

Abstrakt

Bakterie rodu *Rhodococcus* a *Corynebacterium* jsou biotechnologicky významné mikroorganismy. Práce se zabývá analýzou funkcí sigma (σ) faktorů RNA polymerázy při regulaci exprese genů u těchto bakterií. V genomu *C. glutamicum* se nachází 7 genů kódujících faktory: σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M . S výjimkou faktoru σ^M byly tyto faktory a jejich funkce dobře popsány. Genom *R. erythropolis* kóduje 21 předpokládaných genů pro σ 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 σ faktorem, se nazývá σ regulon. Překryvy σ regulonů jsou dány hlavně překryvem rekogniční specifity σ faktorů, kdy dva nebo více σ faktorů rozpoznává stejný promotor. Tato práce byla zaměřena na σ faktory skupiny 4 (též ECF) a jejich regulony: σ^D , σ^E , σ^H (*C. glutamicum*, *R. erythropolis*, *R. opacus*) a σ^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 σ^D a σ^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 σ^D . Cílenou mutagenézou oblasti -35 (GGGAACC) a -10 (GTCAAA) σ^M/σ^H -dependentního promotoru *Pcg0668* jsme vytvořili mutantní varianty analyzované pomocí *in vivo* a *in silico* metod. Nalezli jsme důvod překryvu rekogniční specifity faktorů σ^H/σ^M pro promotor *Pcg0668* (Y^{101} faktoru σ^H -G₋₂₁ promotoru, robustnost faktoru σ^H v blízkosti aktivního centra RNA polymerázy). S využitím metod *in vivo* a *in vitro* se nám podařilo stanovit konsenzuální sekvence σ^D -dependentních promotorů (GTAAC pro -35 a GAT pro -10 oblast), σ^E - a σ^H -dependentních promotorů (GGAA^{A/T} pro -35 a GTT pro -10 oblast) *R. erythropolis* a *R. opacus*. Byla charakterizována funkce σ^D (integrita buněčné stěny, odpověď na přítomnost sloučenin telluru) a σ^H/σ^E (odpověď na oxidativní a teplotní stres a na toxické působení sloučenin telluru) rhodokoků. Byl prokázán a popsán překryv σ^H/σ^E -regulonů u *R. erythropolis*. U *C. glutamicum* a částečně i u *R. erythropolis* a *R. opacus* byla popsána vysoce integrovaná regulační síť řízená σ faktory.

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