents. In: Alvarez, H (eds), *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs, Springer, Berlin, Heidelberg. 16, 109–131.
- De Carvalho, C.C.C.R., 2012. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. *Res. Microbiol.* 163, 125–136.
- De Carvalho, C.C.C.R., Da Fonseca, M.M.R., 2005a. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 715–726.
- De Carvalho, C.C.C.R., Da Fonseca, M.M.R., 2005b. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 389–399.
- De Hoon, M.J.L., Eichenberger, P., Vitkup, D., 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr. Biol.* 20, R735–R745.
- Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V., 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37, 201–218.
- Dostálová, H., 2020. Funkce stresových sigma faktorů RNA polymerasy SigD, SigE, SigH a SigM v transkripční regulační síti *Corynebacterium glutamicum*. Praha, Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, *Katedra genetiky a mikrobiologie*.
- Dostálová, H., Busche, T., Holátko, J., Rucká, L., Štěpánek, V., Barvík, I., Nešvera, J., Kalinowski, J., Pátek, M., 2019. Overlap of promoter recognition specificity of stress response sigma factors SigD and SigH in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Front. Microbiol.* 9, 3287.
- Dostálová, H., Holátko, J., Busche, T., Rucká, L., Rapoport, A., Halada, P., Nešvera, J., Kalinowski, J., Pátek, M., 2017. Assignment of sigma factors of RNA polymerase to promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express* 7, 133.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H., 2009. Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *J. Bacteriol.* 191, 2964–2972.
- Eikmanns, B.J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M., Sahm, H., 1991. Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 617–622.
- Ekpanyaskun, P., 2006. Transcriptomic analysis of *Rhodococcus* sp. RHA1 responses to heat shock and osmotic stress. Vancouver, Diplomová práce, University of British Columbia.

- El Meouche, I., Peltier, J., Monot, M., Soutourina, O., Pestel-Caron, M., Dupuy, B., Pons, J.L., 2013. Characterization of the SigD regulon of *C. difficile* and its positive control of toxin production through the regulation of *tcdR*. PLoS ONE 8, e83748.
- Engels, S., Schweitzer, J.E., Ludwig, C., Bott, M., Schaffer, S., 2004. *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor  $\sigma^H$ . Mol. Microbiol. 52, 285–302.
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat. Rev. Microbiol. 1, 117–126.
- Fang, Ch., Li, L., Shen, L., Shi, J., Wang, S., Feng, Y., Zhang, Y., 2019. Structures and mechanism of transcription initiation by bacterial ECF factors. Nucleic Acids Res. 47, 7094–7104.
- Feklístov, A., Darst, S.A., 2011. Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase  $\sigma$  subunit. Cell 147, 1257–1269.
- Feklístov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., Gross, C.A., 2014. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. Annu. Rev. Microbiol. 68, 357–376.
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Sauer, R.T., Baker, T.A., 2004. Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. Genes Dev. 18, 2292–2301.
- Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., Hiraishi, A., Yamanaka, S., 2002. *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1127–1131.
- Gaballa, A., Guariglia-Oropeza, V., Dürr, F., Butcher, B.G., Chen, A.Y., Chandrangsu, P., Helmann, J.D., 2018. Modulation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factor promoter selectivity by spacer region sequence. Nucleic Acids Res. 46, 134–145.
- Guariglia-Oropeza, V., Helmann, J.D., 2011. *Bacillus subtilis*  $\sigma^V$  confers lysozyme resistance by activation of two cell wall modification pathways, peptidoglycan O-acetylation and D-alanylation of teichoic acids. J. Bacteriol. 193, 6223–6232.
- Hacker, E., Antunes, C.A., Mattos-Guaraldi, A.L., Burkovski, A., Tauch, A., 2016. *Corynebacterium ulcerans*, an emerging human pathogen. Future Microbiol. 11, 1191–1208.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557–580.
- Hasegawa, S., Suda, M., Uematsu, K., Natsuma, Y., Hiraga, K., Jojima, T., Inui, M., Yukawa, H., 2013. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1250–1257.
- Haugen, S.P., Berkmen, M.B., Ross, W., Gaal, T., Ward, Ch., Gourse, R.L., 2006. rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of  $\sigma$  region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. Cell 125, 1069–1082.

- Hecker, M., Pané-Farré, J., Völker, U., 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 215–236.
- Henson, W.R., Hsu, F.F., Dantas, G., Moon, T.S., Foston, M., 2018. Lipid metabolism of phenol-tolerant *Rhodococcus opacus* strains for lignin bioconversion. *Biotechnol. Biofuels* 11, 339.
- Hiratsu, K., Amemura, M., Nashimoto, H., Shinagawa, H., Makino, K., 1995. The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes  $\sigma^E$ , is essential for bacterial growth at high temperature. *J. Bacteriol.* 177, 2918–2922.
- Holátko, J., Šilar, R., Rabatinová, A., Šanderová, H., Halada, P., Nešvera, J., Krásný, L., Pátek, M., 2012. Construction of *in vitro* transcription system for *Corynebacterium glutamicum* and its use in the recognition of promoters of different classes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 521–529.
- Holbourn, K.P., Shone, C.C., Acharya, K.R., 2006. A family of killer toxins. *FEBS J.* 273, 4579–4593.
- Homerová, D., Bischoff, M., Dumolin, A., Kormanec, J., 2004. Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor  $\sigma^B$ . *FEMS Microbiol. Lett.* 232, 173–179.
- Homerová, D., Surdová, K., Kormanec, J., 2004. Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing *Mycobacterium tuberculosis* stress response sigma factor,  $\sigma^F$ . *Folia Microbiol. (Praha)* 49, 685–691.
- Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O., Kato, I., 1968. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 243, 3553–3555.
- Hu, Y., Kendall, S., Stoker, N.G., Coates, A.R.M., 2004. The *Mycobacterium tuberculosis sigJ* gene controls sensitivity of the bacterium to hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 415–423.
- Hui, J., Gordon, N., Kajioka, R., 1977. Permeability Barrier to Rifampin in Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 773–779.
- Hünnefeld, M., Persicke, M., Kalinowski, J., Frunzke, J., 2019. The MarR-type regulator MalR is involved in stress-responsive cell envelope remodeling in *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Microbiol.* 10, 1039.
- Hünnefeld, M., Viets, U., Sharma, V., Wirtz, A., Hardy, A., Frunzke, J., 2021. Genome sequence of the bacteriophage CL31 and interaction with the host strain *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Viruses* 13, 495.

- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Palmer, M.E., Bergholz, T.M., Orsi, R.H., Hu, Y., Ollinger, J., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2011. Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative sigma factors  $\sigma^B$ ,  $\sigma^C$ ,  $\sigma^H$ , and  $\sigma^L$  in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 187–200.
- Chen, Ch.L., Pan, T.Y., Kan, S.Ch., Kuan, Y.Ch., Hong, L.Y., Chiu, K.R., Sheu, Ch.S., Yang, J.S., Hsu, W.H., Hu, H.Y., 2008. Genome sequence of the lytic bacteriophage P1201 from *Corynebacterium glutamicum* NCHU 87078: evolutionary relationships to phages from *Corynebacterineae*. *Virology* 378, 226–232.
- Chen, H.H., Li, W.J., Tang, S.K., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Xu, L.H., Jiang, Ch.L., 2004. *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 779–782.
- Chen, X., Zhao, X., Chen, L., Zeng, W., Xu, H., 2015. Vaginitis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a prepubescent girl. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 28, e165–e167.
- Cho, B.K., Kim, D., Knight, E.M., Zengler, K., Palsson, B.O., 2014. Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: topology and functional states. *BMC Biol.* 12, 4.
- Ikeda, M., Katsumata, R., 1999. Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2497–2502.
- Ikeda, M., Katsumata, R., 1992. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 781–785.
- Jackson, M., Raynaud, C., Lanéelle, M.A., Guilhot, C., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Gicquel, B., Daffé, M., 1999. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol. Microbiol.* 31, 1573–1587.
- Jarlier, V., Gutmann, L., Nikaido, H., 1991. Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1937–1939.
- Jarlier, V., Nikaido, H., 1990. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* 172, 1418–1423.
- Jensen, J.V.K., Wendisch, V.F., 2013. Ornithine cyclodeaminase-based proline production by *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Fact.* 12, 63.
- Jojima, T., Fujii, M., Mori, E., Inui, M., Yukawa, H., 2010. Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 159–165.

- Jojima, T., Noburyu, R., Sasaki, M., Tajima, T., Suda, M., Yukawa, H., Inui, M., 2015. Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1165–1172.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., Tauch, A., 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104, 5–25.
- Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T., Furuya, A., 1984. Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 159, 306–311.
- Kelle, R., Hermann, T., Weuster-Botz, D., Eggeling, L., Krämer, R., Wandrey, C., 1996. Glucose-controlled L-isoleucine fed-batch production with recombinant strains of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 50, 123–136.
- Keller, A.N., Yang, X., Wiedermannová, J., Delumeau, O., Krásný, L., Lewis, P.J., 2014.  $\epsilon$ , a new subunit of RNA polymerase found in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 196, 3622–3632.
- Khairy, H., Meinert, C., Wübbeler, J.H., Poehlein, A., Daniel, R., Voigt, B., Riedel, K., Steinbüchel, A., 2016. Genome and proteome analysis of *Rhodococcus erythropolis* MI2: elucidation of the 4,4'-dithiodibutyric acid catabolism. *PLoS One* 11, e0167539.
- Kim, T.H., Kim, H.J., Park, J.S., Kim, Y., Kim, P., Lee, H.S., 2005. Functional analysis of *sigH* expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1542–1547.
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M., 1957. Studies on the amino acid fermentation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3, 193–205.
- Kirchner, O., Tauch, A., 2003. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 287–299.
- Kita, A., Takiguchi, N., Kato, J., 2009. Cloning and Characterization of *sigA* and *sigB* Genes from *Rhodococcus opacus* strain B4: involvement of *sigB* in organic solvent tolerance. *J. Environ. Biotechnol.* 9, 43-50.
- Knoppová, M., Phensajai, M., Veselý, M., Zemanová, M., Nešvera, J., Pátek, M., 2007. Plasmid vectors for testing *in vivo* promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. *Curr. Microbiol.* 55, 234–239.
- Knox, K.L., Holmes, A.H., 2002. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 97–99.



- Kolomytseva, M.P., Solianikova, I.P., Golovlev, E.L., Golovleva, L.A., 2005. Heterogeneity of *Rhodococcus opacus* 1CP as a response to stress induced by chlorophenols. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 41, 474–479.
- Koptides, M., Barák, I., Šišová, M., Baloghová, E., Ugorčáková, J., Timko, J., 1992. Characterization of bacteriophage BFK20 from *Brevibacterium flavum*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1387–1391.
- Křenková, L., 2023. Konstrukce a charakterizace rekombinantních systémů pro analýzu stresové odpovědi u rhodokoků degradujících polutanty. Praha, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, *Katedra genetiky a mikrobiologie*.
- Krug, A., Wendisch, V.F., Bott, M., 2005. Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene *acn* in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 280, 585–595.
- Lane, W.J., Darst, S.A., 2006. The structural basis for promoter -35 element recognition by the group IV  $\sigma$  factors. *PLoS Biol.* 4, e269.
- Larisch, Ch., Nakunst, D., Hüser, A.T., Tauch, A., Kalinowski, J., 2007. The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Genomics* 8, 4.
- LeBlanc, J.C., Gonçalves, E.R., Mohn, W.W., 2008. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2627–2636.
- Lee, J., Borukhov, S., 2016. Bacterial RNA polymerase-DNA interaction-the driving force of gene expression and the target for drug action. *Front. Mol. Biosci.* 3, 73.
- Li, W., Bottrill, A.R., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Paget, M.S.B., Kleanthous, C., 2003. The role of zinc in the disulphide stress-regulated anti-sigma factor RsrA from *Streptomyces coelicolor*. *J. Mol. Biol.* 333, 461–472.
- Li, X., He, Y., Zhang, L., Xu, Z., Ben, H., Gaffrey, M.J., Yang, Y., Yang, S., Yuan, J.S., Qian, W.J., Yang, B., 2019. Discovery of potential pathways for biological conversion of poplar wood into lipids by co-fermentation of *Rhodococci* strains. *Biotechnol. Biofuels* 12, 60.
- Lin, Z., Wang, F., Shang, Z., Lin, W., 2021. Biochemical and structural analyses reveal critical residues in  $\delta$  subunit affecting its bindings to  $\beta'$  subunit of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 545, 98–104.
- Liu, Q., Ouyang, S.-P., Kim, J., Chen, G.-Q., 2007. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 132, 273–279.
- Lo, S., Thiam, I., Fall, B., Ba-Diallo, A., Diallo, O.F., Diagne, R., Dia, M.L., Ka, R., Sarr, A.M., Sow, A.I., 2015. Urinary tract infection with *Corynebacterium aurimucosum* after urethroplasty stricture of the urethra: a case report. *J. Med. Case Rep.* 9, 156.

- Lobanova, J.S., Gak, E.R., Andreeva, I.G., Rybak, K.V., Krylov, A.A., Mashko, S.V., 2017. Complete nucleotide sequence and annotation of the temperate corynephage  $\phi$ 16 genome.
- Luo, Y., Helmann, J.D., 2009. Extracytoplasmic function  $\sigma$  factors with overlapping promoter specificity regulate sublancin production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191, 4951–4958.
- Luong, T.M., Ponamoreva, O.N., Nechaeva, I.A., Petrikov, K.V., Delegan, Y.A., Surin, A.K., Linklater, D., Filonov, A.E., 2018. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 20.
- Maeda, M., Chung, S.Y., Song, E., Kudo, T., 1995. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 549–555.
- Maillard, A.P., Girard, E., Ziani, W., Petit-Härtlein, I., Kahn, R., Covès, J., 2014. The crystal structure of the anti- $\sigma$  factor CnrY in complex with the  $\sigma$  factor CnrH shows a new structural class of anti- $\sigma$  factors targeting extracytoplasmic function  $\sigma$  factors. *J. Mol. Biol.* 426, 2313–2327.
- Manganelli, R., Voskuil, M.I., Schoolnik, G.K., Dubnau, E., Gomez, M., Smith, I., 2002. Role of the extracytoplasmic-function  $\sigma$  factor  $\sigma^H$  in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol. Microbiol.* 45, 365–374.
- Manganelli, R., Voskuil, M.I., Schoolnik, G.K., Smith, I., 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor  $\sigma^E$ : role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol. Microbiol.* 41, 423–437.
- Márquez-Magaña, L.M., Chamberlin, M.J., 1994. Characterization of the sigD transcription unit of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 2427–2434.
- Martínková, L., Pátek, M., Veselá, A.B., Kaplan, O., Uhnáková, B., Nešvera, J., 2010. Catabolism of nitriles in *Rhodococcus*, in: Alvarez, H. (Ed.), *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs, Springer, Berlin, Heidelberg. 16, 171–206.
- Matsumoto, K., Kitagawa, K., Jo, S.J., Song, Y., Taguchi, S., 2011. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor. *J. Biotechnol.* 152, 144–146.
- Mentz, A., Neshat, A., Pfeifer-Sancar, K., Pühler, A., Rückert, Ch., Kalinowski, J., 2013. Comprehensive discovery and characterization of small RNAs in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics* 14, 714.
- Mitchell, J.E., Zheng, D., Busby, S.J.W., Minchin, S.D., 2003. Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 31, 4689–4695.
- Mizukami, T., Hamu, A., Ikeda, M., Oka, T., Katsumata, R., 1994. Cloning of the ATP phosphoribosyl transferase gene of *Corynebacterium glutamicum* and application of the gene to L-histidine production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 635–638.

- Moore, L.S.P., Leslie, A., Meltzer, M., Sandison, A., Efstratiou, A., Sriskandan, S., 2015. *Corynebacterium ulcerans* cutaneous diphtheria. *Lancet Infect. Dis.* 15, 1100–1107.
- Morosov, X., Davoudi, C.F., Baumgart, M., Brocker, M., Bott, M., 2018. The copper-deprivation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* comprises proteins for biogenesis of the actinobacterial cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* supercomplex. *J. Biol. Chem.* 293, 15628–15640.
- Nakayama, K., Tanaka, H., Hagino, H., Kinoshita, S., 1966. Studies on lysine fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 30, 611–616.
- Nakunst, D., Larisch, Ch., Hüser, A.T., Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J., 2007. The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J. Bacteriol.* 189, 4696–4707.
- Nešvera, J., Pátek, M., Hochmannová, J., Abbrámová, Z., Bečvářová, V., Jelínková, M., Vohradský, J., 1997. Plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum* codes for a gene product that positively influences plasmid copy number. *J. Bacteriol.* 179, 1525–1532.
- Nishio, Y., Nakamura, Y., Kawarabayasi, Y., Usuda, Y., Kimura, E., Sugimoto, S., Matsui, K., Yamagishi, A., Kikuchi, H., Ikeo, K., Gojobori, T., 2003. Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.* 13, 1572–1579.
- Nunheimer, T.D., Birnbaum, J., Ihnen, E.D., Demain, A.L., 1970. Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* 20, 215–217.
- Oguiza, J.A., Marcos, A.T., Martín, J.F., 1997. Transcriptional analysis of the *sigA* and *sigB* genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 111–117.
- Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M., Yukawa, H., 2008. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 449–454.
- Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J.A., Mateos, L.M., 2005. Analysis of Genes Involved in Arsenic Resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6206–6215.
- Osman, D., Cavet, J.S., 2010. Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR–SmtB family repressors. *Nat. Prod. Rep.* 27, 668–680.
- Otsuka, Y., Kawamura, Y., Koyama, T., Iihara, H., Ohkusu, K., Ezaki, T., 2005. *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium Isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3713–3717.
- Paget, M.S.B., 2015. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules* 5, 1245–1265.

- Paget, M.S.B., Kang, J.G., Roe, J.H., Buttner, M.J., 1998.  $\sigma^R$ , an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* 17, 5776–5782.
- Paget, M.S.B., Helmann, J.D., 2003. The  $\sigma^{70}$  family of sigma factors. *Genome Biol.* 4, 203.
- Paradis, F.W., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., Miller, R.C., 1987. The expression of *Cellulomonas fimi* cellulase genes in *Brevibacterium lactofermentum*. *Gene* 61, 199–206.
- Parise, M.T.D., Parise, D., Aburjaile, F.F., Pinto Gomide, A.C., Kato, R.B., Raden, M., Backofen, R., Azevedo, V.A. de C., Baumbach, J., 2021. An integrated database of small RNAs and their interplay with transcriptional gene regulatory networks in *Corynebacteria*. *Front. Microbiol.* 12, 656435.
- Park, S.D., Lee, J.Y., Sim, S.Y., Kim, Y., Lee, H.S., 2007. Characteristics of methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Metab. Eng.* 9, 327–336.
- Park, S.D., Youn, J.W., Kim, Y.J., Lee, S.M., Kim, Y., Lee, H.S., 2008. *Corynebacterium glutamicum*  $\sigma^E$  is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti- $\sigma$  factor CseE. *Microbiology (Reading)* 154, 915–923.
- Park, S.H., Kim, H.U., Kim, T.Y., Park, J.S., Kim, S.S., Lee, S.Y., 2014. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nat. Commun.* 5, 4618.
- Pátek, M., Grulich, M., Nešvera, J., 2021. Stress response in *Rhodococcus* strains. *Biotechnol. Adv.* 53, 107698.
- Patrauchan, M.A., Miyazawa, D., LeBlanc, J.C., Aiga, C., Florizone, Ch., Dosanjh, M., Davies, J., Eltis, L.D., Mohn, W.W., 2012. Proteomic analysis of survival of *Rhodococcus jostii* RHA1 during carbon starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6714–6725.
- Pei, H.H., Hilal, T., Chen, Z.A., Huang, Y.H., Gao, Y., Said, N., Loll, B., Rappsilber, J., Belogurov, G.A., Artsimovitch, I., Wahl, M.C., 2020. The  $\delta$  subunit and NTPase HelD institute a two-pronged mechanism for RNA polymerase recycling. *Nat. Commun.* 11, 6418.
- Pertry, I., Václavíková, K., Gemrotová, M., Spíchal, L., Galuszka, P., Depuydt, S., Temmerman, W., Stes, E., De Keyser, A., Riefler, M., Biondi, S., Novák, O., Schmülling, T., Strnad, M., Tarkowski, P., Holsters, M., Vereecke, D., 2010. *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1164–1174.
- Pfeifer-Sancar, K., Mentz, A., Rückert, C., Kalinowski, J., 2013. Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *BMC Genomics* 14, 888.

- Presentato, A., Piacenza, E., Anikovskiy, M., Cappelletti, M., Zannoni, D., Turner, R.J., 2016. *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 as cell factory for the production of intracellular tellurium nanorods under aerobic conditions. *Microb. Cell Fact.* 15, 204.
- Prieto, M.B., Hidalgo, A., Rodríguez-Fernández, C., Serra, J.L., Llama, M.J., 2002. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 853–859.
- Puech, V., Bayan, N., Salim, K., Leblon, G., Daffé, M., 2000. Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol. Microbiol.* 35, 1026–1041.
- Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W.R., Husson, R.N., 2001. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 183, 6119–6125.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., Tobes, R., 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 326–356.
- Raymond-Bouchard, I., Tremblay, J., Altshuler, I., Greer, Ch.W., Whyte, L.G., 2018. Comparative transcriptomics of cold growth and adaptive features of a eury- and steno-psychrophile. *Front. Microbiol.* 9, 1565.
- Rey, D.A., Nentwich, S.S., Koch, D.J., Rückert, Ch., Pühler, A., Tauch, A., Kalinowski, J., 2005. The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol. Microbiol.* 56, 871–887.
- Rezuchova, B., Kormanec, J., 2001. A two-plasmid system for identification of promoters recognized by RNA polymerase containing extracytoplasmic stress response  $\sigma^E$  in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods* 45, 103–111.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, Ch., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R.L., 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407–1413.
- Ross, W., Thompson, J.F., Newlands, J.T., Gourse, R.L., 1990. *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.* 9, 3733–3742.
- Röttig, A., Hauschild, P., Madkour, M.H., Al-Ansari, A.M., Almakishah, N.H., Steinbüchel, A., 2016. Analysis and optimization of triacylglycerol synthesis in novel oleaginous *Rhodococcus* and *Streptomyces* strains isolated from desert soil. *J. Biotechnol.* 225, 48–56.
- Ruff, E.F., Record, M.T., Artsimovitch, I., 2015. Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules* 5, 1035–1062.
- Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A.K., Singh, Y., 2010. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.* 277, 605–626.

- Salim, K., Haedens, V., Content, J., Leblon, G., Huygen, K., 1997. Heterologous expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding antigen 85A in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4392–4400.
- Santamaría, R., Gil, J.A., Mesas, J.M., Martín, J.F., 1984. Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology* 130, 2237–2246.
- Sára, M., Sleytr, U.B., 2000. S-Layer Proteins. *J. Bacteriol.* 182, 859–868.
- Serrano, M., Gao, J., Bota, J., Bate, A.R., Meisner, J., Eichenberger, P., Moran, Ch.P., Henriques, A.O., 2015. Dual-specificity anti-sigma factor reinforces control of cell-type specific gene expression in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genet.* 11, e1005104.
- Sharma, N.Ch., Efstratiou, A., Mokrousov, I., Mutreja, A., Das, B., Ramamurthy, T., 2019. Diphtheria. *Nat. Rev. Dis. Primers* 5, 81.
- Sharp, J.D., Singh, A.K., Park, S.T., Lyubetskaya, A., Peterson, M.W., Gomes, A.L.C., Potluri, L.P., Raman, S., Galagan, J.E., Husson, R.N., 2016. Comprehensive definition of the SigH regulon of *Mycobacterium tuberculosis* reveals transcriptional control of diverse stress responses. *PloS One* 11, e0152145.
- Shiio, I., Otsuka, S.I., Takahashi, M., 1962. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid: I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* 51, 56–62.
- Schmidt, P., Brandt, D., Busche, T., Kalinowski, J., 2023. Characterization of bacterial transcriptional regulatory networks in *Escherichia coli* through genome-wide *in vitro* run-off transcription/RNA-seq (ROSE). *Microorganisms* 11, 1388.
- Schneider, J.S., Sklar, J.G., Glickman, M.S., 2014. The Rip1 protease of *Mycobacterium tuberculosis* controls the SigD regulon. *J. Bacteriol.* 196, 2638–2645.
- Schröder, J., Tauch, A., 2010. Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 685–737.
- Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., Hornischer, K., Bruchmann, S., Düvel, J., Häussler, S., 2015. Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog.* 11, e1004744.
- Schwartz, E.C., Shekhtman, A., Dutta, K., Pratt, M.R., Cowburn, D., Darst, S., Muir, T.W., 2008. A full-length group 1 bacterial sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding. *Chem. Biol.* 15, 1091–1103.
- Siebert, D., Wendisch, V.F., 2015. Metabolic pathway engineering for production of 1,2-propanediol and 1-propanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Biofuels* 8, 91.

- Sklar, J.G., Makinoshima, H., Schneider, J.S., Glickman, M.S., 2010. *M. tuberculosis* intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates. *Mol. Microbiol.* 77, 605–617.
- Smith, M.D., Flickinger, J.L., Lineberger, D.W., Schmidt, B., 1986. Protoplast transformation in coryneform bacteria and introduction of an alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* into *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 634–639.
- Sorenson, M.K., Ray, S.S., Darst, S.A., 2004. Crystal structure of the flagellar  $\sigma$ /anti- $\sigma$  complex  $\sigma^{28}$ /FlgM reveals an intact  $\sigma$  factor in an inactive conformation. *Mol. Cell* 14, 127–138.
- Stäbler, N., Oikawa, T., Bott, M., Eggeling, L., 2011. *Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-amino acids. *J. Bacteriol.* 193, 1702–1709.
- Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., Mascher, T., 2009. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factor protein family. *Mol. Microbiol.* 74, 557–581.
- Strnad, H., Pátek, M., Fousek, J., Szököl, J., Ulbrich, P., Nešvera, J., Pačes, V., Viček, C., 2014. Genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* strain CCM2595, a phenol derivative-degrading bacterium. *Genome Announc.* 2, e00208-14.
- Su, X., Guo, L., Ding, L., Qu, K., Shen, Ch., 2016. Induction of viable but nonculturable state in *Rhodococcus* and transcriptome analysis using RNA-seq. *PLoS One* 11, e0147593.
- Sutherland, C., Murakami, K.S., 2018. An introduction to the structure and function of the catalytic core enzyme of *Escherichia coli* RNA Polymerase. *EcoSal Plus* 8, 10.
- Šilar, R., Holátko, J., Rucká, L., Rapoport, A., Dostálová, H., Kadeřábková, P., Nešvera, J., Pátek, M., 2016. Use of *in vitro* transcription system for analysis of *Corynebacterium glutamicum* promoters recognized by two sigma factors. *Curr. Microbiol.* 73, 401–408.
- Szököl, J., Rucká, L., Šimčíková, M., Halada, P., Nešvera, J., Pátek, M., 2014. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8267–8279.
- Takeda, H., Shimodaira, J., Yukawa, K., Hara, N., Kasai, D., Miyauchi, K., Masai, E., Fukuda, M., 2010. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Bacteriol.* 192, 4741–4751.
- Takinami, K., Yoshii, H., Tsurii, H., Okada, H., 1965. Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 29, 351–359.
- Taniguchi, H., Busche, T., Patschkowski, T., Niehaus, K., Pátek, M., Kalinowski, J., Wendisch, V.F., 2017. Physiological roles of sigma factor SigD in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol.* 17, 158.

- Taniguchi, H., Wendisch, V.F., 2015. Exploring the role of sigma factor gene expression on production by *Corynebacterium glutamicum*: sigma factor H and FMN as example. *Front. Microbiol.* 6, 740.
- Tauch, A., Götter, S., Pühler, A., Kalinowski, J., Thierbach, G., 2002. The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid* 48, 117–129.
- Tauch, A., Kaiser, O., Hain, T., Goesmann, A., Weisshaar, B., Albersmeier, A., Bekel, T., Bischoff, N., Brune, I., Chakraborty, T., Kalinowski, J., Meyer, F., Rupp, O., Schneiker, S., Viehoveer, P., Pühler, A., 2005. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* 187, 4671–4682.
- Teramoto, H., Watanabe, K., Suzuki, N., Inui, M., Yukawa, H., 2011. High yield secretion of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using its own Tat-type signal sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 677–687.
- Tomás-Gallardo, L., Santero, E., Floriano, B., 2012. Involvement of a putative cyclic amp receptor protein (CRP)-like binding sequence and a CRP-like protein in glucose-mediated catabolite repression of *thn* genes in *Rhodococcus sp.* strain TFB. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5460–5462.
- Toyoda, K., Inui, M., 2018. Extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma^D$  confers resistance to environmental stress by enhancing mycolate synthesis and modifying peptidoglycan structures in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 107, 312–329.
- Toyoda, K., Inui, M., 2016a. The extracytoplasmic function  $\sigma$  factor  $\sigma^C$  regulates expression of a branched quinol oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 100, 486–509.
- Toyoda, K., Inui, M., 2016b. Regulons of global transcription factors in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 45–60.
- Toyoda, K., Teramoto, H., Yukawa, H., Inui, M., 2015. Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma^H$  in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 197, 483–496.
- Trias, J., Benz, R., 1994. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 14, 283–290.
- Troxler, R.F., Zhang, F., Hu, J., Bogorad, L., 1994. Evidence that  $\sigma$  factors are components of chloroplast RNA polymerase. *Plant Physiol.* 104, 753–759.
- Ueki, T., Inouye, S., 1998. A new sigma factor, SigD, essential for stationary phase is also required for multicellular differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Genes Cells* 3, 371–385.



- Veeranagouda, Y., Lim, E.J., Kim, D.W., Kim, J.K., Cho, K., Heipieper, H.J., Lee, K., 2009. Formation of specialized aerial architectures by *Rhodococcus* during utilization of vaporized p-cresol. *Microbiology (Reading)* 155, 3788–3796.
- Veyrier, F., Saïd-Salim, B., Behr, M.A., 2008. Evolution of the Mycobacterial SigK Regulon. *J. Bacteriol.* 190, 1891–1899.
- Vogt, M., Haas, S., Klaffl, S., Polen, T., Eggeling, L., van Ooyen, J., Bott, M., 2014. Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction. *Metab. Eng.* 22, 40–52.
- Wada, M., Awano, N., Haisa, K., Takagi, H., Nakamori, S., 2002. Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 103–107.
- Wang, B., Hu, Q., Zhang, Yu, Shi, R., Chai, X., Liu, Z., Shang, X., Zhang, Yun, Wen, T., 2018. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Fact.* 17, 63.
- Weathers, T.S., Higgins, Ch.P., Sharp, J.O., 2015. Enhanced biofilm production by a toluene-degrading *Rhodococcus* observed after exposure to perfluoroalkyl acids. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5458–5466.
- Weiss, A., Ibarra, J.A., Paoletti, J., Carroll, R.K., Shaw, L.N., 2014. The  $\delta$  subunit of RNA polymerase guides promoter selectivity and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 82, 1424–1435.
- Wieschalka, S., Blombach, B., Bott, M., Eikmanns, B.J., 2013. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.* 6, 87–102.
- Yamamoto, S., Suda, M., Niimi, S., Inui, M., Yukawa, H., 2013. Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2938–2948.
- Yamshchikov, A.V., Schuetz, A., Lyon, G.M., 2010. *Rhodococcus equi* infection. *Lancet Infect. Dis.* 10, 350–359.
- Yomantas, Y.A.V., Abalakina, E.G., Lobanova, J.S., Mamontov, V.A., Stoyanova, N.V., Mashko, S.V., 2018. Complete nucleotide sequences and annotations of  $\phi$ 673 and  $\phi$ 674, two newly characterised lytic phages of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Arch. Virol.* 163, 2565–2568.
- Yoneda, A., Henson, W.R., Goldner, N.K., Park, K.J., Forsberg, K.J., Kim, S.J., Pesesky, M.W., Foston, M., Dantas, G., Moon, T.S., 2016. Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Res.* 44, 2240–2254.
- Young, B.A., Gruber, T.M., Gross, C.A., 2004. Minimal machinery of RNA polymerase holoenzyme sufficient for promoter melting. *Science* 303, 1382–1384.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S.A., 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98, 811–824.

Zhu, Q., Zhang, X., Luo, Y., Guo, W., Xu, G., Shi, J., Xu, Z., 2015. L-Serine overproduction with minimization of by-product synthesis by engineered *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 1665–1673.