



**1. LÉKAŘSKÁ  
FAKULTA**  
**Univerzita Karlova**

**Od tónů genové exprese po harmonii buněčné diferenciaci:  
Regulace komplexního vývojového cyklu streptomycet**

Soubor uveřejněných vědeckých prací doplněný komentářem

**Habilitační práce**

**RNDr. Jan Bobek, Ph.D.**

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN

Praha, 2023

## Obsah

<b>1. Úvod - význam streptomycet pro (ne)jednu vědeckou kariéru</b>	<b>3</b>
<b>2. Literární přehled, komentář a diskuse k autorovým publikacím</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Sigma faktory a kontrola iniciace transkripce</b>	<b>7</b>
2.1.1 Literární přehled: Kde začít?	7
2.1.2 Mapování a modelování expresní kinetiky regulonu HrdB u <i>Streptomyces coelicolor</i>	8
2.1.3 Diskuse: Ohlasy na článek o regulonu HrdB	10
<b>2.2 Regulační RNA u streptomycet</b>	<b>12</b>
2.2.1 Literární přehled: Bakteriální regulační RNA	12
2.2.2 Objev a mapování exprese malých RNA	15
2.2.3 6S RNA – regulátor regulátorů	15
2.2.4 RNáza III a antisense RNA (sRNA)	16
2.2.5 tmRNA	17
2.2.6 Diskuse: Ohlasy na naše články o regulačních RNA streptomycet	18
<b>2.3 Regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace proteinů</b>	<b>21</b>
2.3.1 Literární přehled: Dvoukomponentové systémy streptomycet	21
2.3.2 Fosforylace proteinů jako nástroj modifikace aktivit signálního a translačního systému	22
2.3.3 Diskuse: Ohlasy na naše články o fosforylacích proteinů streptomycet	23
<b>2.4 Germinace streptomycet</b>	<b>25</b>
2.4.1 Literární přehled: Dormance a probouzení	25
2.4.2 Systémová analýza genové exprese při germinaci spor	27
2.4.3 Sekundární metabolity produkované při germinaci spor	29
2.4.4 Diskuse: Ohlasy na naše články o germinaci spor streptomycet	29
<b>2.5 Hemolytická aktivita a produkce antifungálních látek</b>	<b>33</b>
2.5.1 Literární přehled: Streptomycety asociované s hostitelským organismem	33
2.5.2 Klinické izoláty streptomycet	34
2.5.3 Půdní izoláty a streptomycety asociované s rostlinami a s bezobratlými živočichy	35
2.5.4 Diskuse: Ohlasy na článek o <i>Streptomyces sp.</i> TR1341	36
<b>3. Závěr</b>	<b>38</b>
<b>4. Autorovy publikace</b>	<b>40</b>
<b>5. Použitá literatura</b>	<b>42</b>

## 1. Úvod - význam streptomycet pro (ne)jednu vědeckou kariéru

*„Tak pojd' dál a seznam se s naší laboratoří“, přivítal mě pan doktor Jiří Janeček, když jsem jej onoho listopadu roku 1998 poprvé navštívil v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. „Mám jeden takový zlozvyk, totiž že kouřím“, vzal mě na ohoz budovy L, který v té době sloužil mnoha tamním vědeckým pracovníkům, ale i některým studentům jako kuřárna. A právě tam u kávy a cigarety mě začal velice kamarádsky zasvěcovat do krás studia streptomycet, přenosu signálu pomocí fosforylace proteinů - totiž ony si tím vlastně povídají, produkce antibiotik – jsou to takové farmaceutické továrny; a já – ač sám nekuřák – jsem tam s ním a s dalšími kolegy trávil čas, který mi toho hodně přinesl a který je neopakovatelný. To téma biologie streptomycet mě od té doby v mé profesionální kariéře už neopustilo...*

Genová exprese je proces, při němž se podle genetické informace vytváří funkční molekula. Centrální dogma molekulární biologie (Crick, 1970) definuje tento proces u buněčných organismů jako přepis informace z DNA do molekul RNA, jež se následně překládají do funkčních proteinů. Tento zjednodušený výklad je však potřeba poněkud rozšířit, neboť v současné době již víme, že:

- (i) funkční molekulou může být i molekula RNA – tato molekula nekóduje protein (ncRNA);
- (ii) nascentní protein nemusí být funkční; výsledná aktivita proteinů je často posttranslačně modifikována – v této práci se budu věnovat především fosforylaci proteinů jako nástroji přenosu signálu z prostředí a modulace náležité buněčné odpovědi;
- (iii) produktem procesu genové exprese může být i jiný metabolit, který vzniká až tzv. biosyntetickou drahou, která je proteiny katalyzována – v této práci půjde především o sekundární metabolity, tj. rozličné bioaktivní látky.

Zároveň je třeba si uvědomit, že samotná genová exprese ještě nezajistí životaschopný organismus, pokud by adekvátně neodpovídala na podněty okolního prostředí. Z tohoto důvodu musí organismus umět přijímat signály z vnějšího prostředí a adekvátně na ně reagovat změnami v genové expresi, tedy regulací genové exprese.

Evoluce rozdělila prokaryotické organismy na ty s jednoduchým nebo složitým životním cyklem v závislosti na prostředí, které obývají. Jednoduché bakterie prosperují ve specifickém prostředí s konstantními podmínkami. Jedná se především o parazitické organismy žijící v méně konkurenčním prostředí. Tomu odpovídá i jejich kratší genetická výbava s nižší potřebou regulací. Na druhou stranu, komplexní organismy vykazují různé životní strategie v boji o zdroje ve vysoce konkurenčním prostředí. Často obývají půdu nebo vodní ekosystémy, kde jsou vystaveny přirozené selekci, měnícím se nutričním podmínkám a dalším stresům. Proto si komplexní mikroorganismy musely vyvinout takové genetické programy, které

adekvátně reagují na změny podmínek prostředí a jsou schopné kódovat celou škálu diferenačních programů a metabolických strategií. Tomu odpovídá i velikost jejich genomu (až 10 Mbp u myxobakterií nebo streptomycet).

Streptomycety jsou rodem grampozitivních bakterií, které obývají převážně půdní prostředí. Půdní prostředí je příkladem velice komplexního ekosystému. Půdní mikroorganismy se potýkají s vysokou konkurencí jiných organismů, které usilují o stejné živiny. Strategie přežití streptomycet je podobná strategii houbových organismů. Je založena na složitém vývojovém životním cyklu, v jehož průběhu organismus detekuje rozličné extracelulární signály a reaguje na ně morfologickou i fyziologickou diferenciací. Z hlediska morfologického vývoj streptomycet začíná klíčením spor a tvorbou větvených vegetativních hyf, které se dále diferencují do vzdušného mycelia, na němž se vytvářejí řetízky nových spor. Diferenciace fyziologická spočívá především ve výše zmíněném sekundárním metabolismu, tedy v syntéze celé škály sekundárních (specializovaných) metabolitů. Sekundární metabolity jsou malé organické molekuly, které však často vykazují silné molekulární nebo biologické účinky (bioaktivitu). Mohou to být siderofory vázajících kovy, barviva spor, pachové látky (geosmin), imunomodulátory (tacrolimus) a látky antimikrobiální, včetně většiny klinicky účinných antibiotik. Biosyntetické dráhy zapojené do generování těchto sloučenin vyžadují sofistikovanou regulační síť, která je zodpovědná za modulaci odpovědi organismu na měnící se environmentální podmínky. Největší známý potenciál k produkci antibiotik a jiných bioaktivních látek mají členové bakteriálního řádu *Actinomycetales* (zejména právě rod *Streptomyces*), kteří jsou následováni dalšími mikroorganismy, jako jsou *Saccharopolyspora*, *Bacillus* nebo eukaryotické houby. Kromě antibiotik streptomycety často produkují antifungální látky, převážně polyeny, které vykazují výraznou  $\beta$ -hemolytickou aktivitu při kultivaci na krevních agaroch (Herbrik et al., 2019, Bobek et al., 2022). S jejich pomocí často vstupují do symbiotických svazků s vyššími organismy, jakými jsou rostliny či bezobratlí živočichové.

Z výše zmíněných důvodů se streptomycety jeví jako ideální modelový organismus pro studium regulací genové exprese. Na jedné straně jde o model dostatečně jednoduchý, neboť se stále jedná o bakteriální organismus, kde zásah do genetické informace často přímo ovlivní výsledný fenotyp. Na druhé straně jde o organismus na evolučním vrcholu bakteriální říše s komplexním životním cyklem, který vyžaduje efektivní kontrolní mechanismy na všech úrovních genové exprese.

Z tohoto pohledu mapování genové exprese, studium jejích regulací a zpětná analýza výsledného fenotypového projevu je ve své podstatě spojovacím článkem mé dosavadní profesionální kariéry, zaměřené na biologii streptomycet. Cílem předkládané práce je podat ucelený komentovaný souhrn mých dosavadních publikací v této oblasti. Jednotlivé kapitoly jsem se pokusil řadit tak, aby odpovídaly dílčím krokům genové exprese, tedy nikoliv chronologicky dle data publikování.

V první části jsou popsány studie zabývající se identifikacemi jednotlivých regulátorů genové exprese nebo mapováním jejich regulonů. Studované regulátory lze tematicky rozdělit podle úrovně genové exprese, kterou ovlivňují (Obr. 1):

- (i) regulace iniciace transkripce, tj. analýza regulonu HrdB (viz kap. 2.1);
- (ii) regulace ko-transkripční nebo posttranskripční, tj. sRNA (viz kap. 2.2);
- (iii) posttranslační modifikace aktivity proteinů, tj. fosforylace proteinů (viz kap. 2.3).

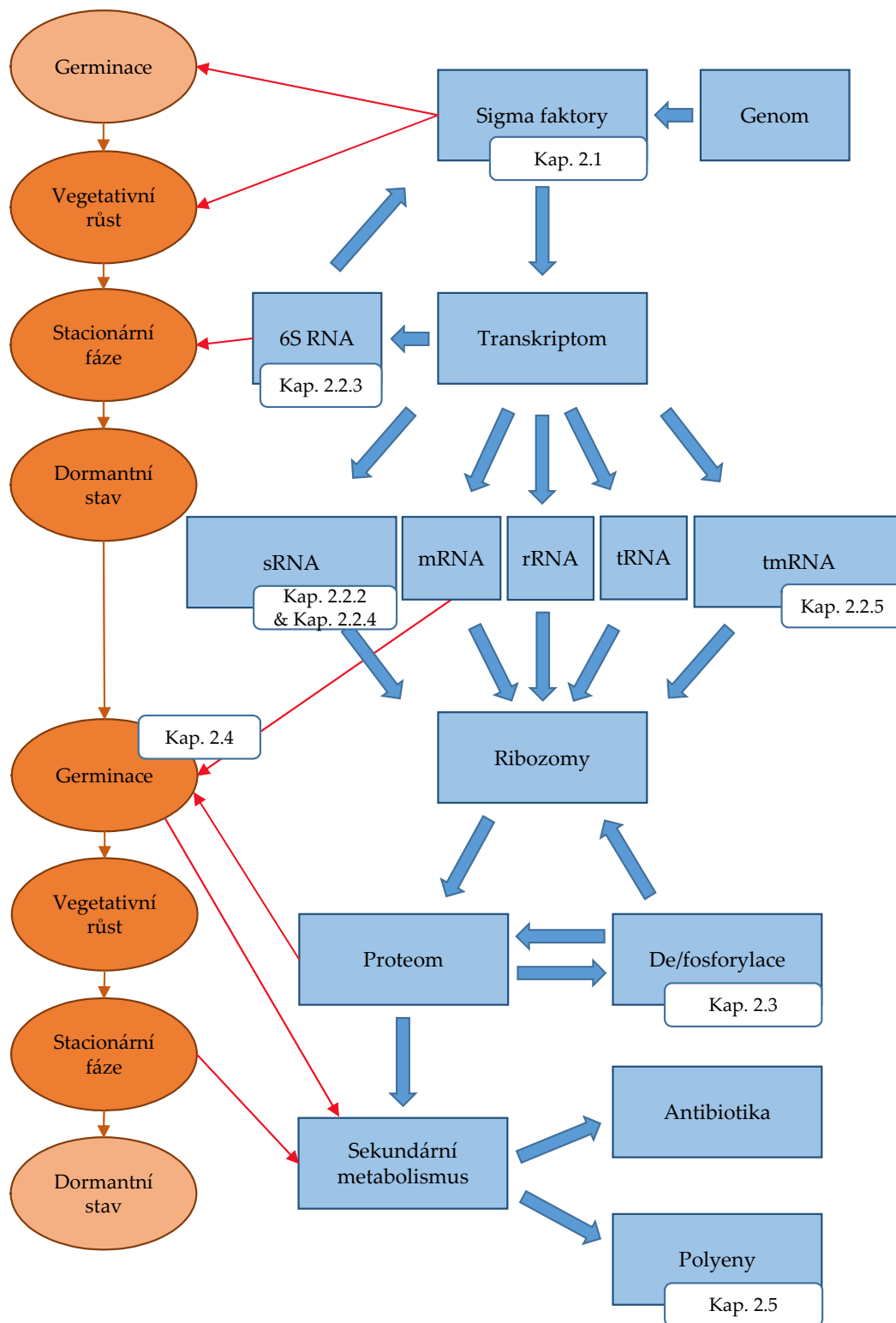
Ve druhé části je představen systémový pohled na genovou expresi. Prezentované práce mapují změny transkriptomu, proteomu, metabolomu a regulačních sítí v průběhu germinace spor. Vývojové stadium germinace bylo pro tyto analýzy zvoleno s ohledem na skutečnost, že tento proces zahrnuje mechanismy reaktivací genové exprese z nulového, tedy dormantního, stavu organismu (viz kap. 2.4).

Poslední část habilitační práce se věnuje publikacím, které charakterizují finální produkci sekundárních metabolitů. V obou případech se jedná o analýzy produkce metabolitů s antifungálním účinkem; v prvním případě u klinického izolátu (Herbrink et al., 2019) a ve druhém případě o analýzy antifungálních aktivit více než dvaceti půdních izolátů či izolátů asociovaných s vyššími organismy (Bobek et al., 2022) (viz kap. 2.5).

Domnívám se, že by pro tuto habilitační práci nebylo příliš přínosné přeformulovat diskuse relevantní k jednotlivým publikacím. Každý tematický celek této práce je sice doplněn diskusní částí, v té jsem se však pokusil zhodnotit spíše význam svých publikací s ohledem na to, zda naše výsledky přinesly nějakou inspiraci dalším autorům a v jakých souvislostech byly citovány.

Celkově by měla tato habilitační práce poukázat na potřebu dalšího studia základních buněčných procesů ve streptomycetách ve spojitosti s jejich klinickým významem a případným průmyslovým uplatněním jimi produkovanych metabolitů.

Rád bych vyjádřil svou vděčnost svým školitelům a mentorům, kterým věnuji prolog některých kapitol. Také děkuji všem svým současným i bývalým kolegům, spoluautorům našich společných publikací a samozřejmě i svým studentům!



**Obrázek 1.** Schéma genové exprese (modré panely) ve vztahu k životnímu cyklu streptomycet (oranžové ovály) a se zaměřením na výzkumná témata prezentovaná v této práci.

## 2. Literární přehled, komentář a diskuse k autorovým publikacím

### 2.1 Sigma faktory a kontrola iniciace transkripce

#### 2.1.1 Kde začít?

Nadpis této kapitoly není projevem bezradnosti autora těchto řádků, ale pouhý překlad titulu přehledového článku „Where to Begin? Sigma factors and the selectivity of transcription initiation in Bacteria“ (Hermann, 2019). Domnívám se, že výstižnost tohoto nadpisu je nepřekonatelná, proto jsem si jej zde dovolil použít. Autor citovaného přehledu zároveň podotýká, že v době vydání v roce 2019 uplynulo právě 50 let od doby, kdy byla poprvé purifikována sigma podjednotka RNA polymerázy, rozpoznávající specifická místa (promotory) pro zahájení transkripce (Burgess et al., 1969).

Mikroorganismy mají k dispozici širokou škálu regulátorů, které řídí genovou expresi a následnou aktivitu funkčních molekul. Těmito regulátory jsou především regulační RNA a proteiny, mohou se však uplatňovat také malé signální molekuly, změny konformace cílových složek expresního aparátu či posttranslační modifikace produktů. Podle důležitosti můžeme regulátory rozdělit na specifické, pleiotropní a globální. Streptomycety disponují asi až 900 takovými transkripčními regulátory (Hahn et al., 2003).

Zřejmě nejvýznamnějším způsobem ovlivňují výsledný transkriptom sigma faktory. Sigma ( $\sigma$ ) faktor je oddělitelná podjednotka RNA polymerázy (RNAP) a jeho selektivní vazba na příslušný promotor spouští transkripci.

Sigma faktory se dělí do dvou strukturně a evolučně odlišných rodin: (i) rodina  $\sigma_{54}$  (podle 54 kDa RpoN u *E. coli*) a (ii) rodina  $\sigma_{70}$  (podle 70 kDa RpoD u *E. coli*, též označovaný jako  $\sigma_A$ ) (Paget and Hermann, 2003; Feklistov et al., 2014; Zhang and Buck, 2015). Většina bakteriálních genomů kóduje 1 nebo 2  $\sigma_{54}$  geny, jejichž produkty často regulují expresi genů zapojených do dusíkového metabolismu. U streptomycet však sigma faktory rodiny  $\sigma_{54}$  známy nejsou (Otani et al., 2022).

Na rozdíl od toho, všechny bakterie mají  $\sigma_{70}$  jako svůj hlavní (primární) sigma faktor. Bakteriální  $\sigma_{70}$  řídí transkripci esenciálních (housekeeping) genů za normálních růstových podmínek. Kromě tohoto primárního sigma faktoru volně žijící bakterie často disponují proměnlivým počtem alternativních  $\sigma_{70}$  faktorů. Na základě fylogenetické příbuznosti byla rodina  $\sigma_{70}$  rozdělena do čtyř skupin (Lonetto et al., 1992; Missiakas and Raina, 1998; Gruber and Gross, 2003). Skupina 1 obsahuje esenciální  $\sigma_{70}$  orthology, které řídí transkripci housekeeping genů převážně během exponenciálního růstu. Sigma faktory skupiny 2 jsou první skupině blíže příbuzné, ale nejsou esenciální. Členové skupiny 3 jsou odlišnější, jsou však stále evolučně příbuzní. Skupiny 2 a 3 společně regulují expresi velkého počtu genů,

včetně těch, které jsou zapojeny do obecných stresových odpovědí, formování a aktivity bičíku, chemotaxe a vývojových procesů, jako je tvorba endospor. Skupina 4, která je známa jako podskupina sigma faktorů s extracytoplazmatickou funkcí (ECF), zahrnuje vzdáleně příbuzné členy  $\sigma 70$  rodiny. Jsou nejpočetnější skupinou  $\sigma 70$  faktorů a regulují expresi genů, které zajišťují adekvátní buněčnou odpověď na stresové podmínky.

Aktivita sigma faktorů odráží vývojové stadium organismu a organismu umožňuje adekvátně reagovat na signály z prostředí. Intracelulární zásoba sigma faktorů s odlišnými schopnostmi rozpoznávání promotorů je buněčnou odpovědí na měnící se podmínky prostředí. Proto je počet sigma faktorů kódovaných v genomu měřítkem komplexity organismu. Počet známých sigma faktorů se pohybuje od 1 u *Mycoplasma genitalium* (Fraser et al., 1995) až po přibližně 80 u *Streptomyces sp.* RLB3-17 (Otani et al., 2022), což je zatím největší počet genů kódujících různé sigma faktory nalezený v jednom bakteriálním genomu.

Medián počtu genů kódujících sigma faktory v jednom genomu streptomycet, vypočtený z celkem 205 osekvenovaných genomů, je 46 (Otani et al., 2022). V případě *S. coelicolor* je známo asi 66 sigma faktorů (Chater, 1993; Hopwood, 1999). Sigma faktory skupiny 1 a 2 mají u streptomycet stejný minimální soubor domén a nelze je jednoznačně rozlišit bez funkční charakterizace. U *S. coelicolor* se uvádí, že skupina 1 je zastoupena pouze jedním hlavním sigma faktorem HrdB (Buttner et al., 1990), zatímco skupina 2 obsahuje tři neesenciální homology hlavního sigma faktoru (HrdA, HrdC, HrdD). Většina členů skupiny 3 je spojena s morfologickou diferenciací. Patří sem  $\sigma$ WhiG, SigF, SigN, SigK, SigH a SigB. Například  $\sigma$ WhiG reguluje sporulaci (Tan et al., 1998). Několik členů skupiny 3 také řídí obecné stresové odpovědi. Zejména u šesti z nich (SigB, SigH, SigI, SigK, SigL, SigM) bylo prokázáno, že jsou indukované osmotickým stresem (Karooonuthaisiri et al., 2005). Nejdůležitější z nich je pravděpodobně SigB, který řídí expresi genů kódujících několik dalších sigma faktorů, proteiny pro ochranu před oxidativním poškozením, chaperony a metabolickou dráhu pro zajištění cysteinu nebo mykothiolu (Lee et al., 2005).

Většina sigma faktorů streptomycet (75 %) je však spojena se skupinou 4. Jeden z jejich členů,  $\sigma$ BldN, je nezbytný pro tvorbu vzdušných hyf (Bibb et al., 2000). Další člen, SigE, jehož funkce je regulována dvousložkovým systémem CseC-CseB, řídí transkripci genů zapojených do integrity buněčné stěny (Lonetto et al., 1994). Další člen skupiny 4, SigR, řídí buněčnou odpověď na oxidativní stres (Paget et al., 1998). Řada dalších alternativních sigma faktorů ze skupin 3 a 4 je zapojena do reakcí na změny v prostředí a může také řídit produkci antibiotik.

### **2.1.2 Mapování a modelování expresní kinetiky regulonu HrdB u *Streptomyces coelicolor***

Housekeeping sigma faktory jsou nezbytné, neboť jejich regulon zajišťuje především vegetativní fázi růstu. Housekeeping sigma faktorem streptomycet je HrdB (kódovaný genem SCO5820 u *S. coelicolor*). HrdB, stejně jako sigma faktory HrdA, HrdC a HrdD, je orthologem RpoD ( $\sigma 70$ ) u *Escherichia coli* či  $\sigma A$  u *Bacillus subtilis* a *Mycobacterium tuberculosis* (Tanaka et al.,



1988;Buttner, 1989;Shiina et al., 1991;Tanaka et al., 1991;Kang et al., 1997). Aktivity HrdA-D ani úloha jejich regulonů v životním cyklu streptomycet nebyly dosud studovány. Nicméně již v roce 1990 bylo prokázáno, že HrdB je nezbytný, protože jeho deleční mutace není životaschopná. Úlohu tohoto sigma faktoru nezastoupí ani žádný sigma faktor z trojice HrdA, HrdC nebo HrdD (Buttner et al., 1990). HrdB streptomycet je tak pravděpodobně jediným funkčním homologem  $\sigma_{70}$  *E. coli*.

Zásadním úkolem při odvozování genových regulačních sítí u bakterií je rozpoznání cílových genů. Sigma faktory u streptomycet rozpoznávají rozmanité promotorové sekvence, které je obtížné předpovědět, na rozdíl od promotorů bakterií s méně složitým vývojem, jakou je *E. coli*. Kromě zde prezentované naší publikace mi jsou známy čtyři další práce, jejichž autoři použili celogenomový přístup (metody ChIP-chip nebo ChIP-Seq) při hledání vazebných míst sigma faktorů streptomycet. První práce odhalila především geny chaplinů a rodlinů, jejichž transkripci reguluje  $\sigma_{BldN}$  u *S. venezuelae* (Bibb et al., 2012). Druhá práce (Kim et al., 2012b) zmapovala regulon SigR během oxidačního stresu u *S. coelicolor*. Ve třetí práci autoři identifikovali regulon SigE kombinací ChIP-seq, microarray a bioinformatické analýzy (Tran et al., 2019). Ve čtvrté byl identifikován regulon sigma faktoru  $\sigma_{WhiG}$  specifického pro fázi sporulace (Gallagher et al., 2020). Ve své práci (Smidova et al., 2019) jsme se zaměřili na odhalení regulonu HrdB v průběhu jeho aktivity ve vegetativní fázi růstu *S. coelicolor*. Experimentálně je fyzická interakce mezi sigma faktory a promotorovými sekvencemi genu ověřována pomocí metod chromatinové imunoprecipitace (ChIP-chip a ChIP-Seq). Modifikovali jsme za tímto účelem tzv. REDIRECT PCR technologii mutagenese u streptomycet (Gust et al., 2003). Touto modifikovanou metodou jsme provedli inzerční mutaci, při níž byla na původním místě *hrdB* genu v chromozómu, za jeho protein-kódující oblastí a před STOP kodonem, připojena epitopová značka hemaglutininu (HA). Tím bylo následně možné s využitím specifické protilátky stanovit vazbu značeného sigma faktoru na promotor pomocí ChIP-seq experimentu. Podobnou metodu v té době nezávisle na nás představil/a Kim (Kim et al., 2012a). Autoři použili tandemové epitopové značení pro zavedení *myc* značky do transkripčních faktorů ScbR a NdgR.

Získané informace o vazbě sigma faktoru jsou však statické, což znamená, že mohou zahrnovat i tzv. tiché vazby, které přímo nespouštějí transkripci (To and Vohradsky, 2010;MacQuarrie et al., 2011). Proto musí být vazebná data doplněna o transkripční modely, které předpokládají, že dynamika regulátoru (v našem případě HrdB) je korelována s dynamikou na úrovni transkriptu (de Sousa Abreu et al., 2009). Až kombinace kinetických dat genové exprese se statickým zmapováním vazebných míst tak pomohla posoudit, u kterých genů vazba HrdB na promotor transkripci skutečně ovlivní.

Potvrdil se předpoklad, že HrdB reguluje expresi housekeeping genů, jejichž produkty jsou důležité pro vegetativní vývoj streptomycet.

### 2.1.3 Diskuse: Ohlasy na článek o regulonu HrdB

Ke dni 11. 11. 2023 je podle databáze WOS (webofscience.com) článek citován 21krát. Kromě častých citací obecně zmiňujících identifikaci 2100 genů, jejichž exprese je kontrolována HrdB, významný počet článků zmiňuje analýzu vazebného motivu a klíčovou roli HrdB související s primárním metabolismem a vegetativním růstem. V přehledovém článku (Lee et al., 2021), který se zabývá využitím celogenomových analýz pro objevování nových biosyntetických genových shluků, je dokonce zmíněna i kontrolní funkce HrdB nad sekundárním metabolismem; konkrétně se jedná o geny objevené v HrdB regulonu zodpovědné za syntézu polyketidů. V souvislosti s regulací exprese genů sekundárního metabolismu byl náš článek citován také v práci (Park et al., 2021), v níž autoři pomocí Massively Parallel Reporter Assay (MPRA) charakterizovali oblasti DNA předcházející místům začátků transkripce (TSS, transcription start sites), na nichž probíhá kontrola transkripce genů sekundárního metabolismu u *S. albidoflavus*. Technikou MPRA se extrahují a následně pomocí reportérového genu testují potenciální regulační sekvence DNA, jakými mohou být například promotory nebo enhancery. Lokalizací TSS autoři této studie identifikovali promotorové oblasti s vazebným motivem (-35 ttgacn / -10 TAnnnT), v němž měl -33 G nejvyšší signál a který odpovídá vazebnému motivu HrdB (-35 ntGacn / -10 tAnnnT) odhalenému v naší práci.

Naše práce je také citována v microreview věnovanému SigR (Park et al., 2019). SigR je globální regulátor, který u *S. coelicolor* přímo aktivuje více než 100 genů, včetně genů pro homeostázu thiolů, kontrolu kvality proteinů, metabolismus síry, modulaci ribozomů a opravu DNA. Pro indukci cílových genů je nezbytné uvolnění vazby jeho anti-sigma faktoru RsrA. Syntéza SigR je potom řízena pozitivní zpětnou vazbou, kterou je produkována jeho nestabilní izoforma SigR'. To je dáno transkripcí z promotoru specifického pro SigR' (*p2*) umístěného před promotorem konstitutivním *p1*. Za nestresových podmínek jsou syntetizovány transkripty *sigRp1* a probíhá jejich translace do produktu SigR, který je relativně stabilní ( $t_{1/2} > 70$  min). Varianta SigR' je delší o 58 aminokyselin (Kim et al., 2009) a je výrazně méně stabilní ( $t_{1/2} \sim 10$  min) (Kim et al., 2009). V této souvislosti je zajímavá zmínka o promotoru *sigRp1*, který, jak ukázal náš článek, je také rozpoznáván HrdB na sekvencích (-35 GGCGGG / -10 TATCCT) (Smidova et al., 2019). V tomto případě oblast -10 dobře koresponduje s odhaleným obecným motivem pro vazbu HrdB uvedeným výše (TAnnnT) na rozdíl od oblasti -35.

Data z této práce byla rovněž zmíněna v článku (Hwang et al., 2019), v němž autoři analyzují genom, transkriptom a proteom u *S. clavuligerus* s využitím celogenomových dat, jakými jsou RNA-Seq, dRNA-Seq (pro mapování 5'-trifosfát nascentních transkriptů) a tzv. ribosome profiling (mapování mRNA přímo vázaných na ribozom). Tak bylo u této streptomycety, která je důležitá svou produkcí kyseliny klavulanové (inhibitoru  $\beta$ -laktamázy) (Brown et al., 1976) a  $\beta$ -laktamového antibiotika cefamycinu C (Ward and Hodgson, 1993), nalezeno 2659 TSS, což napomohlo identifikaci promotorových oblastí. Sekvenční analýza -35 promotorových oblastí pak napomohla predikovat regulované geny. Citující naši práci autoři zmiňují fakt, že nelze konkrétní sigma faktor jednoduše přiřadit ke konkrétnímu promotoru. To je dáno jednak

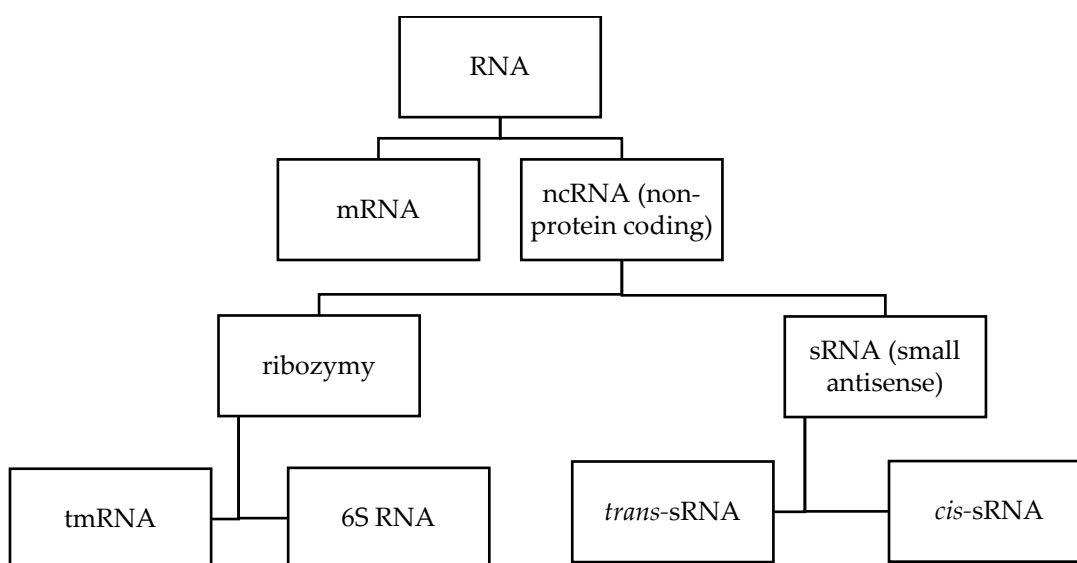
flexibilitou vazeb různých sigma faktorů na konkrétní typ promotorů, jednak existencí více variant promotorových sekvencí, jež jsou jedním sigma faktorem rozpoznávány, jak právě naše práce ukázala.

V práci (Lee et al., 2019) autoři analyzovali regulační elementy genů u *S. lividans*, jejíž genom je velice podobný genomu *S. coelicolor*. Pomocí softwarového souboru MEME Suite (Bailey et al., 2009) analyzovali promotorové oblasti a odhalili konzervovaný sekvenční motiv (-35 N5TGACN7 / -10 N8TANNNTN7). Tento motiv následně porovnali s našimi daty regulonu HrdB. Vazebná specifita HrdB byla u obou streptomycet shodná, což bylo možné předpokládat také na základě shodné sekvence aminokyselin v HrdB obou streptomycet. Poté autoři ukázali na možnou souvislost přítomnosti 18 až 19 nukleotidového spaceru, který charakterizuje promotorovou oblast primárních sigma faktorů. Naopak promotory charakterizované pouze dvanáctinukleotidovým spacerem nespádaly do regulonu HrdB. Přítomnost dvanáctinukleotidového spaceru je charakteristická například pro promotorové oblasti genů zajišťujících opravy a rekombinaci DNA. Tyto promotory jsou rozpoznávány sigma faktory SLIV\_13900 and SLIV\_16385 u *S. lividans*, respektive SCO4895 a SCO4409 u *S. coelicolor* (Rückert et al., 2015; Jeong et al., 2016).

V jiné práci (Hesketh et al., 2021) autoři analyzovali změny transkriptomu v závislosti na přítomnosti glykopeptidového antibiotika vankomycinu či jeho semisyntetických derivátů dalbavancinu a chlorobifenyl-vankomycinu u *S. coelicolor* s rezistencí typu VanB. Autoři využili námi vytvořenou databázi genů obsažených v regulonu HrdB, aby zjistili, že transkripce genů tohoto regulonu je v přítomnosti těchto glykopeptidových antibiotik snížena, a to včetně samotného genu *hrdB* (SCO5820).

## 2.2 Regulační RNA u streptomycet

„Měl bys včas naskočit do toho rozjíždějícího se vlaku – regulační RNA, to bude velké téma!“, říkával mi pan doktor Mikulík. A měl pravdu! V roce 2006 jsem navštívil konferenci věnovanou ncRNA v Cold Spring Harbor. Moje zavazadla však zamířila do jiného hotelu, a tak jsem řešení nastalé situace věnoval více pozornosti nežli tomu, že mám právě příležitost setkat se a diskutovat s budoucími nositeli Nobelovy ceny... (Ještě v témže roce byla Nobelova cena za fyziologii a lékařství udělena Andrewu Z. Fireovi a Craigu C. Mellovi za objev RNA interference).



Obrázek 2. Zjednodušené schéma bakteriálního transkriptomu.

### 2.2.1 Literární přehled: Bakteriální regulační RNA

Už více než dvě desetiletí je známo, že RNA nejsou jen pouhými pasívními přenašeči genetické informace, ale že také bývají důležitými regulátory adaptací bakterií na změny v prostředí. Transkripty, které nekódují protein (ncRNA, non-protein coding RNA), často mívají regulační funkci – mohou buď působit enzymaticky (ribozym, viz níže) (Quendera et al., 2020), nebo účinkují jako posttranskripční regulátory cílových genů zapojených do důležitých buněčných procesů, jako je adaptace na stresové podmínky, virulence a tvorba biofilmu (Waters and Storz, 2009) (Obr. 2). V tomto druhém případě cílí na mRNA antisense mechanismem (neboli párováním bází) a jsou pak označovány jako sRNA (small RNA).

Podle umístění svých genů vůči genům cílových transkriptů se sRNA dělí do dvou skupin: *cis* (oba geny leží na opačných vláknkách a vzájemně se částečně překrývají) a *trans* (gen regulujícího transkriptu je umístěn jinde než gen regulovaného transkriptu). *cis*-sRNA (často

bakteriologie označované jako asRNA) jsou proto plně komplementární k části transkriptu, který regulují. Navíc *cis*-sRNA mohou modulovat hladiny mRNA nejen posttranskripčně - tvorbou dvouvláknových RNA komplexů, ale mohou také procesem označovaným jako interference transkripce přímo ovlivnit transkripci v důsledku kolizí mezi RNA polymerázami pohybujícími se opačným směrem (transkripční interference, (Thomason and Storz, 2010)).

Na rozdíl od *cis*-sRNA je párování *trans*-sRNA s jejich cílovými transkripty neúplné. Vzhledem k této neúplnosti či nepřesnosti párování však *trans*-sRNA mohou ovlivnit expresi více transkriptů. Konvenční mechanismus posttranskripčních regulací prostřednictvím sRNA spočívá ve vazbě na cílový messenger v blízkosti místa vázání ribozomu (RBS, ribosome binding site), čímž inhibují zahájení translace a stimulují rozklad mRNA (Storz et al., 2011). Avšak sRNA často translaci naopak stimulují a zabraňují degradaci mRNA. To je dáno párováním bází s nepřekládanou oblastí 5'-transkripčního počátku (5'-UTR, untranslated region) mRNA, čímž zabraňují tvorbě sekundární struktury (vlásky), která by translaci naopak znemožnila.

Pro regulační aktivity molekul sRNA bývá klíčová interakce s proteiny. Proteiny vázající se na RNA (RBP, RNA-binding proteins) se nacházejí ve všech živých organismech a ovlivňují konformaci a funkce vázaných RNA (Smirnov et al., 2017). Schopnost těchto proteinů rozpoznávat a vázat se na RNA molekuly vychází z přítomnosti definovaných domén, jako je klasická doména S1, doména cold shock (CSD), doména K homologie (KH) a další (Holmqvist and Vogel, 2018). Dvěma hlavními skupinami RBP jsou RNA chaperony a ribonukleázy.

RNA chaperony dočasně vážou RNA molekuly a vyvolávají u nich změny sekundární struktury (Woodson et al., 2018). Strukturální změny ovlivňují stabilitu sRNA a mRNA molekul a mohou usnadnit i jejich párování. Navíc RNA chaperony vázající současně sRNA a cílovou mRNA v rámci jednoho komplexu, přivedou obě molekuly k sobě, čímž podporují vznik stabilních interakcí. I když může párování sRNA-mRNA probíhat i bez RNA chaperonů, jejich přítomnost tento proces výrazně urychluje (Rajkowitsch and Schroeder, 2007; Panja et al., 2013). V současné době jsou u bakterií známy tři hlavní RNA chaperony: Hfq (Santiago-Frangos and Woodson, 2018), ProQ (Smirnov et al., 2016) a CsrA (Müller et al., 2019). U různých bakterií jsou tyto RNA chaperony zastoupeny různě a vážou odlišné typy sRNA, což naznačuje, že jejich aktivity se nepřekrývají (Holmqvist et al., 2016; Smirnov et al., 2016; Holmqvist and Vogel, 2018; Melamed et al., 2020).

Ribonukleázy (RNázy) jsou enzymy zodpovědné za katalytické štěpení různých struktur RNA (Arraiano et al., 2010). Výsledná stabilita a aktivita sRNA je výsledkem vzájemného působení mezi RNA chaperony a RNázami, protože RNA chaperony mohou chránit nebo naopak odkryt sRNA, a tak RNázám štěpení umožnit (Holmqvist and Vogel, 2018). Hlavními bakteriálními RNázami jsou endoribonukleázy RNáza E a RNáza III a exonukleáza PNPáza (Saramago et al., 2014).

RNáza E štěpí jednořetězcovou RNA, přednostně v místech bohatých na nukleotidy A/U následovaných vlásenkovou strukturou (Del Campo et al., 2015). Tato endoribonukleáza je složena z konzervované N-terminální katalytické oblasti obsahující RNA-vazebnou doménu S1 a z C-terminální nekatalytické oblasti (Bandyra and Luisi, 2018).

Na rozdíl od RNázy E RNáza III degraduje dvouvláknové úseky RNA (dsRNA). Strukturně, jak bylo popsáno u *E. coli*, jde o 52 kDa homodimer s katalytickou N-terminální doménou spojenou krátkým úsekem C-terminální domény vázající dsRNA (Li and Nicholson, 1996). RNáza III může štěpit dsRNA vytvořenou mezi komplementárním úsekem sRNA a cílovou mRNA (Lybecker et al., 2014; Altuvia et al., 2018). Degradace komplexu sRNA-mRNA RNázou III je u bakterií běžná. Například u salmonel štěpí komplex [*MicA* sRNA-*ompA* mRNA] (Viegas et al., 2011), u *B. subtilis* komplex antitoxin-toxin [*RatA* sRNA-*txpA* mRNA] (Durand et al., 2012). RNáza III může také štěpit dvouvláknové úseky vlásenkových struktur. Tak se také účastní modifikací některých primárních transkriptů; typickým příkladem je úprava nascentních ribozomálních RNA, studovaná například u *E. coli* (Bram et al., 1980; Bubunenko et al., 2013), nebo účast na maturaci CRISPR RNA u *Streptococcus pyogenes* (Deltcheva et al., 2011).

Polyribonukleotid fosforyláza (PNPáza) je vysoce konzervovaná 3'-5' exoribonukleáza (Saramago et al., 2014; Dos Santos et al., 2018). Strukturně to je prstencový homotrimer, jehož každý monomer má molekulovou hmotnost 78 kDa a obsahuje na C-konci KH a S1 vazebné domény (Shi et al., 2008). U *E. coli* je PNPáza hlavním enzymem zapojeným do degradace sRNA, které nejsou vázány na Hfq (Andrade et al., 2013). Tento poznatek je v souladu se zjištěním, že PNPáza degraduje samotné sRNA, tedy v nepřítomnosti cílových mRNA (Andrade and Arraiano, 2008).

Ribozymy disponují enzymatickou aktivitou, čili stejně jako bílkovinné enzymy mohou katalyzovat chemické reakce. Ribozymy jsou buď samostatné ncRNA, nebo častěji jsou součástí ribonukleoproteinových komplexů. Příkladem mohou být rRNA, které působí jako ribozymy při translaci mRNA (Nissen et al., 2000). Povahu ribozymu má též endoribonukleáza P (RNáza P), která katalyzuje úpravu 5' konce prekurzorové tRNA (Guerrier-Takada et al., 1983; Ellis and Brown, 2009). Mezi ribozymy jsou také řazeny některé introny. Introny skupiny I a skupiny II tvoří součást tzv. sobeckých genetických elementů, které se inkorporují do různých oblastí DNA genomů (Toro et al., 2007; Hausner et al., 2014). Po transkripci jsou však tyto introny schopny samy sebe odštěpit z primárních transkriptů, jejichž funkci tak nenaruší. Jako součást ribozymu podle výše uvedené definice můžeme chápat také tmRNA (v rámci procesu *trans*-translace; viz kap. 2.2.5) nebo 6S RNA (viz kap. 2.2.3). Úlohou 6S RNA je však spíše zablokovat enzymatickou aktivitu  $\sigma^{70}$ -RNA polymerázy ( $\sigma^{70}$ -RNAP) (Wassarman and Storz, 2000). V podobném smyslu například *CsrB* ncRNA u *E. coli* váže protein *CsrA*, čímž jej inaktivuje (Liu et al., 1997).

### 2.2.2 Objev a mapování exprese malých RNA

Předpokládali jsme, že mezi důležitými regulátory genové exprese streptomycet jsou také ncRNA, tak jak byly v té době postupně objevovány u jiných bakterií (Gottesman, 2005). Ve spolupráci s Dr. Josefem Pánkem, bioinformatikem z Mikrobiologického ústavu AV ČR, jsme připravili predikci genů kódujících ncRNA u *S. coelicolor* (Panek et al., 2008). Predikce byla založena na konzervaci sekvence DNA v intergenových oblastech (tedy v oblastech mimo do té doby známých genů), na lokalizaci transkripčních terminátorů a na uspořádání sousedících genů. Takto jsme předpověděli třicet dva potenciálních ncRNA. Abychom prokázali, že k expresi skutečně dochází, pro 32 predikovaných transkriptů jsme navrhli vnitřní, asi 35 nt dlouhé DNA oligonukleotidy, které jsme roboticky nanесли na microarrayové sklíčko a nechali hybridizovat s celkovou cDNA odvozenou od transkriptomu z izolovaných vzorků (metoda custom microarray). Tímto způsobem jsme prokázali skutečnou expresi u 20 genů, kterou jsme následně ověřovali pomocí RT-PCR.

Po dokončení těchto experimentů jsem nastoupil na roční stáž do kanadské laboratoře, kde jsme pod vedením Dr. Marie Elliot mapovali expresi podobným způsobem předpovězených genů metodou Northern blotting. Tímto způsobem se podařilo ověřit existenci dalších devíti sRNA (Swiercz et al., 2008).

### 2.2.3 6S RNA – regulátor regulátorů

Některé regulační RNA mohou regulovat více genů, a tím široce ovlivňovat fyziologii buňky (Majdalani et al., 2005). Tyto RNA působí buď jednoduše prostřednictvím párování bází s cílovými nukleotidy, nebo vázáním na cílové proteiny pomocí svých sekundárních struktur. Příkladem druhé strategie je 6S RNA, která je jednou z nejlépe studovaných regulačních RNA u bakterií (Wassarman Karen, 2018). 6S RNA má přímý vliv na přechod mezi vývojovými stadii bakterií díky své přímé interakci s holoenzymy  $\sigma 70$ -RNAP (tedy HrdB-RNAP u streptomycet). Proto vznik komplexů [ $\sigma 70$ -RNAP-6S RNA] interferuje s transkripční specifickou pro exponenciální fázi růstu a napomáhá přechodu do fáze stacionární (Willkomm et al., 2005; Wassarman and Saecker, 2006; Gildehaus et al., 2007). Díky své funkci je sekundární struktura promotorové oblasti 6S RNA výrazně konzervovaná napříč bakteriální říší.

Vysoký stupeň konzervace umožnil s pomocí bioinformatického přístupu identifikaci více než 100 potenciálních homologů 6S RNA v různých eubakteriálních druzích (Barrick et al., 2005). Mezi těmito nálezy nebyl však rod streptomycet zastoupen. Proto Dr. Josef Pánek vyvinul bioinformatický algoritmus, s jehož pomocí je možné vyhledat transkripty s podobnou sekundární strukturou. Tímto způsobem detekoval v genomu streptomycet nejméně dva transkripty se sekundární strukturou podobnou 6S RNA nalezenou u jiných bakterií (Barrick et al., 2005). Následně jsme ověřili, že skutečně dochází k expresi těchto RNA molekul.

Zajímavé bylo zjištění, že gen jedné z těchto nalezených RNA (*scr3559*), leží v lokusu zvaném *BalA1*, jehož nadměrná exprese se projevuje upozaděným vývojem vzdušného mycelia a především nadprodukcí sekundárních metabolitů (Nishiyama et al., 2000).

Na tento transkript jsme se v další práci zaměřili a ukázali jsme, že nulová mutace genu *scr3559* naopak snižuje produkci antibiotika aktinorhodinu u *S. coelicolor* (Mikulik et al., 2014), zatímco jeho nadměrná exprese vykazuje (i) zkrácenou exponenciální fázi růstu ve srovnání s kontrolním kmenem, (ii) urychlenou tvorbu vzdušného mycelia a maturaci spor a (iii) zvýšenou produkci aktinorhodinu a undecylprodigiosinu, podobně jako tomu bylo u *BalA1* lokusu (Bobek et al., 2021). Tato pozorování byla navíc podpořena LC-MS analýzami dalších produkovaných metabolitů, včetně germicidinů, desferrioxaminů a coelimycinu. Diferenciální microarray analýza potvrdila zvýšenou expresi genů spojených s popsávanými morfologickými a fyziologickými změnami.

#### 2.2.4 RNÁza III a antisense RNA (sRNA)

*S Marií Elliot jsem se poprvé setkal na již zmíněné konferenci v Cold Spring Harbor. Podruhé o rok později na konferenci v Newcastle mi nabídla roční postdoktorskou pozici ve své laboratoři v kanadském Hamiltonu. A tak jsem se v roce 2008 stal členem skvěle organizované laboratoře s deseti dalšími studenty, kteří mi v čele s Marií vytvořili velice milé a přitom inspirativní prostředí. Marie je v současné době vysoce etablovaná vědecká kapacita, která si však stále umí udržet přívětivý přístup.*

Jak je již uvedeno výše, v případě posttranskripčních regulací je významná úloha enzymu RNÁza III, který rozpoznává a štěpí vytvořené dvouvláknové komplexy RNA (MacRae and Doudna, 2007). U streptomycet je známo, že RNÁza III se podílí na posttranskripční modifikaci ribozomálních RNA (Jones et al., 2014). Je však zajímavé, že delece genu kódujícího RNÁzu III (*rnc* gen) vede u *S. coelicolor* ke značnému snížení produkce nejméně čtyř antibiotik (aktinorhodin, undecylprodigiosin, CDA a methylenomycin) (Price et al., 1999; Chang et al., 2005; Sello and Buttner, 2008).

Microarray analýza a ko-imunoprecipitace odhalily alespoň 777 mRNA, které jsou rozpoznávány RNázou III (Gatewood et al., 2012). Stále však nebylo jasné, jakým způsobem enzym váže mRNA, pokud rozpoznává pouze dvouvláknové struktury. Hypoteticky by buď (i) mRNA mohla tvořit v oblasti 5'-UTR vlásenkové struktury, které by však musely být dostatečně dlouhé, aby umožnily vazbu RNÁze III, jako je tomu u rRNA, nebo (ii) existují *cis*-sRNA transkripty, které párováním bází vazbu RNÁzy III umožní. S mou postgraduální studentkou Ing. Ditou Šetinovou jsme se zaměřili na tuto druhou možnost a z publikovaného setu 777 transkriptů asociovaných s RNázou III jsme vybrali 17 mRNA. Pro odhalení potenciálních *cis*-sRNA jsme navrhli vnitřní primery odpovídající oblastem 5'-UTR a RBS cílových messengerů. Průkaz existence odpovídajících *cis*-sRNA jsme pak provedli pomocí



RACE experimentů (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Olivarius et al., 2009), čímž jsme zároveň odhalili jejich 5' a 3' konce a jejich celkové délky. To se nám podařilo ve všech 17 případech (Setinova et al., 2017). Northern blotting analýzy nám poté potvrdily jejich expresní profil v průběhu životního cyklu streptomycety. Naše další analýzy navíc odhalily *cis*-sRNA u několika transkripčních regulátorů (AdpA, SigB, SigH a SigR), včetně RNázy III samotné.

### 2.2.5 tmRNA

Zajímavou regulační RNA v bakteriální říši je tzv. transferová-messengerová RNA (tmRNA, kódovaná *ssrA* genem), která kombinuje vlastnosti tRNA a mRNA. Její úloha spočívá v recyklaci 70S ribozomů, na nichž je zablokovaná translace. Translace se na ribozomech může zablokovat např. nedostatkem aminoacyl-tRNA (hladověním), absencí STOP kodonu (mutací či posunutím čtecího rámce), nebo působením antibiotik, které s translací interferují. Proces obnovení funkce ribozomů řízený tmRNA se označuje jako *trans*-translace. Translace není dokončena podle původní mRNA, ale podle interní „messengerové“ části tmRNA. Tato část tmRNA, zakončená vlastním STOP kodonem, kóduje peptid, který je specificky rozpoznán a degradován intracelulárními proteázami (Herman et al., 1998; Flynn et al., 2001; Flynn et al., 2003; Bolon et al., 2004). Blokované ribozomy jsou tak opětovně rozvolněny na samostatné podjednotky a poškozená mRNA je rychle degradována působením 3'-5'-exonukleáz (Yamamoto et al., 2003).

Zajímalo nás, jak tento *trans*-translační systém funguje u různých druhů streptomycet. Vybrali jsme druhy, které produkují antibiotika, která interferují s translací, a mohla by tak způsobit zvýšenou aktivitu *trans*-translačního systému. Nejprve jsme zkoumali intracelulární hladinu tmRNA u *Streptomyces aureofaciens*, *S. griseus* a *S. collinus*, které syntetizují tetracyklin, streptomycin a kirromycin (Palecková et al., 2006; Palecková et al., 2007). Zjistili jsme rozdíly v míře produkce tmRNA během vývoje těchto streptomycet. Při experimentech se *S. aureofaciens* (Palecková et al., 2006) jsme do kultivačního média přidávali subinhibiční koncentrace tetracyklinu (ale i jiných antibiotik, jako je streptomycin nebo chloramfenikol) v průběhu vegetativní fáze růstu, tedy dříve, než bakterie sama začala streptomycin produkovat. To způsobilo zvýšení intracelulární hladiny tmRNA, zjištěné pomocí Northern blotting. *In vitro* *trans*-translační systém *S. aureofaciens* byl rovněž citlivý na přítomnost tetracyklinu již při koncentraci od 15  $\mu\text{mol/L}$ . Tyto experimenty naznačují, že *trans*-translační systém může přispívat k odolnosti vůči antibiotikům interferujícím s translací. Rovněž některé fyzikální faktory, které způsobují stresovou odpověď, ovlivňují *trans*-translační systém (Palecková et al., 2007). Snížení kultivační teploty ze standardních 28°C na 12°C způsobilo pokles syntézy proteinů, zatímco se hladina tmRNA zvýšila. Naopak zvýšení kultivační teploty na 37 °C způsobilo degradaci tmRNA u všech zkoumaných kmenů.

Následná komparativní analýza odhalila rozdíly v sekvencích a v predikovaných sekundárních strukturách tmRNA u různých druhů streptomycet (Mikulík et al., 2008).

Důležitou částí našich analýz byla identifikace proteinů interagujících s tmRNA (Mikulík et al., 2008). Pomocí afinitní chromatografie na tmRNA-Sepharose a UV-cross-linking experimentů se <sup>32</sup>P značenou tmRNA bylo identifikováno šest proteinů spojených s tmRNA u *S. aureofaciens*:  $\beta$  a  $\beta'$  podjednotky RNAP, PNPáza, ribozomální proteinu SS1, ABC transportéry a elongační faktor EF-Tu. Pro detekci peptidu SmpB, který je důležitou komponentou *trans*-translačního systému (Wower et al., 2001), jsme použili specifické protilátky. Nejvyšší úroveň SmpB byla detekována v buňkách z exponenciální fáze růstu a nižší množství ve stacionární fázi a ve sporách.

### 2.2.6 Diskuse: Ohlasy na naše články o regulačních RNA streptomycet

Obě naše publikace, věnující se hledání ncRNA (Panek et al., 2008; Swiercz et al., 2008), byly ve své době pro transkriptomiku streptomycet pionýrské a pokud jde o mou publikační aktivitu, obě mají nejvyšší citovanost. Článek (Panek et al., 2008) má ke dni 11. 11. 2023 citovanost 54, zatímco článek (Swiercz et al., 2008) je citován 60krát. Následovaly další publikace jiných autorů, které použitím kombinace bioinformatických předpovědí a experimentálních přístupů potvrzují očekávané zapojení ncRNA do regulací buněčných procesů u streptomycet, včetně primárního metabolismu, vývojových přechodů, produkce antibiotik a různých reakcí na stres (Tezuka et al., 2009; D'Alia et al., 2010; Vockenhuber et al., 2011; Moody et al., 2013). V této době se rovněž začaly šířeji využívat moderní metody celogenomových analýz, jako je deep sequencing. Touto metodou Vockenhuber (Vockenhuber et al., 2011) analyzoval transkriptom z konce exponenciální fáze růstu *S. coelicolor*, což odpovídá začátku tvorby sekundárních metabolitů. Autoři této studie identifikovali 63 ncRNA, z nichž 29 jsou *cis*-sRNA, a pomocí Northern blotting prokázali expresi 11 z nich. V této práci byla opětovně potvrzena exprese osmi původně námi (Panek et al., 2008; Swiercz et al., 2008) identifikovaných transkriptů.

V jiné studii byla data z RNA-Seq použita pro komparativní analýzu ncRNA u tří modelových streptomycet: *S. coelicolor*, *S. avermitilis* a *S. venezuelae*. Autoři zde identifikovali stovky nových sRNA (Moody et al., 2013). Ovšem pouze geny 129 z nich byly konzervované, a z nich pouze 11 bylo skutečně exprimováno ve všech třech streptomycetách. Ještě dříve, v publikaci z roku 2009, byla obdobná komparativní analýza použita při hledání nových ncRNA u *S. griseus*, *S. coelicolor* a u *S. avermitilis* (Tezuka et al., 2009). Bioinformatickým průzkumem autoři nejprve vybrali 54 kandidátních sRNA, jejichž sekvence byly vysoce konzervované. Z těchto 54 kandidátů bylo analýzou Northern blotting a mapováním S1 nukleázou potvrzeno nových 12 transkriptů u *S. griseus*. Disrupce genů všech 12 sRNA však nezpůsobila pozorovatelné fenotypové změny. Navzdory těmto poznatkům však dnes již víme, že zásahy do syntézy některých ncRNA u streptomycet mohou výrazně ovlivnit produkci antibiotik. Například nadměrná exprese *scr5239* sRNA u *S. coelicolor* vedla ke snížení produkce aktinorhodinu, zatímco úbytek hladiny této sRNA produkci antibiotika zvýšilo (Vockenhuber and Suess, 2012). Podobným způsobem nadměrná exprese *cnc2198.1as* sRNA výrazně snížila produkci undecylprodigiosinu u téhož druhu (D'Alia et al., 2010). Náš dosud nezveřejněný výzkum

ukázal nadměrnou produkci aktinorhodinu při nadprodukcí dříve objevených *cis*-sRNA (Setinova et al., 2017) (Obr. 3).



**Obrázek 3.** Porovnání fenotypů kmenů streptomycet nadměrně exprimujících *cis*-sRNA (ve směru hodinových ručiček shora: negativní kontrolní kmen s prázdným plazmidem (bílý), *as-rnc*, *as-advA*, *asSCO1626* (bílý), *asSCO0864*, *asSCO0703*, *asSCO0494* a *asSCO0219*).

Podobně jako výše uvedené komparativní analýzy genomů streptomycet, také komparativní analýza 130 dostupných genomových sekvencí mykobakterií odhalila, že počet genů kódujících ncRNA se liší v závislosti na druhu mykobakterie (Behra et al., 2022). Autoři této studie identifikovali 12 vysoce konzervovaných ncRNA, mezi nimiž byly rozpoznány ribonukleáza P RNA, tmRNA, signal recognition particle (4,5S RNA), Ms1 RNA a 6C RNA. Stejně jako to ukázaly naše práce u genomu streptomycet (Panek et al., 2008; Swiercz et al., 2008), rovněž u mykobakterií jsou geny kódující Ms1 RNA (*scr3559* u *S. coelicolor*) a 6C RNA (*scr3558* u *S. coelicolor*) blízko sebe, majíce mezi sebou pouze jeden gen kódující protein.

Ms1 RNA u *S. coelicolor* je právě námi studovaná *scr3559* RNA, kterou jsme z důvodu podobnosti sekundární struktury rovněž označovali jako 6S-like RNA (Bobek et al., 2021). Nicméně nedávno naši kolegové v MBÚ AV ČR (Vaňková Hausnerová et al., 2022) ukázali, že transkript *scr3559* váže pouze jádrovou RNAP bez sigma faktoru, a proto jej přejmenovali na Ms1 RNA, podle popsaného analogu u mykobakterií (Šiková et al., 2019) (viz kap. 2.2.5).

6C RNA, nazvaná podle šesti konzervovaných cytosinových zbytků nacházejících se ve smyčce konzervované vlásenkové struktury, je mezi příslušníky kmene *Actinobacteria* široce zastoupená, a dokonce pro *M. tuberculosis* je tato RNA nezbytná (Arnvig and Young, 2009). Mai u *M. tuberculosis* identifikoval/a 47 genů, jejichž transkripty by mohly být vázány 6C RNA (Mai et al., 2019). Skutečná vazba, která probíhá právě přes C-bohatou smyčku bez pomoci RNA chaperonů, byla ověřena u 15 z nich pomocí *in vivo* translačního *lacZ* fúzního systému.

6C RNA je tedy zřejmě pleiotropním regulátorem ovlivňujícím mimo jiné replikaci DNA a sekreci proteinů. Hladina 6C RNA vzrůstá s přechodem buněk do stacionární fáze růstu (Behra et al., 2019). Analogicky 6C RNA ovlivňuje proces sporulace u *S. coelicolor* (Swiercz et al., 2008).

Spolu s panem Doc. Karlem Mikulíkem a s mou tehdejší kolegyní Ing. Petrou Palečkovou jsme byli prvními autory, kteří studovali aktivitu tmRNA molekuly u streptomycet (Palecková et al., 2006; Palecková et al., 2007; Mikulik et al., 2008; Palecková et al., 2009). Celkem jsou ke dni 11. 11. 2023 všechny naše publikace věnující se tomuto tématu citovány 34krát. Pokud pomineme ribozomální RNA, je tmRNA jedním z nejvíce exprimovaných transkriptů u streptomycet (Arancio et al., 2022).

Analýza proteinů, které byly na svém karboxylovém konci označeny His8-tagem prostřednictvím rekombinantní tmRNA, identifikovala *trans*-translaci deseti, především následujících stresových proteinů: heat-shock protein DnaK, thiostreptonem indukovaný protein TipA, stresový protein A, EF-Tu3 a proteinové regulátory buněčného cyklu – pleiotropní regulátor produkce antibiotik a metabolismu N-acetylglukosaminu DasR, regulátory sporulace SsgF a SsgA a jejich transkripční aktivátor SsgR (Barends et al., 2010). Autoři této studie naši práci citují především v souvislosti s tvrzením, že tmRNA kontroluje adaptaci translačního systému na stresové podmínky, které zahrnují i přítomnosti translačních inhibitorů. Autoři další studie, Andini a Nash, si v souvislosti s tím položili otázku, zda zvýšená hladina tmRNA v přítomnosti antibiotik inhibujících translaci je způsobená navýšením syntézy nebo redukcí degradace tohoto transkriptu (Andini and Nash, 2011). Pomocí experimentů provedených u *M. smegmatis* a *M. bovis* zjistili, že po vystavení ribozomů translačním inhibitorům se aktivita promotoru *ssrA* genu zvyšuje, a proto dochází ke zvýšení hladiny tmRNA beze změny v rychlosti její degradace.

Odhalení nových *cis*-sRNA u streptomycet, které jsme provedli prostřednictvím dříve identifikované vazby RNázy III na jejich cílové messengery, je ke dni 11. 11. 2023 citováno celkem 11krát, včetně citací v několika přehledových článcích o antisense transkripci (Georg and Hess Wolfgang, 2018), o mezidruhové komunikaci prostřednictvím sRNA (Layton et al., 2020) a o streptomycetových ribonukleázách (Jones, 2023). Několikrát byla také citována námi zjištěná existence *cis*-sRNA (*as-adpA* RNA) zřejmě ovlivňující produkci globálního transkripčního regulátoru AdpA kontrolujícího morfologickou diferenciaci a produkci antibiotik (Rabyk et al., 2018; Kang et al., 2019; Lu et al., 2022).

## 2.3 Regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace proteinů

### 2.3.1 Literární přehled: Dvoukomponentové systémy streptomycet

Signály z prostředí a jejich správná interpretace jsou pro mikroorganismy klíčové (Hoskisson and Fernández-Martínez, 2018). Signály se v mikroorganismech přenášejí pomocí transdukčních drah, především prostřednictvím tzv. dvoukomponentových systémů (TCS, Two-Component Systems) (Romero-Rodríguez et al., 2018). Jako odpověď jsou následně aktivovány patřičné transkripční faktory. Dvoukomponentový systém je obvykle složen ze dvou proteinů. Prvním je transmembránová histidinová kináza účinkující jako senzor (SHK, Sensor Histidine Kinase), který přenáší fosfátovou skupinu ze své histidinové části na aspartátový zbytek druhého proteinu. Tímto druhým proteinem je regulační protein (RR, response regulator), který může působit jako transkripční faktor na expresi cílových genů (Jung et al., 2018).

Ve své nejběžnější a nejjednodušší organizaci jsou TCS přítomny u bakterií, avšak některé eukaryotické buňky, jako jsou houby, kvasinky a některé vyšší rostlinné buňky, mají systémy podobné (Zhao et al., 2022). TCS mohou vnímat mnoho stimulů, jakými jsou světlo, teplota, pH, přítomnost kovů, dostupnost živin, respirační akceptory elektronů, oxidační činidla, nízkomolekulární metabolity, včetně signálů mezibakteriální komunikace (quorum sensing a quorum quenching faktorů), přítomnost antibiotik a antimikrobiálních peptidů, oligosacharidů, proteinů, hormonů a různých signálů od hostitele (Lazar and Tabor, 2021).

Tím mohou organismy získávat živiny, reagovat na stres nebo si vyměňovat informace s jinými buňkami, aby koordinovaly vývoj a přizpůsobily se změnám prostředí nebo v případě patogenů a komenzálů svému hostiteli (Jacob-Dubuisson et al., 2018; Jung et al., 2018). Četnost TCS v jednom organismu je rovněž odrazem jeho vývojové komplexity: jednoduché patogenní intracelulární bakterie žijící v homeostatickém prostředí kódují pouze několik TCS. Naopak u bakterií, které žijí ve vysoce konkurenčním prostředí, jako jsou streptomycety, jsou TCS hojné a pro rychlou adaptaci na environmentální a nutriční změny zásadní.

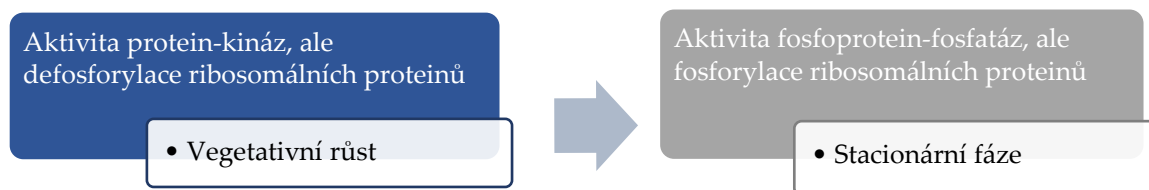
Pokroky ve výzkumu TCS u několika streptomycet (například *S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. antibioticus* a *S. lividans*) umožnily navýšit produkci antibiotik nebo dokonce jejich produkci spustit, pokud jsou jejich biosyntetické dráhy kódovány v kryptických genových shlucích, jež nejsou aktivovány za standardních laboratorních podmínek (Rodríguez et al., 2013).

### 2.3.2 Fosforylace proteinů jako nástroj modifikace aktivit signálního a translačního systému u streptomycet

Svou diplomovou práci jsem vykonával u pana RNDr. Jiřího Janečka, CSc. Věnovali jsme se spolu protein-kinázovým a fosfoprotein-fosfatázovým aktivitám jako nástrojům přenosu signálů z prostředí a odpovědí ve smyslu koordinace vývojových etap buněčného cyklu streptomycet (Bobek et al., 2000). Protein-kináza ze *S. granaticolor* Pkg2 je autofosforylována na threoninu a serinu (Nádvořník et al., 1999). Tento enzym byl ve svém fosforylovaném stavu použit jako substrát pro testování aktivit fosfoprotein-fosfatáz, přítomných v bezbuněčném extraktu mycelia této bakterie. Úroveň aktivity fosfoprotein-fosfatáz byla určena z inhibice fosforylační aktivity Pkg2. V našem experimentu přítomnost bezbuněčného extraktu způsobila defosforylaci Pkg2. Míra této defosforylace byla přitom přímo úměrná jednak množství bezbuněčného extraktu, jednak reakční době. Aby se prokázalo, že bezbuněčný extrakt fosfoprotein-fosfatázy skutečně obsahuje, byly v dalších experimentech do reakční směsi přidány specifické inhibitory fosfoprotein-fosfatáz. Přítomnost inhibitorů fosfatáz potlačila de-fosforylaci již fosforylovaných proteinů. Na základě těchto experimentů lze usuzovat, že je u streptomycet míra fosforylace proteinů vyšší v průběhu vegetativní fáze růstu, zatímco při diferenciaci vzdušného mycelia je již protein-kinázová aktivita výrazně utlumena a převažuje aktivita fosfatázová.

Po dokončení diplomové práce jsem přešel ke spolupráci s panem Doc. Karlem Mikulíkem, DrSc. U něj jsem zpočátku navázal na studium fosforylačních modifikací proteinů, nyní se zaměřením na ribozomy. Ověřovali jsme, zda fosforylace ribozomálních proteinů umožňuje regulovat aktivitu translačního aparátu. Naše experimenty, provedené pomocí *in vitro* translace poly-(U) na dvou modelech streptomycet, *S. collinus* (Mikulík et al., 2001) a *S. coelicolor* (Mikulík et al., 2011), ukázaly zvýšenou aktivitu ribozomů, pokud jsou ribozomální proteiny defosforylovány (Obr. 4). Fosforylací je dotčena především peptidyltransferázová aktivita. Lze se domnívat, že fosforylace ribozomálních proteinů přirozeně reguluje translační aktivitu, aby organismus mohl pružně reagovat na měnící se podmínky prostředí, včetně nedostatku živin, a koordinovat vývojové přechody, včetně morfologické diferenciaci a produkce antibiotik.

V následných experimentech, prováděných především mou tehdejší kolegyní, Ing. Petrou Palečkovou, jsme s pomocí specifických inhibitorů protein-kinázové aktivity ukázali vliv fosforylace proteinů na germinaci spor. Pokud byla aktivita protein-kináz utlumena, docházelo ke zpomalení přechodu do vegetativní fáze růstu. Ačkoliv v této práci nešlo zcela vyloučit další inhibiční efekty použitých látek, dosažené výsledky korelují se závěry výše zmíněné práce (Bobek et al., 2000), naznačující převahu fosforylačních aktivit během vegetativní fáze růstu, zatímco při vývoji vzdušného mycelia a spor, tedy při přechodu do dormantního stavu převažuje aktivita fosfoprotein-fosfatáz.



**Obrázek 4.** Fosforylační aktivita v průběhu buněčného cyklu.

### 2.3.3 Diskuse: Ohlasy na naše články o fosforylacích proteinů streptomycet

Nejvyšší míry citovanosti k tomuto tématu (dohromady 30 ke dni 11. 11. 2023) dosáhly naše dva články týkající se fosforylace ribozomálních proteinů. Práce, které nás citují, se zabývaly například fosforylacemi ribozomálních proteinů u *E. coli* (Soung et al., 2009), ale také u savčích mitochondrií (Miller et al., 2009). Následují články analyzující celkový fosfoproteom u dalších druhů bakterií, jakými jsou *B. subtilis* (Rosenberg et al., 2015), *M. tuberculosis* (Fortuin et al., 2015), *Saccharopolyspora erythraea* (Licon-Cassani et al., 2014), *Zymomonas mobilis* (Tatli et al., 2019).

Autoři studie fosforylačních aktivit ribozomálních proteinů *E. coli* (Soung et al., 2009), kteří citují obdobnou naši studii provedenou na streptomycetách (Mikulik et al., 2001), detekovali fosforylaci u proteinů S3, S4, S5, S7, S11, S12, S13, S18 a S21 malé podjednotky (30S) a u proteinů L1, L2, L3, L5, L6, L7/L12, L13, L14, L16, L18, L19, L21, L22, L28 a L31 velké podjednotky (50S).

Zajímavá je studie fosforylací ribozomálních proteinů u savčích mitochondrií (Miller et al., 2009). Je známo, že mitochondrie mají vlastní translační aparát, který je zodpovědný za syntézu 13 mitochondriálně kódovaných proteinů pro oxidativní fosforylaci, která pro eukaryotní buňky generuje až 90% energie. Autoři identifikovali 24 mitochondriálních ribozomálních proteinů fosforylovaných na aminokyselinách serinu, threoninu nebo tyrosinu, podobně jako tomu bývá u bakterií. V jiné studii (Miller et al., 2008) pak stejná skupina autorů prokázala, že posttranslační modifikace ribozomálních proteinů fosforylací i acetylací modifikuje funkci mitoribozomu. Fosforylace ribozomálních proteinů vede k inhibici syntézy proteinů v *in vitro* translačním systému, stejně jako u streptomycet v naší publikované studii. Navíc fosforylace jednoho z ribozomálních proteinů, DAP3, který je pro-apoptotický, je důležitá pro jeho roli při indukci apoptózy.

U *B. subtilis* (Rosenberg et al., 2015) byla analyzována dynamika Ser/Thr/Tyr fosfoproteomu v průběhu germinace endospor. Mezi fosforylovanými proteiny byly identifikovány složky centrálního metabolismu, zahrnující transkripci, translaci, metabolismus uhlíku a komponent specifických pro spory. Fosfoproteom analyzovaný z počátku exponenciálního růstu mykobakterie zahrnoval 214 proteinů fosforylovaných na 414 Ser/Thr/Tyr zbytcích. Z hlediska

funkčního zahrnovaly tyto fosforylované proteiny virulenční faktory, regulačních proteiny, složky metabolismu lipidů, energetického metabolismu, replikace a exprese genetické informace a syntézy buněčné stěny.

V průběhu celého životního cyklu byly sledovány změny fosfoproteomu u aktinomycety *Saccharopolyspora erythraea*, která produkuje první klinicky využívané makrolidové antibiotikum erytromycin (Oliynyk et al., 2007). Celkem byla detekována fosforylace u 88 proteinů. K výrazným změnám fosforylace docházelo především ve stacionární fázi buněčného cyklu u enzymů centrálního metabolismu uhlíku, jako například acetyl-koenzym A karboxyláza, isocitrát lyáza a 2-oxoglutarát dehydrogenáza. Autoři se domnívají, že vyšší míra fosforylace těchto enzymů znamená jejich zvýšenou aktivitu, která je potřeba pro syntézu prekurzorů vedoucích k produkci antibiotik.

*Zymomonas mobilis* je fakultativně anaerobní alfaproteobakterie, která je využívána pro průmyslovou výrobu biopaliv, především etanolu (Martien et al., 2019). *Z. mobilis* také disponuje nitrogenázou a dokáže účinně fixovat atmosférický dusík, aniž by to ovlivnilo výtěžek etanolu (Kremer et al., 2015). Analýza fosfoproteomu u této bakterie odhalila 125 fosforylovaných proteinů, mezi nimiž jsou enzymy metabolických drah, jako je glykolýza, Krebsův cyklus, transport elektronů, metabolismus dusíku a syntéza proteinů. Kvantitativní analýza fosforylovaných proteinů mimo jiné ukázala zvýšenou fosforylací enzymů glykolýzy a ribozomálních proteinů během aerobních podmínek, ale také v podmínkách anaerobních při fixaci dusíku.

Kromě článků analyzujících fosfoproteom u různých bakterií nás v jednom případě citovali autoři studie, v níž hledali nové terapeutické cíle pro vysoce rezistentní *Streptococcus agalactiae* sérotyp III (Favero et al., 2020). Jde o invazivního patogena, který v roce 2015 způsobil v Singapuru závažnou epidemii, která postihla i mladší a imunokompetentní jedince, včetně netěhotných žen (Kalimuddin et al., 2017). Jednalo se o první dokumentovaný případ infekce spojené s konzumací syrových ryb z chovu (Tan et al., 2016). Navíc byla u tohoto sérotypu zaznamenána rezistence na pět tříd antibiotik (možná právě vzhledem k možnému nadužívání antibiotik v rybích chovech, pozn. autora). Autoři se domnívají, že tato bakterie může sloužit jako rezervoár genů antibiotické rezistence, a proto ve své studii pomocí bioinformatických nástrojů poukázali na pět proteinů jako potenciálních cílů pro nová léčiva. Jedním z těchto proteinů je ribozomální protein L19, který je zodpovědný za spojení malé a velké ribozomální podjednotky, a je proto zásadní pro translaci (Persson et al., 1995; Soung et al., 2009). Autoři studie nás citují v souvislosti s naším zjištěním, že fosforylace proteinu L19 na aminokyselinových zbytcích Ser, Thr a Tyr snižuje aktivitu ribozomů až o 50 % (Mikulik et al., 2001).



## 2.4 Germinace streptomycet

*Svou postdoktorskou pozici jsem zahájil v Laboratoři bioinformatiky u pana doktora Jiřího Vohradského: „Germinace streptomycetích spor je úžasný model pro ty naše matematické simulace, protože vychází z nulového stavu...“ Jirka je výborný vědec, ale zároveň skvělý diplomat, psycholog a sportovec. „Kouzlo matematického přístupu je v tom, že z dat o genové expresi můžu modelovat regulační sítě, což pak ušetří spoustu experimentů. Je například zbytečné zkoumat, zda se potenciální regulátor a regulovaná molekula k sobě váží in vitro, když vím, že se ve skutečnosti spolu vůbec nepotkají...“ Pro mě je vždy radost s ním mluvit, protože vím, že můžeme mluvit o čemkoliv.*

### 2.4.1 Literární přehled: Dormance a probouzení

Pro mnoho bakterií a hub je přechod do dormantního stavu důležitou strategií přežití nepříznivých podmínek. V dormantním stavu zastavují svůj růst, nemnoží se a diferencují se do metabolicky neaktivních forem, které jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám. Exospory, známé také jako arthrospory se však tvoří jen u některých bakteriálních rodů spadajících především do třídy *Actinomycetia*. Kromě řádu *Actinomycetales*, kam patří i rod *Streptomyces*, jde například o rody *Micromonospora* nebo *Cryptosporangium*. Tyto exospory se morfologicky i funkčně výrazně liší od endospor bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Endospory jsou velmi odolné vůči různým stresům, což jim umožňuje přežít i extrémní podmínky. Na druhou stranu exospory se více podobají sporám eukaryotních hub. To je pravděpodobně dáno analogií vývoje v půdním prostředí. Společnou charakteristikou spor je tlustá buněčná stěna doplněná vnějšími obaly a dehydratace. U streptomycet je vnější obal označován jako rodletová vrstva, která je tvořena vláknitými proteiny chapliny a rodliny (Claessen et al., 2004), společně vytvářející texturu připomínající proutěný košík. Dehydratovaný stav sporám zajišťuje odolnost proti teplotním extrémům a dalším fyzikálním a chemickým účinkům. Dehydratace však také vede k nehybnosti a změně konformace makromolekul, ke kondenzaci nukleových kyselin a k neaktivním formám proteinů. Aby se proteiny a mRNA v cytoplazmě dehydratovaných exospor uchovaly, jsou stabilizovány prostřednictvím vodíkových vazeb v prostředí trehalózy. Trehalóza je označována jako multiprotektivní cukr, neboť zajišťuje ochranu proti teplotním extrémům, vysušení, radiaci či oxidativnímu stresu (Fillinger et al., 2001). Jde o dimer dvou molekul glukózy spojených  $\alpha, \alpha$ -1,1-glykosidickou vazbou, který může tvořit až 25 % suché hmotnosti spory (McBride and Ensign, 1987). Následně je trehalóza využívána jako vnitřní zdroj energie pro počáteční fáze klíčení. U endospor vykonává funkci stabilizátoru makromolekul kyselina dipikolinová (DPA). DPA tvoří až 15 % suché hmotnosti zralých endospor a zajišťuje sporám odolnost vůči teplu (Setlow, 2006).

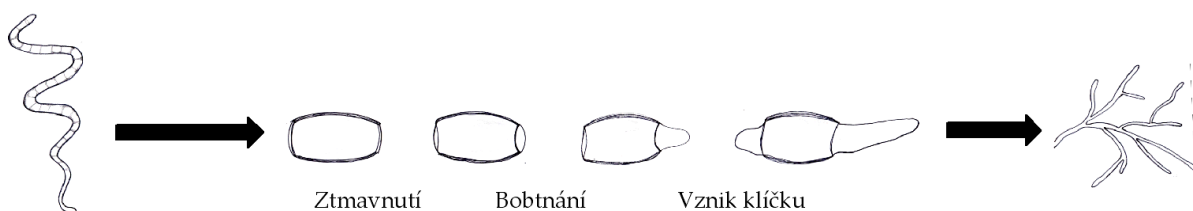
Samotné klíčení je založené na kompletní rekonstrukci buněk, která zahrnuje vysokou metabolickou aktivitu a morfologické změny, které začínají odstraněním povrchových obalů a rekonstitucí buněčného obsahu. Klíčení exospor je sekvenční proces, který lze rozdělit do tří

odlišných kroků (definovaných podle (Hardisson et al., 1978)): (i) ztmavnutí spor, (ii) bobtnání a (iii) růst klíčku (Obr. 5). Toto původní členění procesu germinace jsem se ve svém přehledovém článku pokusil popsat v kontextu s našimi současnými znalostmi (Bobek et al., 2017).

(i) Ztmavnutí je spojeno s rekonstrukcí buněčné stěny. Spory ztrácejí hydrofobní povahu, což vede k počátečnímu průniku vody. Tento proces mění optické vlastnosti spor a umožňuje buňkám znovu aktivovat metabolismus. Ztmavnutí je způsobeno ztrátou lomu světla, což vyžaduje přítomnost bivalentních kationtů  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Hardisson et al., 1978; Eaton and Ensign, 1980; Salas et al., 1983). Vápník a hořčík jsou vázány karboxylovými skupinami peptidoglykanu a polyfosfátovými skupinami teichoové kyseliny ve stěně spor (Thomas and Rice, 2014). Během odstraňování sporových obalů jsou reaktivovány hydrolázy, které štěpí kovalentní vazby uvnitř vrstvy peptidoglykanu. Tím zprostředkovávají rekonstrukci buněčné stěny, což umožňuje vstup externích živin (Haiser et al., 2009).

(ii) Bobtnání je způsobeno pokračujícím průnikem vody do spor. Účinkem enzymu trehalázy dochází v buňkách k výraznému poklesu hladiny trehalózy, což naopak vede ke zvýšení hladiny glukózy (McBride and Ensign, 1987). Tím je zajištěn zdroj energie pro reaktivaci enzymů a opětovné spuštění metabolismu. Aktivované spory mohou detekovat vnější zdroje živin a na stav vnějšího prostředí začínají odpovídat spuštěním patřičných metabolických drah. Tato fáze je kontrolována různými regulátory genové exprese, které ovlivňují transkripci (BldD, Crp protein nebo sigma a anti-sigma faktory) a translaci (RNáza III), jak jsme zjistili ve svých expresních analýzách (Strakova et al., 2013a; Strakova et al., 2013b).

(iii) Vznik klíčku je jev již pozorovatelný mikroskopicky a zajišťuje růst apikálních hyf. Klíčky se objevují na vnitřní stěně spor a postupují skrz vnější vrstvu. Důležitou roli hraje chaperoninový protein SsgA, který lokalizuje místa vzniku klíčku (Noens et al., 2007). Dalšími klíčovými proteiny jsou DivIVA, FtsZ a FilP, které jsou zodpovědné za tvorbu nových hyf a vegetativní růst (Grantcharova et al., 2005; Flärdh et al., 2012; Kelemen, 2017). Tím nakonec dochází k přechodu od fáze germinace k vegetativnímu buněčnému růstu.



**Obrázek 5.** Schéma germinace streptomycet. Zleva: vzdušné mycelium nesoucí řetězky spor; klíčící spory reprezentující jednotlivá stadia germinace; rostoucí a větvcící se hyfy substrátového mycelia. Autorská ilustrace. Převzato z (Bobek et al., 2017) a upraveno.

## 2.4.2 Systémová analýza genové exprese při germinaci spor

Před systémovými analýzami genové exprese v průběhu germinace spor nás nejprve zajímala odpověď na otázku, jakým způsobem jsou dormantní spory připraveny na reaktivaci svého metabolismu. Zaměřili jsme se na připravenost proteosyntetického aparátu (Mikulík et al., 2002). Modelovým organismem byl zvolen *S. granaticolor*, jehož spory klíčí rychle a vcelku synchronně. Navození maximální synchronnosti procesu klíčení spor bylo pro tyto experimenty nezbytné. Proto byly spory nejprve uměle aktivovány, což se provádí mechanickou disrupcí sporového pláště následovanou teplotním šokem. Aktivované spory byly potom značeny *in vivo* po dobu 30 minut radioaktivním [<sup>35</sup>S]-cystein / methioninem přítomným v kultivačním médiu. Do média byl navíc přidán rifamycin – antibiotikum, které blokuje iniciaci transkripce (Campbell et al., 2001; Feklistov et al., 2008). I přes takto zablokovanou *de novo* transkripci bylo pomocí dvourozměrné proteinové elektroforézy detekováno několik stovek radioaktivních – tedy nově syntetizovaných – proteinů. Tyto experimenty ukázaly, že dormantní spory disponují zásobou molekul mRNA, jež zřejmě byly, vzhledem k metabolické inaktivitě v dormantním stavu, nasyntetizovány ještě ve fázi sporulace a maturace spor. Předpokládali jsme, že tato zásoba mRNA kóduje tzv. early proteins, tedy proteiny potřebné pro počáteční fázi klíčení.

V návazné pilotní systémové studii byly synchronně klíčící spory použity k proteomické analýze aktivovaných a nově syntetizovaných proteinů (Bobek et al., 2004). Vzhledem k absenci vody obsahují dormantní spory agregované proteiny. Tato práce odhalila, že se v průběhu klíčení syntetizuje velké množství chaperonů (DnaK, Trigger factor a GroEL), o nichž se domníváme, že reaktivaci dosud neaktivních proteinů napomáhají. Funkce chaperonů je rovněž ovlivněna fosforylací. Nově syntetizované proteiny byly výše popsanou metodou značeny v pěti navazujících časových úsecích a následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Identifikované proteiny byly přiřazeny do funkčních skupin a rozděleny do šesti kinetických skupin, které odpovídají jednotlivým fázím germinace: (i) early proteins (0-30 min), (ii) proteiny syntetizované před první replikací DNA (0-60 min), (iii) proteiny syntetizované během první replikace DNA (60-80 min), (iv) proteiny syntetizované po první replikaci DNA (90-120 min), (v) proteiny syntetizované ve fázi mikroskopicky patrných germinačních klíčků (90-300. min), (vi) proteiny syntetizované ve fázi prvních vláken (210-300 min).

V navazující práci (Strakova et al., 2013a) jsme přistoupili k podrobnému zmapování kinetiky exprese proteinů detekovaných v průběhu germinace spor *S. coelicolor*, jehož genom byl v té době – na rozdíl od *S. granaticolor* - již osekvenován a nejlépe anotován (Bentley et al., 2002). Hladiny exprimovaných proteinů byly mapovány během celého průběhu klíčení. Podle takto zjištěné kinetiky exprese byly akumulované (tedy všechny detekované) a nově syntetizované (tedy radioaktivní) proteiny seskupeny do definovaných kinetických a funkčních skupin. Výsledky ukázaly, že schopnost dormantních spor přejít do aktivního metabolismu je zajišťována již ve fázi sporulace přípravou složek proteosyntetického aparátu, chaperonů a

hydroláz, což umožňuje rychlé zahájení globální exprese proteinů během prvních 10 minut kultivace. Zatímco chaperony jsou nezbytné pro opětovné aktivování přítomných proteinů po jejich hydrataci (Bobek et al., 2017), hydrolázy napomáhají obnově buněčné stěny klíčících spor (Bobek et al., 2004; Haiser et al., 2009). V průběhu první hodiny pak byla syntetizována většina proteinů; již v této fázi byly detekovány proteiny energetického metabolismu, transportní proteiny a pleiotropní regulátory (především cAMP-receptor Crp, RNáza III a BldG). Od tohoto stadia lze tudíž předpokládat kompetentnost buněk reagovat na signály z prostředí. Zajímavé bylo zjištění syntézy cytoskeletových proteinů DivIVA, FilP a FtsZ, které kontrolují apikální růst a proces dělení buněk (Fröjd and Flärdh, 2019).

V rámci našich systémových studií germinálního procesu byla kromě proteomického přístupu aplikována také microarray analýza transkriptomu (Strakova et al., 2013b). Vzhledem k tomu, že proteomický přístup detekuje řádově stovky proteinů, zatímco čipová analýza odhalí tisíce transkriptů, nelze z obou metod získaná data snadno porovnávat. Proto byla bioinformatická analýza v této práci založena na identifikaci hlavních komponent, které umožňují porovnávat reprezentativní vzory kinetických profilů genové exprese (tzv. principal component analysis). V takovém případě byla zjištěna vysoká míra korelace nově syntetizovaných proteinů a jejich transkriptů.

Získaná data potvrdila, že v dormantních sporách již existuje relativně vysoký počet mRNA molekul. Tento výsledek je v souladu s našim dřívějším (výše zmíněným) zjištěním (Mikulik et al., 2002). Dokonce se ukázalo, že aktivita transkripčního aparátu byla nejvyšší na počátku germinace a postupně klesala až do konce pozorovaného období.

Získaná transkriptomická data jsme následně ještě jednou využili pro bioinformatickou analýzu, která měla ozřejmit, které geny jsou důležité pro jednotlivé fáze germinace (Bobek et al., 2014). Proto jsme identifikovali takové geny, jejichž exprese se v určitém časovém bodě výrazně liší (vzroste nebo klesne). Tyto geny byly poté zařazeny do metabolických a regulačních drah. Tento přístup odhalil časování aktivace konkrétních drah během klíčení. Zajímavým zjištěním byly změny v expresi konkrétních sigma faktorů. To nastínilo jejich úlohu během klíčení. Mezi faktory, jejichž exprese byla zvýšena během počáteční fáze klíčení, patří SigE, který pravděpodobně řídí obnovu buněčné stěny, SigR, který kontroluje opětovné seskupování proteinů, a další (SigH, SigB, SigI, SigJ), které ovládají reakce na osmotický a oxidační stres. Z analýzy exprese genů kódujících sigma faktory plyne, že fyziologický proces germinace je kontrolován podobným způsobem, jako je řízena genová exprese ve stresových podmínkách.

### 2.4.3 Sekundární metabolity produkované při germinaci spor

Výše popsané analýzy genové exprese při germinaci spor mimo jiné odhalily v této počáteční vývojové fázi aktivitu některých genů (konkrétně 163) z rozličných biosyntetických genových shluků, které zajišťují produkci sekundárních metabolitů. Proto nás napadlo svůj další výzkum zaměřit na prošetření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace *S. coelicolor*, a to navzdory tomu, že aktivita sekundárního metabolismu streptomycet byla do té doby připisována výlučně přechodu do stacionární fáze životního cyklu (Seipke et al., 2012), zatímco germinace byla fází neproduktivní. Produkované metabolity jsme měřili pomocí HPLC-MS a odhalili jsme přítomnost seskviterpenoidního antibiotika albaflavenonu a dvou polyketidů - germicidinu A a chalkonu. Tyto metabolity mohou sloužit ke koordinaci růstu populace jejich producenta, prostřednictvím mechanismu označovaného jako quorum sensing (Phelan et al., 2011). Tento mechanismus umožňuje mikroorganismům vzájemnou komunikaci a regulaci genové exprese na základě hustoty populace a stavu vnějšího prostředí. Tak například spory *S. viridochromogenes* klíčí samy pomaleji než v husté populaci (Xu and Vetsigian, 2017). Na druhé straně bylo zjištěno, že bezbuněčný extrakt ze supernatantu *S. viridochromogenes* inhibuje klíčení spor (Hirsch and Ensign, 1976). Je to právě kvůli přítomnosti inhibitoru klíčení germicidinu A, který byl již dříve izolován (Petersen et al., 1993; Aoki et al., 2011; Ma et al., 2017) a jehož produkci jsme tímto potvrdili i u *S. coelicolor*. Zároveň jsme ukázali, že nejen germicidin A, ale rovněž přítomnost chalkonu zabrání klíčení dalších spor. Na druhou stranu látku, která by germinaci naopak aktivovala, se nám najít nepodařilo. Albaflavenon v našich experimentech klíčení žádným způsobem neovlivnil. Je o něm však známo, že má antibakteriální účinek na *Bacillus subtilis* (Gürtler et al., 1994), což může ve prospěch streptomycet ovlivnit podmínky silně konkurenčního půdního prostředí. Celkově tak může biologická aktivita metabolitů uvolněných na začátku klíčení, ať už se jedná o germinační aktivátory či inhibitory, sloužit jako signál mezibuněčné komunikace a přizpůsobit strategii klíčení přírodním podmínkám (Rutherford and Bassler, 2012; Brachmann et al., 2013).

### 2.4.4 Diskuse: Ohlasy na naše články o germinaci spor streptomycet

Svůj dosavadní výzkum v oblasti germinace spor streptomycet jsem následně shrnul v kontextu s ostatními publikovanými pracemi souvisejícími s touto problematikou v přehledovém článku: „A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in Streptomyces“ (Bobek et al., 2017). Zabýval jsem se zde mimo jiné tématem dormance mikroorganismů. Tento přehledový článek je ke dni 11. 11. 2023 citován 24krát.

V jedné ze studií citujících náš přehledový článek autoři použili kryo-elektronovou tomografii, aby sledovali růst a morfologickou diferenciaci buněk u *Streptomyces albus* (Sexton and Tocheva, 2020). Kryo-elektronová tomografie uchovává buňky v jejich přirozeném stavu a umožňuje trojrozměrné pozorování s rozlišením kolem 4 nm (Tocheva et al., 2010). Autoři

potvrdili, že během sporulace dochází k dramatické přestavbě buněčného obalu, včetně formace stěny spor a dvou ochranných proteinových vrstev. Pozorování germinace spor autorům umožnilo porovnat morfologii dormantních a vegetativních buněk. Buněčná stěna spory je asi 60 nm tlustá, ale vrstva peptidoglykanu u rostoucího klíčku je o poznání tenčí - už jen asi 35 nm. Peptidoglykan ve vegetativní části navazuje na vnitřní část sporového obalu, zatímco vnější vrstva spory včetně svrchního rodletového pláště se odlupuje na místě, kde vegetativní klíček vystupuje.

Ve svém přehledovém článku pak autoři z téže výzkumné skupiny shrnuli rozdíly mezi endosporami a exosporami (Beskrovnaya et al., 2021). Zmiňují, že sporulace probíhá u mikroorganismů různými způsoby, z nichž mnoho nebylo dosud důkladně prozkoumáno. Jde například o tvorbu akinet u cyanobakterií, pučení spor u kmene *Chloroflexi* či tvorba plodniček (fruiting bodies) u myxobakterií (Kaplan-Levy et al., 2010; Yabe et al., 2010; Muñoz-Dorado et al., 2016). Naopak nejpodrobněji prostudované mechanismy sporulace zahrnují tvorbu endospor zejména u tříd *Bacilli* a *Clostridia* kmene *Firmicutes* a tvorbu exospor u aktinobakterií. Kmen *Firmicutes* je tradičně odlišovanou skupinou grampozitivních bakterií majících ve svém genomu nízký podíl guaninu a cytosinu (G+C báží). Avšak se současným rozvojem taxonomie založené na genomu bylo takovéto zařazení zpochybněno objevem bakterií kmene *Firmicutes* s naopak relativně vysokým obsahem G+C báží v genomu (například *Geobacillus*) nebo dokonce bakterií téhož kmene s klasickou gramnegativní buněčnou stěnou (například *Acetonema longum*, třída *Negativicutes*) (Yutin and Galperin, 2013).

Naproti tomu někteří zástupci kmene *Actinobacteria*, tedy kmene naopak s vysokým podílem G+C báží v genomu, tvoří exospory. Zatímco endospory se diferencují ve spory současně s asymetrickým dělením, u exospor dochází k diferenciaci již předtím rozdělených buněk (Hoskisson and van Wezel, 2019). Speciace uvnitř aktinobakterií vedla k široké škále možností tvorby exospor, od jednotlivých spor produkovaných na nesespecializovaných myceliích, po tvorbu sporangí. Nejlépe charakterizované jsou však dlouhé řetězce exospor produkované streptomycetami (McCormick and Flärdh, 2012). Citováno je také naše zjištění, že již v dormantních exosporách streptomycet jsou přítomné některé proteiny a mRNA využívané během klíčení (Mikulík et al., 2002; Strakova et al., 2013a). V této souvislosti je zajímavé, že také dormantní fáze vyšších organismů disponují předem připraveným transkriptomem a proteomem, který je potřebný pro nejrannější fáze následujícího vývoje. Jako příklady těchto dormantních forem lze uvést suchá semena rostlin (Weitbrecht et al., 2011), neoplozená vajíčka živočichů (Minami et al., 2007), či spory hub a plísní (Baltussen et al., 2020).

Pomocí LC-MS/MS byl charakterizován proteom v klíčících endosporách rodu *Bacillus* (Sinai et al., 2015). Bylo zjištěno, že pro počáteční fáze klíčení spor je nezbytná přítomnost enzymů, které dokáží využít dosažitelné zdroje energie. Například na povrchu spor *Bacillus thuringiensis* je přítomný 140 kDa  $\delta$ -endotoxin, jenž nese enzymatickou aktivitu  $\beta$ -glukosidázy a může využívat širokou škálu substrátů k produkci glukózy jako látky aktivující klíčení (Papalazaridou et al., 2011). Přítomnost aktivní  $\beta$ -glukosidázy byla vedle rodu *Bacillus*

detekována námi při klíčení *S. granaticolor*, jak je v práci citováno. Z hlediska dalšího porovnání germinálních procesů mezi endosporami a exosporami je zajímavá vysoká aktivita chaperonů a enzymů pro modifikace proteinů, obdobně jako tomu bylo v případě streptomycet popsaném v našich publikacích (Bobek et al., 2004; Strakova et al., 2013a; Strakova et al., 2013b). Tato zjištění ukazují na jednotnou formu reaktivací proteinů a koordinace funkcí enzymatického aparátu v klíčících sporách napříč různými bakteriálními druhy.

A. Manteca (Manteca et al., 2006) provedl/a proteomickou analýzu nikoliv na příkladu klíčících spor, ale v průběhu programované buněčné smrti u *S. coelicolor*. Programovaná buněčná smrt (apoptóza) představuje aktivní formu usmrcení specifických buněk v rámci organismu, která kromě eukaryot probíhá také u bakterií. Avšak na rozdíl od eukaryotické apoptózy jsou molekulární mechanismy regulující apoptózu u bakterií málo známé. U streptomycet probíhá významná fáze apoptózy vegetativního mycelia při formaci vzdušných hyf před sporulací. A podobně, jako je tomu u germinace, také u procesu apoptózy autoři studie zjistili, že dochází k nárůstu aktivity enzymů účastnících se degradace buněčných makromolekul, regulačních proteinů a proteinů indukovaných stresem. Několik stresových proteinů, jako jsou chaperony SCO4296, SCO4762 a SCO2554 nebo peptidyl-prolyl isomerázy SCO2620 (trigger factor) a SCO1638, proces apoptózy přímo doprovází. V této souvislosti byla citována námi zjištěná účast těchto chaperonů na reaktivaci proteinů při germinaci spor *S. granaticolor* (Bobek et al., 2004). Podobná souvislost byla zaznamenána i pro enzym PNPáza (SCO5737). Tento enzym degradující RNA (Bernstein et al., 2004) je důležitý pro zajištění přestavby transkriptomu, k němuž dochází právě ve fázích morfologické diferenciaci nebo ve stresových podmínkách.

Biologická funkce dalších proteinů SCO2368 a SCO4277 zůstává nejasná, i když byly také zapojeny do vývojových procesů, jako je germinace nebo apoptóza. Zajímavé je, že tyto proteiny mají doménu vázající cAMP, a mohou se tedy účastnit intracelulární signalizace, stejně jako je tomu u proteinu Crp (cAMP-receptor protein). Je známo, že mutace genu *crp* vede k výrazným defektům u klíčících spor (Süsstrunk et al., 1998; Derouaux et al., 2004). V návaznosti na naši studii germinace *S. granaticolor* A. Piette (Piette et al., 2005) analyzoval/a rozdíly v proteomu mezi sporami divokého typu *S. coelicolor* a jeho kmeny s *crp* mutací. Autoři zjistili, že Crp reguluje mimo jiné aktivity ATP syntázy, hydrolázy buněčné stěny a chaperonů, tedy proteinů pro správný průběh klíčení nezbytných.

Měď byla charakterizována jako pozitivní regulátor diferenciaci vzdušného mycelia, sporulace a produkce antibiotik u streptomycet (Ueda et al., 1997; Keijser et al., 2000). To přimělo autory studie (González-Quiñónez et al., 2019) zkoumat koncentraci mědi v cytosolu také v průběhu germinace a v souvislosti s expresí genů kódujících dva systémy pro sekreci mědi u *S. coelicolor* (SCO2730/2731 a SCO1045/1046). Autoři zjistili, že během klíčení koncentrace mědi v cytosolu rychle klesá. Zároveň s tím dosáhla exprese genů chaperon-transportního systému SCO2730/2731 nejvyšší úrovně (na rozdíl od nízké exprese genů SCO1045/1046). Navíc byl proces germinace výrazně synchronizován a urychlen u spor s vyšší

intracelulární koncentrací mědi. Naše práce byly těmito autory citovány právě v souvislosti se synchronností klíčení, jakožto důležitým aspektem studia germinace spor.

Náš výzkum germinace streptomycet byl dokonce citován ve studii, jež mapovala transkriptom v průběhu klíčení spor prvoka *Spongospora subterranea*, který způsobuje prašnou strupovitost brambor (Balotf et al., 2021). Autoři této studie identifikovali 679 transkriptů s různou úrovní exprese. Většina proteinů kódovaných těmito transkripty byla zapojena do energetického metabolismu, transkripce a translace, biosyntézy aminokyselin, transportu, metabolismu mastných kyselin, reakce na stres, opravy DNA a transferázové aktivity. Nalezené funkční skupiny proteinů korelují s našimi, zde citovanými, výsledky, a naznačují tak možné obecné principy mechanismů klíčení spor i u velice fylogeneticky vzdálených mikroorganismů.



## 2.5 Hemolytická aktivita a produkce antifungálních látek

Na svém dosavadním působišti v ÚIM jsem obklopen mnoha úžasnými lidmi, kteří mi neváhali pomoci, kdykoliv jsem to potřeboval. Ale ve svém oboru biologie streptomycet jsem zůstával dlouhou dobu sám nemaje možnost konzultace nebo jen takové nezávazné diskuse. O to víc mě potěšilo, když jsem měl v roce 2017 najednou tu úžasnou příležitost přivítat na našem pracovišti paní doktorku Kateřinu Petříčkovou. „Hele, ty ses chtěl věnovat těm aktivacím kryptických klastrů\* a mě zajímají asociace streptomycet s jinými organismy. Oba jsme nyní na 1. LF UK, tak to do sebe pěkně zapadá...“ O rok později jsme do týmu přibrali i pana doktora Miroslava Petříčka a pustili se do práce více zaměřené na klinický význam streptomycet. Rád přiznávám, že manželé Petříčkovi mi přinesli spoustu nápadů a motivace k další práci. V obou nacházím své parťáky pro všední pracovní dny.

\* za standardních laboratorních podmínek neexprimované geny biosyntetických drah

### 2.5.1 Literární přehled: Streptomycety asociované s hostitelským organismem

Streptomycety mohou být kromě půdy součástí mnoha dalších ekosystémů, například mořské vody, třetihorních sedimentů nebo guáno netopýrů (Kämpfer et al., 2014). Některé druhy jsou dokonce schopny vstoupit do úzkých symbiotických vztahů s rostlinami a živočichy, zejména bezobratlými (Kaltenpoth et al., 2005a; Behie et al., 2016). V rámci těchto vztahů streptomycety poskytují antibiotika k ochraně hostitele nebo k ochraně zdrojů hostitele před patogeny (Kaltenpoth, 2009). V téměř všech popsanych případech se ukázalo, že streptomycety chrání své hostitele nebo jejich potravní zdroje před patogenními houbami (Kellner, 2002; Oliver et al., 2003; Kaltenpoth et al., 2005b; Scarborough et al., 2005; Teixeira et al., 2008). Na druhé straně jim hostitelský organismus zajistí dostatek živin a ochranu.

Ze symbióz s bezobratlými je nejčastěji dokumentována interakce streptomycet se zástupci hmyzu (Kaltenpoth, 2009). Ale aktinobakterie také tvoří stabilní asociace s mořskými bezobratlými, především s mořskými houbami a homolicemi (Piel, 2004; Gulder and Moore, 2009).

Samotářské vosy rodu *Philanthus* tvoří endosymbiózu se kmenem *Candidatus Streptomyces philanthi* (Kaltenpoth et al., 2006). Samičky si v půdě hloubí podzemní díry, kde se vyvíjejí larvy. Nicméně kvůli teplým a vlhkým podmínkám v larválních komůrkách hrozí neustálé riziko zavlečení bakteriální nebo houbové infekce. Streptomycety rostou uvnitř specializovaných žláz na tykadlech samiček a jakmile samička vyhloubí svou díru, vylučuje sekret se streptomycetami (Kaltenpoth et al., 2005b; Kroiss et al., 2010). Streptomycety se začleňují do larválních kokonů a produkují antibiotika. Bylo zjištěno, že směs těchto antibiotik inhibuje řadu patogenních mikroorganismů (Kroiss et al., 2010). Jiným příkladem je blíže neurčená streptomyceta produkující kanducidin a antimycin, která žije v mutualistickém vztahu s mravenci rodu *Acromyrmex* (Haeder et al., 2009; Barke et al., 2010; Seipke et al., 2011).

Streptomycety rovněž vytvářejí rozmanité interakce s rostlinami. Vlákniťa morfologie streptomycetám umožňuje kolonizovat okolní kořeny a pronikat následně přímo do rostlinných buněk, a prostoupit tak do těla hostitele (Coombs and Franco, 2003b;a; Joshi et al., 2007). Stávají se tak benigními saprofyty, prospěšnými endosymbionty či rostlinnými patogeny.

## 2.5.2 Klinické izoláty streptomycet

Jelikož jsou streptomycety hojné v půdě a jejich spory se často dostávají do vzdušného prostředí, lze očekávat, že běžně vstupují i do lidského těla. Ovšem možnost, že jsou streptomycety také součástí přirozené mikrobioty lidského těla, nebyla po dlouhou dobu prokázána. Dokonce jsou dosud často v klinických laboratořích považovány za kontaminanty (Scharfen et al., 2010). Až molekulární data charakterizující lidský mikrobiom odhalila přítomnost rodu *Streptomyces* na kůži (Gallo and Hooper, 2012), v gastrointestinálním traktu (Bolourian and Mojtahedi, 2018), dýchacím traktu (Huang et al., 2015), a také v děloze (Collado et al., 2016). A právě streptomycety asociované s člověkem by mohly být producenty důležitých látek potenciálně uplatnitelných v humánní medicíně. Často je například dokumentována schopnost streptomycet produkovat metabolity specializované na savčí nebo přímo na lidské buňky, které mají imunomodulační (rapamycin, takrolimus) (Bolourian and Mojtahedi, 2018) nebo protinádorové účinky (mitomycin C, bleomycin, aktinomycin, doxorubicin a mnoho dalších) (Olano et al., 2009). Navzdory tomu je vědeckou komunitou možnost přirozené interakce streptomycet s člověkem spíše opomíjena. Kromě několika jasně patogenních kmenů způsobujících endemické aktinomykózy (*S. somaliensis*, *S. sudanensis*), není většinou klinický efekt streptomycet známý. Ani v případě těchto známých patogenů nebyly rozpoznány žádné specifické faktory virulence a ani se nic neví o molekulárních mechanismech jejich patogeneze. Obecně streptomycety způsobují supurativní granulomatózní změny tkání. Infekce začíná od povrchových struktur kůže. Pokud není léčena, postupuje do svalů, kostí a může se dokonce šířit lymfatickým systémem nebo krví a způsobit systémová onemocnění. Nicméně dlouhodobá antibiotická léčba je poměrně úspěšná (Relhan et al., 2017). Některá respirační onemocnění (např. pneumonie asociované se zemědělstvím) byla způsobena inhalací spor společně se spory mikromycet (Roussel et al., 2005; Cano-Jiménez et al., 2016).

Díky své spolupráci s několika českými mikrobiologickými laboratořemi, a to zejména s Národní referenční laboratoří pro patogenní aktinomycety v Trutnově a se Zdravotním ústavem v Ostravě, máme k dispozici unikátní sbírku více než sta kmenů streptomycet pocházejících z lidských vzorků. Vzorky streptomycet byly odebrány z bronchoalveolární laváže nebo hlenu pacientů s respiračními obtížemi. Schopnost streptomycet přežít v cílených kulturách mykobakterií umožnila jejich účinnou izolaci. Pacienti byli především lidé, kteří byli vystaveni zvýšené koncentraci prachových částic ze zemědělské činnosti nebo hornictví. Taxonomické určení a dlouhodobá péče o získané izoláty jsou prováděny na Ústavu půdní

biologie v Biologickém centru AV ČR pomocí taxonomie založené na sekvenci 16S rRNA ([www.actinomycetes.cz](http://www.actinomycetes.cz)). Taxonomická klasifikace ukazuje na možné adaptace původně půdních streptomycet na nová prostředí v hostitelském organismu. Předpokládáme, že streptomycety pro úspěšné přežití v lidských tkáních modulují svůj sekundární metabolismus. Mohou pak produkovat bioaktivní látky, které specificky působí proti místním mikrobiálním konkurentům nebo mohou ovlivnit imunitní odpověď hostitele. Proto sbírka kultur aktinomycet může sloužit jako jedinečný zdroj imunomodulátorů a antibiotik zaměřených proti běžným respiračním patogenům.

Prvním příkladem byl publikovaný výzkum kmene *S. sp.* TR1341 (Herbrík et al., 2019), který jsme pro detailní studium vybrali na základě širokého spektra jeho bioaktivit, jako je hemolýza a schopnost inhibovat růst některých bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria pharyngis*) a plísni (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium sp.*). Hemolytické nebo obecně cytolytické vlastnosti jsou u aktinomycet často zapříčiněny produkcí polyenových sekundárních metabolitů (Bobek et al., 2022). Především nízkomolekulární sloučeniny typu filipinu nebo pentamycinu způsobují poměrně drastické poškození membrán erytrocytů. Polyeny bývají fungicidní a ty s nižší toxicitou, jako jsou amfotericin B, nystatin A1 či pentamycin, jsou používány v klinické medicíně jako klíčové antimykotické a antiprotozoální látky (Knopik-Skrocka and Bielawski, 2002).

*Streptomyces sp.* TR1341 byla původně izolována ze sputa pacienta s anamnézou tuberkulózy a opakovanými respiračními infekcemi. Pacient byl starší muž žijící v oblasti s vysokou koncentrací prachových částic v ovzduší.

Extrakty tohoto kmene byly analyzovány pomocí HPLC-MS. Zjistili jsme, že studovaný kmen produkuje aktinomycin X2 a dvě polyenové sloučeniny filipin III a fungichromin, což je v souladu s nalezeným genovým shlukem pro jejich biosyntézu. Extrakt samotný byl  $\beta$ -hemolytický. Navíc abychom prokázali, že filipin a fungichromin jsou skuteční nositelé hemolytických aktivit, připravili jsme mutantní kmen, který není schopen syntetizovat tyto typy sloučenin. Všechny mutované kolonie zcela ztratily  $\beta$ -hemolytické vlastnosti. Nebyly proto ani schopné potlačit růst testovaných mikromycet. Produkce cytolytických látek může lyzí hostitelských buněk streptomycetám napomoci v kolonizaci lidského těla. Navíc jim pomáhá úspěšně vzdorovat konkurenci mikromycet.

### 2.5.3 Půdní izoláty a streptomycety asociované s rostlinami a s bezobratlými živočichy

Stručný přehled dosud známých polyenových látek a jiných metabolitů vykazujících hemolytickou aktivitu jsme podali v literárním úvodu navazujícího článku (Bobek et al., 2022). V tomto článku jsme však hlavně studovali produkci a aktivitu sekundárních metabolitů u dalších celkem 23  $\beta$ -hemolytických kmenů. Z těchto kmenů bylo 12 původem z půdy, 10 bylo izolovaných z těl bezobratlých živočichů a jeden kmen byl asociovaný s kořeny kukuřice.

Všechny tyto kmeny jsou součástí Sbírký kultur aktinomycet na Ústavu půdní biologie Biologického centra AV ČR. Tato jedinečná sbírka (pod vedením pana Ing. Václava Křišťůfka, CSc. a v kurátorství paní RNDr. Alice Chroňákové, Ph.D., s nimiž intenzivně spolupracujeme) obsahuje kolem 1700 kmenů, převážně streptomycet, které byly izolovány z půdy a sedimentů unikátních biotopů po celém světě.

Testovali jsme schopnost vybraných streptomycet inhibovat růst čtyř různých askomycet: *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Fusarium spp.* a *Paecilomyces spp.* Ukázalo se, že pokud měly streptomycety možnost vyrůst a spustit produkci sekundárních metabolitů, byly většinou schopné růstu plísní zabránit nebo jej výrazně zpomalit. Pomocí hmotnostní spektrometrie jsme se pokusili identifikovat látky zodpovědné za popsané aktivity. Z polyenových molekul odpovědných za hemolýzu jsme zjistili produkci kandidicidinů, filipinů, strevertenu A, tetrafunginu a tetrinu A, a čtyř nových polyenových sloučenin (označených jako polyen A, B, C a D). Kromě nich byly navíc identifikovány nepolyenové antimykotické sloučeniny aktifenol a surugamid A. Domníváme se, že schopnost streptomycet produkovat cytolytické sloučeniny (projevující se hemolýzou na krevním agaru) je vrozenou vlastností bakterií v půdním prostředí, a mohla by dokonce sloužit jako faktor virulence při kolonizaci hostitelských organismů.

#### 2.5.4 Diskuse: Ohlasy na článek o *Streptomyces sp.* TR1341

Ke dni 11. 11. 2023 dosáhl náš článek charakterizující *Streptomyces sp.* TR1341 13 citací ve WoS. Byl například citován v práci, která analyzuje genomy 17 patogenních izolátů ze sbírek Mycetoma Research Centre v Súdánu, jež způsobily aktinomycetomy (Watson et al., 2022). Jedná se o tropická chronická granulomatózní zánětlivá onemocnění kůže a podkožních tkání. Autoři této studie poukazují na vysokou rozmanitost patogenů, jež toto onemocnění způsobují. Jedenáct izolátů byly streptomycety; z nich 7 bylo zařazeno ke dvěma známým druhům patogenních streptomycet způsobujících aktinomycetomy. Z těchto sedmi jsou tři příslušníky druhu *S. sudanensis* a čtyři byly klasifikovány do druhu *S. somaliensis*. Další tři izoláty streptomycet byly přiřazeny ke druhům dosud s lidskou aktinomycetomou nespojovanými (*S. albogriseolus*, *S. radiopugnans* a *S. werraensis*). Navíc autoři studie odhalili zřejmě nový druh streptomycety, který podle jeho původu ze západního Kordofanu pojmenovali *Streptomyces kordofanensis*. Citující naši práci popisující kmen *S. sp.* TR1341 se autoři domnívají, že budou odhaleny i další druhy patogenních streptomycet, které aktinomycetomy způsobují.

Naši kolegové z Biologického centra AV ČR, kteří rovněž naši práci citovali, hledali u 84 klinických izolátů streptomycet fylogenetickou příbuznost a následně určovali citlivost těchto kmenů na různá antibiotika (Kotrbová et al., 2022). Na základě porovnání sekvencí 16S rRNA identifikovali 70 % izolátů jako příslušníky druhů *S. albidoflavus*, *S. hydrogenans*, *S. resistomycificus* a *S. griseochromogenes*. Testy citlivosti na antibiotika potvrdily přirozenou odolnost vůči penicilinu a naopak obecnou citlivost streptomycet vůči amikacinu,

gentamycinu, vankomycinu a linezolidu. Autoři citují naši práci v souvislosti s tvrzením o nejasném klinickém významu streptomycet, neboť mnoho streptomycetami produkováných sekundárních metabolitů vykazuje silnou cytotoxickou a  $\beta$ -hemolytickou aktivitu a může také významným způsobem ovlivnit imunitní systém.

Streptomycety byly ovšem detekovány jako součásti normálního lidského mikrobiomu, což potvrzují analýzy klinických vzorků metodami sekvenování nové generace (Huang et al., 2015; Collado et al., 2016; Raymond et al., 2016; Wu et al., 2017). Jak je uvedeno výše, u člověka byla potvrzena přítomnost streptomycet na zdravé kůži, v děloze a v dýchacích cestách (Huang et al. 2015; Collado et al. 2016). V případě lidského střevního mikrobiomu se však zjistilo, že rod *Streptomyces* je ve srovnání se střevním mikrobiomem zvířat zastoupen v mnohem menší míře (Bolourian a Mojtahedi 2018). Nízký podíl streptomycet v lidských střevech může souviset s naším současným hygienickým stylem života, kde se částice půdy přilnuté k syrové potravě omyjí nebo se před konzumací sterilizují vařením. Verma se ve svém výzkumu přímo zaměřil/a na izolaci streptomycet ze vzorků lidské stolice (Verma et al., 2023). Ve své studii autoři identifikovali kmen *Streptomyces levis* HFM-2, který vykazoval antioxidační aktivitu a cytotoxicitu proti různým nádorovým buněčným liniím. Tím by tato streptomyceta mohla být jednou z těch, jejichž přítomnost ve střevním ekosystému by mohla být pro hostitelský organismus prospěšná. To evokuje otázku, zda by streptomycety mohly být součástí probiotik prospěšných střevnímu systému. Tím se ve svém přehledovém článku zabýval (Cuozzo et al., 2023). Probiotika zajišťují mnoho důležitých funkcí, jako jsou modulace tělesné hmotnosti, modulace stavu imunitního systému a prevence před některými poruchami, jakými jsou intolerance na laktózu, kardiovaskulární onemocnění a průjem spojené s užíváním antibiotik. K dosažení statusu probiotika však musí mikroorganismy splňovat specifická kritéria týkající se bezpečnosti, funkčních a technologických vlastností (de Melo Pereira et al., 2018). Nejdůležitější požadavek na probiotikum je jeho schopnost přežít během transportu na místo jeho očekávaného prospěšného účinku. Probiotické mikroorganismy musí odolat nízkému pH v žaludku a působení pankreatické šťávy a slinných enzymů. Po úspěšném osídlení epitelových buněk střeva musí přispívat k biologickým funkcím, regulovat okolní mikroorganismy a eliminovat toxiny (Kerry et al., 2018). Některé aktinobakterie izolované z kuřat byly velmi tolerantní k acidickým podmínkám, například kmen *Streptomyces sp.* JD9 je odolný vůči pH 2, vůči pepsinu (až 3 mg/mL), vůči pankreatinům (1 mg/mL) i vůči 0,3% žluči (Latha et al., 2016). Podobné výsledky byly zaznamenány u *Streptomyces* PDPF-2 (Kunchala et al., 2017).

Streptomycety jsou v dnešní době využívány jako probiotika v rybářském průmyslu, a to díky své schopnosti produkce antimikrobiálních látek, produkce enzymů usnadňujících trávení potravy a také vzhledem k delší životnosti odolných spor. Další významnou probiotickou vlastností streptomycet je jejich schopnost detoxikace. Je známo, že zemědělské produkty, jako je kukuřice, pšenice a sója, bývají kontaminovány mykotoxiny. A například kmen *Streptomyces cacaoi subsp. asoensis* je schopen efektivně degradovat aflatoxin a eliminovat genotoxicitu (Harkai et al., 2016).

### 3. Závěr

*„My si Vás budeme hýčkat!“, přislíbila mi paní přednostka Prof. Libuše Kolářová, když jsem se ke konci roku 2009 přišel poprvé představit do Ústavu imunologie a mikrobiologie se zájmem o nabízenou pozici vedoucího bakteriologické laboratoře. Tehdy jsem se rozhodoval spíše pocitově, a myslím, že po této větě jsem již rozhodnutý byl. Asi pro nikoho, kdo se dosud zabýval více méně jen svým výzkumným tématem, není jednoduché přejít do univerzitního prostředí a doplnit si (či v mém případě spíše stále doplňovat) znalosti v tak širokém oboru, jakým je lékařská mikrobiologie. Ale tuto výzvu jsem tehdy přijal a neměnil bych. Paní přednostka na tu úvodní větu možná už zapomněla, přesto svůj příslib plní a hýčká si nás opravdu všechny. Pečuje o nás, napravuje naše přešlapy, a buduje náš společný tým, navzdory našim vrtochům, rozdílným ambicím a zahleděností do velice odlišných výzkumných témat. Ne vždy je to její úsilí snadné...*

Za jeden z nejdůležitějších objevů v oblasti biologie streptomycet považuji bioinformatickým způsobem odhalenou přítomnost 29 tzv. kryptických genových shluků u *S. coelicolor* (Bentley et al., 2002). Stalo se tak v návaznosti na zmapování genetické informace této modelové streptomycety s dosud nejlépe anotovaným genomem. Při analýze genomu *S. avermitilis* bylo dokonce identifikováno 37 genových shluků pro potenciální produkci sekundárních metabolitů (Ikeda et al., 2003). Stejně tak i genomy dalších streptomycet mají mnohem širší možnosti produkovat bioaktivní látky, než bylo možné pozorovat za standardních laboratorních podmínek (Nett et al., 2009). Velký význam těchto objevů spatřuji v tom, že tyto kryptické genové shluky i u známých streptomycet ukrývají potenciál pro tvorbu nových bioaktivních látek s možností budoucího uplatnění v humánní medicíně či v oblasti biotechnologií.

Není ovšem snadné odpovědět na otázku, jakým způsobem lze takovou produkci skutečně spustit. K aktivaci kryptických biosyntetických drah bývají streptomycety pěstovány za nestandardních fyzikálních a výživových podmínek (Wakefield et al., 2017). Takto byl například objeven polyketidový alkaloid coelimecin P1 (tzv. žlutý pigment), který je produkován z kryptického genového klastru *cpk* u *S. coelicolor* (Gomez-Escribano and Bibb, 2012). Další možné strategie jsou genetické manipulace uvnitř genů (Luo et al., 2013) nebo přenos celého biosyntetického genového klastru do heterologního producenta (Kalan et al., 2013; Tanaka et al., 2013). Zajímavý a velice efektivní způsob, jak aktivovat kryptické genové shluky, je využití konkurenčních mikroorganismů v laboratorních podmínkách. Tato technika, označovaná jako ko-kultivace, je inspirovaná přirozeně konkurenčním prostředím a skutečně u streptomycet vedla ke stimulaci produkce některých antibiotik (Vetsigian et al., 2011; Traxler et al., 2013).

K životu v půdním prostředí jsou streptomycety dobře uzpůsobeny. Jejich rozrůstající se substrátové mycelium zajišťuje přísun živin. Vegetativní buňky sekretují velké množství enzymů, které rozkládají nerozpustné organické polymery, včetně chitinu a celulózy, na

jednoduché cukry (Bertram et al., 2004;Chater et al., 2010;Thompson et al., 2010). Množství produkovaných sekundárních metabolitů (včetně takových, jež jsou v laboratorních podmínkách kryptické) slouží především jako chemická zbraň k likvidaci konkurenčních půdních mikroorganismů. Další důležitou vlastností produkovaných metabolitů je jejich schopnost signalizace. Mohou pak i za velice nízkých koncentrací signálních látek v rámci mezibuněčné komunikace přímo ovlivňovat expresi genů, čímž koordinují svůj vlastní vývoj nebo ovlivňují růst ostatních mikroorganismů (Yim et al., 2007;Davies and Davies, 2010). Kromě těchto úloh mají sekundární metabolity další specifické funkce. Například undecylprodigiosin produkovaný *S. coelicolor* je spouštěčem apoptózy vegetativního mycelia (zmíněno v kap. 2.4.4) (Tenconi et al., 2018). Streptomyceta je tak částečně citlivá na antibiotikum, které sama produkuje. Zbytky lyzovaného vegetativního mycelia slouží v nutričně vyčerpaném prostředí jako zdroj živin pro diferenciaci mycelia vzdušného a sporulaci. Další neméně zajímavou strategií mnoha streptomycet je produkce těkavého geosminu (Gust et al., 2003). Geosmin je příčinou typické vůně zeminy; jeho aroma je často spojováno s deštěm po suchém období a je mnoha lidmi vnímáno jako příjemné a osvěžující. A pravděpodobně nejen lidmi. Jak bylo nedávno zjištěno, geosmin je silným atraktantem pro členovce, přičemž tito živočichové pak napomáhají šíření streptomycetích spor (Becher et al., 2020). Z uvedených příkladů plyne, že si streptomycety pro úspěšné přežití ve vysoce komplexním a konkurenčním životním prostředí postupně vyvinuly řadu strategií, s jejichž pomocí navazují interakce nejen s konkurenčními mikroorganismy (predace), ale i s vyššími organismy, s nimiž tvoří symbiotické vazby.

Výzkum biologie streptomycet se donedávna odehrával v uzavřených monokulturách na úrovni jednoho modelového druhu, u něhož byly jednotlivé geny postupně charakterizovány z funkčního hlediska. S rozvojem nových experimentálních technologií se v současné době stále častěji objevují studie celogenomové, charakterizující změny genové exprese jako reakce na změněné kultivační podmínky či vývojové etapy. Domnívám se, že v blízké budoucnosti budou nabývat na významu právě studie, zabývající se více ekologickým významem streptomycet, a to nejen z hlediska jejich úlohy v půdním ekosystému, ale především jejich vztahu k organismům, s nimiž (v nichž) žijí v ekologických vazbách. Z tohoto druhého pohledu bude nezbytné podrobněji analyzovat dosud spíše opomíjený význam streptomycet v oblasti klinické mikrobiologie. Bude třeba odpovědět na otázku, zda a za jakých okolností je streptomyceta s potenciálem osidlovat lidské tělo pro hostitelský organismus spíše výhodou (k potlačení potenciálně patogenních mikroorganismů), nebo nevýhodou (z hlediska její případné patogenity).

#### 4. Autorovy publikace

1. **Bobek, J.**, Filipova, E., Bergman, N., Cihak, M., Petricek, M., Lara, A.C., Kristufek, V., Megyes, M., Wurzer, T., Chronakova, A., and Petrickova, K. (2022). Polyenic Antibiotics and Other Antifungal Compounds Produced by Hemolytic *Streptomyces* Species. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms232315045>
2. **Bobek, J.**, Halada, P., Angelis, J., Vohradsky, J., and Mikulik, K. (2004). Activation and expression of proteins during synchronous germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Proteomics* 4, 3864-3880. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400818>
3. **Bobek, J.**, Hercik, K., Dobrova, Z., Branny, P., Nadvornik, R., and Janecek, J. (2000). Evidence for phosphoprotein phosphatase in *Streptomyces granaticolor*. *Folia Microbiol (Praha)* 45, 310-312. <https://doi.org/10.1007/BF02817552>
4. **Bobek, J.**, Mikulova, A., Setinova, D., Elliot, M., and Cihak, M. (2021). 6S-Like scr3559 RNA Affects Development and Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*. *Microorganisms* 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102004>
5. **Bobek, J.**, Smidova, K., and Cihak, M. (2017). A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*. *Front Microbiol* 8, 2205. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02205>
6. **Bobek, J.**, Strakova, E., Zikova, A., and Vohradsky, J. (2014). Changes in activity of metabolic and regulatory pathways during germination of *S. coelicolor*. *BMC Genomics* 15, 1173. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1173>
7. Cihak, M., Kamenik, Z., Smidova, K., Bergman, N., Benada, O., Kofronova, O., Petrickova, K., and **Bobek, J.** (2017). Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*. *Front Microbiol* 8, 2495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02495>
8. Herbrik, A., Corretto, E., Chronakova, A., Langhansova, H., Petraskova, P., Hrdy, J., Cihak, M., Kristufek, V., **Bobek, J.**, Petricek, M., and Petrickova, K. (2019). A Human Lung-Associated *Streptomyces* sp. TR1341 Produces Various Secondary Metabolites Responsible for Virulence, Cytotoxicity and Modulation of Immune Response. *Front Microbiol* 10, 3028. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03028>
9. Chatzigeorgiou, S., Jílková, J., Korecká, L., Janyšková, R., Hermannová, M., Šimek, M., Čožíková, D., Slovákova, M., Bílková, Z., **Bobek, J.**, Černý, Z., Čihák, M., and Velebný, V. (2023). Preparation of hyaluronan oligosaccharides by a prokaryotic  $\beta$ -glucuronidase: Characterization of free and immobilized forms of the enzyme. *Carbohydr Polym* 317, 121078. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121078>
10. Mikulik, K., **Bobek, J.**, Bezouskova, S., Benada, O., and Kofronova, O. (2002). Expression of proteins and protein kinase activity during germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 335-342. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02606-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02606-2)
11. Mikulik, K., **Bobek, J.**, Zidkova, J., and Felsberg, J. (2014). 6S RNA modulates growth and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 7185-7197. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102004>
12. Mikulik, K., **Bobek, J.**, Zikova, A., Smetakova, M., and Bezouskova, S. (2011). Phosphorylation of ribosomal proteins influences subunit association and translation of poly (U) in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Biosyst* 7, 817-823. <https://doi.org/10.1039/C0MB00174K>



13. Mikulik, K., Paleckova, P., Felsberg, J., **Bobek**, J., Zidkova, J., and Halada, P. (2008). SsrA genes of streptomycetes and association of proteins to the tmRNA during development and cellular differentiation. *Proteomics* 8, 1429-1441. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700560>
14. Mikulik, K., Suchan, P., and **Bobek**, J. (2001). Changes in ribosome function induced by protein kinase associated with ribosomes of *Streptomyces collinus* producing kirromycin. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 434-443. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6017>
15. Palecková, P., **Bobek**, J., Felsberg, J., and Mikulík, K. (2006). Activity of translation system and abundance of tmRNA during development of *Streptomyces aureofaciens* producing tetracycline. *Folia Microbiol (Praha)* 51, 517-524. <https://doi.org/10.1007/BF02931615>
16. Paleckova, P., **Bobek**, J., and Mikulik, K. (2009). tmRNA of *Streptomyces collinus* and *Streptomyces griseus* during the growth and in the presence of antibiotics. *Microb Biotechnol* 2, 114-122. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00066.x>
17. Palecková, P., Felsberg, J., **Bobek**, J., and Mikulík, K. (2007). tmRNA abundance in *Streptomyces aureofaciens*, *S. griseus* and *S. collinus* under stress-inducing conditions. *Folia Microbiol (Praha)* 52, 463-470. <https://doi.org/10.1007/BF02932105>
18. Paleckova, P., Kontrova, F., Kofronova, O., **Bobek**, J., Benada, O., and Mikulik, K. (2007). Effect of protein kinase inhibitors on protein phosphorylation and germination of aerial spores from *Streptomyces coelicolor*. *Folia Microbiol (Praha)* 52, 215-222. <https://doi.org/10.1007/BF02931301>
19. Panek, J., **Bobek**, J., Mikulik, K., Basler, M., and Vohradsky, J. (2008). Biocomputational prediction of small non-coding RNAs in *Streptomyces*. *BMC Genomics* 9, 217. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-217>
20. Panek, J., Krasny, L., **Bobek**, J., Jezkova, E., Korelusova, J., and Vohradsky, J. (2011). The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures. *Nucleic Acids Res* 39, 3418-3426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1186>
21. Setinova, D., Smidova, K., Pohl, P., Music, I., and **Bobek**, J. (2017). RNase III-Binding-mRNAs Revealed Novel Complementary Transcripts in *Streptomyces*. *Front Microbiol* 8, 2693. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02693>
22. Smidova, K., Zikova, A., Pospisil, J., Schwarz, M., **Bobek**, J., and Vohradsky, J. (2019). DNA mapping and kinetic modeling of the HrdB regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* 47, 621-633. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1018>
23. Strakova, E., **Bobek**, J., Zikova, A., Rehulka, P., Benada, O., Rehulkova, H., Kofronova, O., and Vohradsky, J. (2013a). Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*. *J Proteome Res* 12, 525-536. <https://doi.org/10.1021/pr300980v>
24. Strakova, E., **Bobek**, J., Zikova, A., and Vohradsky, J. (2013b). Global features of gene expression on the proteome and transcriptome levels in *S. coelicolor* during germination. *PLoS One* 8, e72842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072842>
25. Swiercz, J.P., Hindra, **Bobek**, J., Bobek, J., Haiser, H.J., Di Berardo, C., Tjaden, B., and Elliot, M.A. (2008). Small non-coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* 36, 7240-7251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn898>

## 5. Použitá literatura

- Altuvia, Y., Bar, A., Reiss, N., Karavani, E., Argaman, L., and Margalit, H. (2018). In vivo cleavage rules and target repertoire of RNase III in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 46, 10380-10394.
- Andini, N., and Nash, K.A. (2011). Expression of tmRNA in mycobacteria is increased by antimicrobial agents that target the ribosome. *FEMS Microbiol Lett* 322, 172-179.
- Andrade, J.M., and Arraiano, C.M. (2008). PNPase is a key player in the regulation of small RNAs that control the expression of outer membrane proteins. *Rna* 14, 543-551.
- Andrade, J.M., Pobre, V., and Arraiano, C.M. (2013). Small RNA modules confer different stabilities and interact differently with multiple targets. *PLoS One* 8, e52866.
- Aoki, Y., Matsumoto, D., Kawaide, H., and Natsume, M. (2011). Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot (Tokyo)* 64, 607-611.
- Arancio, W., Genovese, S.I., Benfante, V., Gallo, G., and Coronello, C. (2022). An extended catalogue of ncRNAs in *Streptomyces coelicolor* reporting abundant tmRNA, RNase-P RNA and RNA fragments derived from pre-ribosomal RNA leader sequences. *Archives of Microbiology* 204, 582.
- Arnvig, K.B., and Young, D.B. (2009). Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 73, 397-408.
- Arraiano, C.M., Andrade, J.M., Domingues, S., Guinote, I.B., Malecki, M., Matos, R.G., Moreira, R.N., Pobre, V., Reis, F.P., Saramago, M., Silva, I.J., and Viegas, S.C. (2010). The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev* 34, 883-923.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., and Noble, W.S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37, W202-208.
- Balotf, S., Tegg, R.S., Nichols, D.S., and Wilson, C.R. (2021). Spore Germination of the Obligate Biotroph *Spongospora subterranea*: Transcriptome Analysis Reveals Germination Associated Genes. *Front Microbiol* 12, 691877.
- Baltussen, T.J.H., Zoll, J., Verweij, P.E., and Melchers, W.J.G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol Mol Biol Rev* 84.
- Bandyra, K.J., and Luisi, B.F. (2018). RNase E and the High-Fidelity Orchestration of RNA Metabolism. *Microbiol Spectr* 6.
- Barends, S., Zehl, M., Bialek, S., De Waal, E., Traag, B.A., Willemse, J., Jensen, O.N., Vijgenboom, E., and Van Wezel, G.P. (2010). Transfer-messenger RNA controls the translation of cell-cycle and stress proteins in *Streptomyces*. *EMBO Rep* 11, 119-125.
- Barke, J., Seipke, R.F., Grünschow, S., Heavens, D., Drou, N., Bibb, M.J., Goss, R.J., Yu, D.W., and Hutchings, M.I. (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol* 8, 109.
- Barrick, J.E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W.L., and Breaker, R.R. (2005). 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *Rna* 11, 774-784.
- Behie, S.W., Bonet, B., Zacharia, V.M., McClung, D.J., and Traxler, M.F. (2016). Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In situ. *Front Microbiol* 7, 2149.

- Behra, P.R.K., Pettersson, B.M.F., Das, S., Dasgupta, S., and Kirsebom, L.A. (2019). Comparative genomics of *Mycobacterium mucogenicum* and *Mycobacterium neoaurum* clade members emphasizing tRNA and non-coding RNA. *BMC Evol Biol* 19, 124.
- Behra, P.R.K., Pettersson, B.M.F., Ramesh, M., Das, S., Dasgupta, S., and Kirsebom, L.A. (2022). Comparative genome analysis of mycobacteria focusing on tRNA and non-coding RNA. *BMC Genomics* 23, 704.
- Becher, P.G., Verschut, V., Bibb, M.J., Bush, M.J., Molnár, B.P., Barane, E., Al-Bassam, M.M., Chandra, G., Song, L., Challis, G.L., Buttner, M.J., and Flärdh, K. (2020). Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. *Nature Microbiology* 5, 821-829.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Hopwood, D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.
- Bernstein, J.A., Lin, P.H., Cohen, S.N., and Lin-Chao, S. (2004). Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2758-2763.
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothaft, H., Saier, M.H., Jr., and Titgemeyer, F. (2004). In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 186, 1362-1373.
- Beskrovnyaya, P., Sexton, D.L., Golmohammadzadeh, M., Hashimi, A., and Tocheva, E.I. (2021). Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospore and Exospore Formation. *Front Microbiol* 12, 630573.
- Bibb, M.J., Domonkos, A., Chandra, G., and Buttner, M.J. (2012). Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by  $\sigma$ (BldN) and a cognate anti-sigma factor, RsbN. *Mol Microbiol* 84, 1033-1049.
- Bibb, M.J., Molle, V., and Buttner, M.J. (2000). sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 182, 4606-4616.
- Bobek, J., Filipova, E., Bergman, N., Cihak, M., Petricek, M., Lara, A.C., Kristufek, V., Megyes, M., Wurzer, T., Chronakova, A., and Petrickova, K. (2022). Polyenic Antibiotics and Other Antifungal Compounds Produced by Hemolytic *Streptomyces* Species. *Int J Mol Sci* 23.
- Bobek, J., Halada, P., Angelis, J., Vohradsky, J., and Mikulik, K. (2004). Activation and expression of proteins during synchronous germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Proteomics* 4, 3864-3880.
- Bobek, J., Hercik, K., Dobrova, Z., Branny, P., Nadvornik, R., and Janecek, J. (2000). Evidence for phosphoprotein phosphatase in *Streptomyces granaticolor*. *Folia Microbiol (Praha)* 45, 310-312.
- Bobek, J., Mikulova, A., Setinova, D., Elliot, M., and Cihak, M. (2021). 6S-Like scr3559 RNA Affects Development and Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*. *Microorganisms* 9.
- Bobek, J., Smidova, K., and Cihak, M. (2017). A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*. *Front Microbiol* 8, 2205.

- Bobek, J., Strakova, E., Zikova, A., and Vohradsky, J. (2014). Changes in activity of metabolic and regulatory pathways during germination of *S. coelicolor*. *BMC Genomics* 15, 1173.
- Bolon, D.N., Grant, R.A., Baker, T.A., and Sauer, R.T. (2004). Nucleotide-dependent substrate handoff from the SspB adaptor to the AAA+ ClpXP protease. *Mol Cell* 16, 343-350.
- Bolourian, A., and Mojtahedi, Z. (2018). Streptomyces, shared microbiome member of soil and gut, as 'old friends' against colon cancer. *FEMS Microbiol Ecol* 94.
- Brachmann, A.O., Brameyer, S., Kresovic, D., Hitkova, I., Kopp, Y., Manske, C., Schubert, K., Bode, H.B., and Heermann, R. (2013). Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat Chem Biol* 9, 573-578.
- Bram, R.J., Young, R.A., and Steitz, J.A. (1980). The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell* 19, 393-401.
- Brown, A.G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J.D., Reading, C., and Rolinson, G.N. (1976). Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* 29, 668-669.
- Bubunencko, M., Court, D.L., Al Refaii, A., Saxena, S., Korepanov, A., Friedman, D.I., Gottesman, M.E., and Alix, J.H. (2013). Nus transcription elongation factors and RNase III modulate small ribosome subunit biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 87, 382-393.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., and Bautz, E.K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221, 43-46.
- Buttner, M.J. (1989). RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* 3, 1653-1659.
- Buttner, M.J., Chater, K.F., and Bibb, M.J. (1990). Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 172, 3367-3378.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., and Darst, S.A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* 104, 901-912.
- Cano-Jiménez, E., Acuña, A., Botana, M.I., Hermida, T., González, M.G., Leiro, V., Martín, I., Paredes, S., and Sanjuán, P. (2016). Farmer's Lung Disease. A Review. *Arch Bronconeumol* 52, 321-328.
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H.J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., Dijkhuizen, L., and Wösten, H.A. (2004). The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol Microbiol* 53, 433-443.
- Collado, M.C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., and Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 6, 23129.
- Coombs, J.T., and Franco, C.M. (2003a). Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol* 69, 5603-5608.
- Coombs, J.T., and Franco, C.M. (2003b). Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Appl Environ Microbiol* 69, 4260-4262.
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561-563.

- Cuozzo, S., De Moreno De Leblanc, A., Leblanc, J.G., Hoffmann, N., and Tortella, G.R. (2023). Streptomyces genus as a source of probiotics and its potential for its use in health. *Microbiological Research* 266, 127248.
- D'alia, D., Nieselt, K., Steigele, S., Müller, J., Verburg, I., and Takano, E. (2010). Noncoding RNA of glutamine synthetase I modulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 192, 1160-1164.
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 417-433.
- De Melo Pereira, G.V., De Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A.I., Thomaz-Soccol, V., and Soccol, C.R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv* 36, 2060-2076.
- De Sousa Abreu, R., Penalva, L.O., Marcotte, E.M., and Vogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5, 1512-1526.
- Del Campo, C., Bartholomäus, A., Fedyunin, I., and Ignatova, Z. (2015). Secondary Structure across the Bacterial Transcriptome Reveals Versatile Roles in mRNA Regulation and Function. *PLoS Genet* 11, e1005613.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607.
- Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J., Titgemeyer, F., and Rigali, S. (2004). Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 186, 1893-1897.
- Dos Santos, R.F., Quendera, A.P., Boavida, S., Seixas, A.F., Arraiano, C.M., and Andrade, J.M. (2018). Major 3'-5' Exoribonucleases in the Metabolism of Coding and Non-coding RNA. *Prog Mol Biol Transl Sci* 159, 101-155.
- Durand, S., Gilet, L., Bessières, P., Nicolas, P., and Condon, C. (2012). Three essential ribonucleases-RNase Y, J1, and III-control the abundance of a majority of *Bacillus subtilis* mRNAs. *PLoS Genet* 8, e1002520.
- Eaton, D., and Ensign, J.C. (1980). *Streptomyces viridochromogenes* spore germination initiated by calcium ions. *J Bacteriol* 143, 377-382.
- Ellis, J.C., and Brown, J.W. (2009). The RNase P family. *RNA Biol* 6, 362-369.
- Favero, L.M., Chideroli, R.T., Ferrari, N.A., Azevedo, V.a.C., Tiwari, S., Lopera-Barrero, N.M., and Pereira, U.P. (2020). In silico Prediction of New Drug Candidates Against the Multidrug-Resistant and Potentially Zoonotic Fish Pathogen Serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Front Genet* 11, 1024.
- Feklistov, A., Mekler, V., Jiang, Q., Westblade, L.F., Irschik, H., Jansen, R., Mustaev, A., Darst, S.A., and Ebright, R.H. (2008). Rifamycins do not function by allosteric modulation of binding of Mg<sup>2+</sup> to the RNA polymerase active center. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14820-14825.
- Feklistov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., and Gross, C.A. (2014). Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol* 68, 357-376.
- Fillinger, S., Chaveroche, M.K., Van Dijck, P., De Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., and D'enfert, C. (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading)* 147, 1851-1862.

- Flärdh, K., Richards, D.M., Hempel, A.M., Howard, M., and Buttner, M.J. (2012). Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 15, 737-743.
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S.H., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2001). Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10584-10589.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2003). Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* 11, 671-683.
- Fortuin, S., Tomazella, G.G., Nagaraj, N., Sampson, S.L., Gey Van Pittius, N.C., Soares, N.C., Wiker, H.G., De Souza, G.A., and Warren, R.M. (2015). Phosphoproteomics analysis of a clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolate: expanding the mycobacterial phosphoproteome catalog. *Front Microbiol* 6, 6.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison, C.A., 3rd, and Venter, J.C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397-403.
- Fröjd, M.J., and Flärdh, K. (2019). Apical assemblies of intermediate filament-like protein FilP are highly dynamic and affect polar growth determinant DivIVA in *Streptomyces venezuelae*. *Molecular Microbiology* 112, 47-61.
- Gallagher, K.A., Schumacher, M.A., Bush, M.J., Bibb, M.J., Chandra, G., Holmes, N.A., Zeng, W., Henderson, M., Zhang, H., Findlay, K.C., Brennan, R.G., and Buttner, M.J. (2020). c-di-GMP Arms an Anti- $\sigma$  to Control Progression of Multicellular Differentiation in *Streptomyces*. *Mol Cell* 77, 586-599.e586.
- Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12, 503-516.
- Gatewood, M.L., Bralley, P., Weil, M.R., and Jones, G.H. (2012). RNA-Seq and RNA immunoprecipitation analyses of the transcriptome of *Streptomyces coelicolor* identify substrates for RNase III. *J Bacteriol* 194, 2228-2237.
- Georg, J., and Hess Wolfgang, R. (2018). Widespread Antisense Transcription in Prokaryotes. *Microbiology Spectrum* 6, 10.1128/microbiolspec.rwr-0029-2018.
- Gildehaus, N., Neußer, T., Wurm, R., and Wagner, R. (2007). Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic Acids Research* 35, 1885-1896.
- Gomez-Escribano, J.P., and Bibb, M.J. (2012). *Streptomyces coelicolor* as an expression host for heterologous gene clusters. *Methods Enzymol* 517, 279-300.
- González-Quiñónez, N., Corte-Rodríguez, M., Álvarez-Fernández-García, R., Rioseras, B., López-García, M.T., Fernández-García, G., Montes-Bayón, M., Manteca, A., and Yagüe, P. (2019). Cytosolic copper is a major modulator of germination, development and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Scientific Reports* 9, 4214.
- Gottesman, S. (2005). Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* 21, 399-404.

- Grantcharova, N., Lustig, U., and Flärdh, K. (2005). Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 187, 3227-3237.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57, 441-466.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849-857.
- Gulder, T.A., and Moore, B.S. (2009). Chasing the treasures of the sea - bacterial marine natural products. *Curr Opin Microbiol* 12, 252-260.
- Gürtler, H., Pedersen, R., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H., Wellington, E.M., Pedersen, C., and Bock, K. (1994). Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology. *J Antibiot (Tokyo)* 47, 434-439.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K.F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1541-1546.
- Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., and Spitteller, D. (2009). Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4742-4746.
- Hahn, M.Y., Bae, J.B., Park, J.H., and Roe, J.H. (2003). Isolation and characterization of *Streptomyces coelicolor* RNA polymerase, its sigma, and antisigma factors. *Methods Enzymol* 370, 73-82.
- Haiser, H.J., Yousef, M.R., and Elliot, M.A. (2009). Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 191, 6501-6512.
- Hardisson, C., Manzanal, M.B., Salas, J.A., and Suárez, J.E. (1978). Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol* 105, 203-214.
- Harkai, P., Szabó, I., Cserhati, M., Krifaton, C., Risa, A., Radó, J., Balázs, A., Berta, K., and Kriszt, B. (2016). Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. *International Biodeterioration & Biodegradation* 108, 48-56.
- Hausner, G., Hafez, M., and Edgell, D.R. (2014). Bacterial group I introns: mobile RNA catalysts. *Mob DNA* 5, 8.
- Helmann, J.D. (2019). Where to begin? Sigma factors and the selectivity of transcription initiation in bacteria. *Mol Microbiol* 112, 335-347.
- Herbrik, A., Corretto, E., Chronakova, A., Langhansova, H., Petraskova, P., Hrady, J., Cihak, M., Kristufek, V., Bobek, J., Petricek, M., and Petrickova, K. (2019). A Human Lung-Associated *Streptomyces* sp. TR1341 Produces Various Secondary Metabolites Responsible for Virulence, Cytotoxicity and Modulation of Immune Response. *Front Microbiol* 10, 3028.
- Herman, C., Thévenet, D., Bouloc, P., Walker, G.C., and D'ari, R. (1998). Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev* 12, 1348-1355.
- Hesketh, A., Bucca, G., Smith, C.P., and Hong, H.J. (2021). Chemotranscriptomic Profiling Defines Drug-Specific Signatures of the Glycopeptide Antibiotics Dalbavancin, Vancomycin and Chlorobiphenyl-Vancomycin in a VanB-Type-Resistant *Streptomyces*. *Front Microbiol* 12, 641756.

- Hirsch, C.F., and Ensign, J.C. (1976). Heat activation of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J Bacteriol* 126, 24-30.
- Holmqvist, E., and Vogel, J. (2018). RNA-binding proteins in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 16, 601-615.
- Holmqvist, E., Wright, P.R., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., Reinhardt, R., Backofen, R., and Vogel, J. (2016). Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking in vivo. *Embo j* 35, 991-1011.
- Hopwood, D.A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology (Reading)* 145 ( Pt 9), 2183-2202.
- Hoskisson, P.A., and Fernández-Martínez, L.T. (2018). Regulation of specialised metabolites in Actinobacteria - expanding the paradigms. *Environ Microbiol Rep* 10, 231-238.
- Hoskisson, P.A., and Van Wezel, G.P. (2019). *Streptomyces coelicolor*. *Trends Microbiol* 27, 468-469.
- Huang, Y.J., Nariya, S., Harris, J.M., Lynch, S.V., Choy, D.F., Arron, J.R., and Boushey, H. (2015). The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol* 136, 874-884.
- Hwang, S., Lee, N., Jeong, Y., Lee, Y., Kim, W., Cho, S., Palsson, B.O., and Cho, B.K. (2019). Primary transcriptome and translome analysis determines transcriptional and translational regulatory elements encoded in the *Streptomyces clavuligerus* genome. *Nucleic Acids Res* 47, 6114-6129.
- Chang, S.A., Bralley, P., and Jones, G.H. (2005). The *absB* gene encodes a double strand-specific endoribonuclease that cleaves the read-through transcript of the *rpsO-pnp* operon in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* 280, 33213-33219.
- Chater, K.F. (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* 47, 685-713.
- Chater, K.F., Biró, S., Lee, K.J., Palmer, T., and Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34, 171-198.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Ōmura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* 21, 526-531.
- Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J.-M., and Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nature Reviews Microbiology* 16, 585-593.
- Jeong, Y., Kim, J.N., Kim, M.W., Bucca, G., Cho, S., Yoon, Y.J., Kim, B.G., Roe, J.H., Kim, S.C., Smith, C.P., and Cho, B.K. (2016). The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nat Commun* 7, 11605.
- Jones, G.H. (2023). *Streptomyces* RNases – Function and impact on antibiotic synthesis. *Frontiers in Microbiology* 14.
- Jones, S.E., Leong, V., Ortega, J., and Elliot, M.A. (2014). Development, antibiotic production, and ribosome assembly in *Streptomyces venezuelae* are impacted by RNase J and RNase III deletion. *J Bacteriol* 196, 4253-4267.
- Joshi, M., Rong, X., Moll, S., Kers, J., Franco, C., and Loria, R. (2007). *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 599-608.
- Jung, K., Fabiani, F., Hoyer, E., and Lassak, J. (2018). Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing. *Open Biol* 8.



- Kalan, L., Gessner, A., Thaker, M.N., Waglechner, N., Zhu, X., Szawiola, A., Bechthold, A., Wright, G.D., and Zechel, D.L. (2013). A cryptic polyene biosynthetic gene cluster in *Streptomyces calvus* is expressed upon complementation with a functional *bldA* gene. *Chem Biol* 20, 1214-1224.
- Kalimuddin, S., Chen, S.L., Lim, C.T.K., Koh, T.H., Tan, T.Y., Kam, M., Wong, C.W., Mehershahi, K.S., Chau, M.L., Ng, L.C., Tang, W.Y., Badaruddin, H., Teo, J., Apisarntharak, A., Suwantararat, N., Ip, M., Holden, M.T.G., Hsu, L.Y., and Barkham, T. (2017). 2015 Epidemic of Severe *Streptococcus agalactiae* Sequence Type 283 Infections in Singapore Associated With the Consumption of Raw Freshwater Fish: A Detailed Analysis of Clinical, Epidemiological, and Bacterial Sequencing Data. *Clin Infect Dis* 64, S145-s152.
- Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends Microbiol* 17, 529-535.
- Kaltenpoth, M., Goettler, W., Dale, C., Stubblefield, J.W., Herzner, G., Roeser-Mueller, K., and Strohm, E. (2006). 'Candidatus *Streptomyces philanthi*', an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus digger* wasps. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1403-1411.
- Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., and Strohm, E. (2005a). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr Biol* 15, 475-479.
- Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., and Strohm, E. (2005b). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology* 15, 475-479.
- Kämpfer, P., Glaeser, S.P., Parkes, L., Van Keulen, G., and Dyson, P. (2014). "The Family Streptomycetaceae," in *The Prokaryotes: Actinobacteria*, eds. E. Rosenberg, E.F. Delong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 889-1010.
- Kang, J.G., Hahn, M.Y., Ishihama, A., and Roe, J.H. (1997). Identification of sigma factors for growth phase-related promoter selectivity of RNA polymerases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nucleic Acids Res* 25, 2566-2573.
- Kang, Y., Wang, Y., Hou, B., Wang, R., Ye, J., Zhu, X., Wu, H., and Zhang, H. (2019). AdpAlin, a Pleiotropic Transcriptional Regulator, Is Involved in the Cascade Regulation of Lincomycin Biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Kaplan-Levy, R.N., Hadas, O., Summers, M.L., Rücker, J., and Sukenik, A. (2010). "Akinetes: Dormant Cells of Cyanobacteria," in *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, eds. E. Lubzens, J. Cerda & M. Clark. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 5-27.
- Karoonuthaisiri, N., Weaver, D., Huang, J., Cohen, S.N., and Kao, C.M. (2005). Regional organization of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* 353, 53-66.
- Keijser, B.J., Van Wezel, G.P., Canters, G.W., Kieser, T., and Vijgenboom, E. (2000). The ram-dependence of *Streptomyces lividans* differentiation is bypassed by copper. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 565-574.
- Kelemen, G.H. (2017). Intermediate Filaments Supporting Cell Shape and Growth in Bacteria. *Subcell Biochem* 84, 161-211.
- Kellner, R.L.L. (2002). Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaesus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 389-395.
- Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S., and Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal* 26, 927-939.

- Kim, J.N., Yi, J.S., Lee, B.R., Kim, E.J., Kim, M.W., Song, Y., Cho, B.K., and Kim, B.G. (2012a). A versatile PCR-based tandem epitope tagging system for *Streptomyces coelicolor* genome. *Biochem Biophys Res Commun* 424, 22-27.
- Kim, M.S., Dufour, Y.S., Yoo, J.S., Cho, Y.B., Park, J.H., Nam, G.B., Kim, H.M., Lee, K.L., Donohue, T.J., and Roe, J.H. (2012b). Conservation of thiol-oxidative stress responses regulated by SigR orthologues in actinomycetes. *Mol Microbiol* 85, 326-344.
- Kim, M.S., Hahn, M.Y., Cho, Y., Cho, S.N., and Roe, J.H. (2009). Positive and negative feedback regulatory loops of thiol-oxidative stress response mediated by an unstable isoform of sigmaR in actinomycetes. *Mol Microbiol* 73, 815-825.
- Knopik-Skrocka, A., and Bielawski, J. (2002). The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. *Cell Mol Biol Lett* 7, 31-48.
- Kotrbová, L., Lara, A.C., Corretto, E., Scharfen, J., Ulmann, V., Petříčková, K., and Chroňáková, A. (2022). Evaluation and comparison of antibiotic susceptibility profiles of *Streptomyces* spp. from clinical specimens revealed common and region-dependent resistance patterns. *Scientific Reports* 12, 9353.
- Kremer, T.A., Lasarre, B., Posto, A.L., and Mckinlay, J.B. (2015). N<sub>2</sub> gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 2222-2226.
- Kroiss, J., Kaltenpoth, M., Schneider, B., Schwinger, M.G., Hertweck, C., Maddula, R.K., Strohm, E., and Svatos, A. (2010). Symbiotic *Streptomyces* provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nat Chem Biol* 6, 261-263.
- Kunchala, R., Durgalla, P., Banerjee, R., Datta Mazumdar, S., Vadlamudi, S., and Gopalakrishnan, S. (2017). Probiotic potential *Streptomyces* species from the grains of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *African Journal of Microbiology Research* 11, 553-559.
- Latha, S., Vinothini, G., John Dickson Calvin, D., and Dhanasekaran, D. (2016). In vitro probiotic profile based selection of indigenous actinobacterial probiont *Streptomyces* sp. JD9 for enhanced broiler production. *J Biosci Bioeng* 121, 124-131.
- Layton, E., Fairhurst, A.-M., Griffiths-Jones, S., Grecis, R.K., and Roberts, I.S. (2020). Regulatory RNAs: A Universal Language for Inter-Domain Communication. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 8919.
- Lazar, J.T., and Tabor, J.J. (2021). Bacterial two-component systems as sensors for synthetic biology applications. *Current Opinion in Systems Biology* 28, 100398.
- Lee, E.J., Karoonuthaisiri, N., Kim, H.S., Park, J.H., Cha, C.J., Kao, C.M., and Roe, J.H. (2005). A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 57, 1252-1264.
- Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Kim, J.H., Cho, S., Kim, H.U., Yoon, Y.J., Oh, M.K., Palsson, B.O., and Cho, B.K. (2021). Systems and synthetic biology to elucidate secondary metabolite biosynthetic gene clusters encoded in *Streptomyces* genomes. *Nat Prod Rep* 38, 1330-1361.
- Lee, Y., Lee, N., Jeong, Y., Hwang, S., Kim, W., Cho, S., Palsson, B.O., and Cho, B.K. (2019). The Transcription Unit Architecture of *Streptomyces lividans* TK24. *Front Microbiol* 10, 2074.
- Li, H., and Nicholson, A.W. (1996). Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *Embo j* 15, 1421-1433.

- Licona-Cassani, C., Lim, S., Marcellin, E., and Nielsen, L.K. (2014). Temporal dynamics of the Saccharopolyspora erythraea phosphoproteome. *Mol Cell Proteomics* 13, 1219-1230.
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., 3rd, Oakford, L., Yüksel, U., Giedroc, D.P., and Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli. *J Biol Chem* 272, 17502-17510.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174, 3843-3849.
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., and Buttner, M.J. (1994). Analysis of the Streptomyces coelicolor sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7573-7577.
- Lu, T., Wu, X., Cao, Q., Xia, Y., Xun, L., and Liu, H. (2022). Sulfane Sulfur Posttranslationally Modifies the Global Regulator AdpA to Influence Actinorhodin Production and Morphological Differentiation of Streptomyces coelicolor. *mBio* 13, e03862-03821.
- Luo, Y., Huang, H., Liang, J., Wang, M., Lu, L., Shao, Z., Cobb, R.E., and Zhao, H. (2013). Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster. *Nat Commun* 4, 2894.
- Lybecker, M., Zimmermann, B., Bilusic, I., Tukhtubaeva, N., and Schroeder, R. (2014). The double-stranded transcriptome of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3134-3139.
- Ma, M., Rateb, M.E., Yang, D., Rudolf, J.D., Zhu, X., Huang, Y., Zhao, L.X., Jiang, Y., Duan, Y., and Shen, B. (2017). Germicidins H-J from Streptomyces sp. CB00361. *J Antibiot (Tokyo)* 70, 200-203.
- Macquarrie, K.L., Fong, A.P., Morse, R.H., and Tapscott, S.J. (2011). Genome-wide transcription factor binding: beyond direct target regulation. *Trends Genet* 27, 141-148.
- Macrae, I.J., and Doudna, J.A. (2007). Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 17, 138-145.
- Mai, J., Rao, C., Watt, J., Sun, X., Lin, C., Zhang, L., and Liu, J. (2019). Mycobacterium tuberculosis 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones. *Nucleic Acids Res* 47, 4292-4307.
- Majdalani, N., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Bacterial Small RNA Regulators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40, 93-113.
- Manteca, A., Mäder, U., Connolly, B.A., and Sanchez, J. (2006). A proteomic analysis of Streptomyces coelicolor programmed cell death. *PROTEOMICS* 6, 6008-6022.
- Martien, J.I., Hebert, A.S., Stevenson, D.M., Regner, M.R., Khana, D.B., Coon, J.J., and Amador-Noguez, D. (2019). Systems-Level Analysis of Oxygen Exposure in Zymomonas mobilis: Implications for Isoprenoid Production. *mSystems* 4.
- Mcbride, M.J., and Ensign, J.C. (1987). Effects of intracellular trehalose content on Streptomyces griseus spores. *J Bacteriol* 169, 4995-5001.
- Mccormick, J.R., and Flärdh, K. (2012). Signals and regulators that govern Streptomyces development. *FEMS Microbiol Rev* 36, 206-231.
- Melamed, S., Adams, P.P., Zhang, A., Zhang, H., and Storz, G. (2020). RNA-RNA Interactomes of ProQ and Hfq Reveal Overlapping and Competing Roles. *Mol Cell* 77, 411-425.e417.

- Mikulik, K., Bobek, J., Bezouskova, S., Benada, O., and Kofronova, O. (2002). Expression of proteins and protein kinase activity during germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 335-342.
- Mikulik, K., Bobek, J., Zidkova, J., and Felsberg, J. (2014). 6S RNA modulates growth and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 7185-7197.
- Mikulik, K., Bobek, J., Zikova, A., Smetakova, M., and Bezouskova, S. (2011). Phosphorylation of ribosomal proteins influences subunit association and translation of poly (U) in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Biosyst* 7, 817-823.
- Mikulik, K., Paleckova, P., Felsberg, J., Bobek, J., Zidkova, J., and Halada, P. (2008). SsrA genes of streptomycetes and association of proteins to the tmRNA during development and cellular differentiation. *Proteomics* 8, 1429-1441.
- Mikulik, K., Suchan, P., and Bobek, J. (2001). Changes in ribosome function induced by protein kinase associated with ribosomes of *Streptomyces collinus* producing kirromycin. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 434-443.
- Miller, J.L., Cimen, H., Koc, H., and Koc, E.C. (2009). Phosphorylated proteins of the mammalian mitochondrial ribosome: implications in protein synthesis. *J Proteome Res* 8, 4789-4798.
- Miller, J.L., Koc, H., and Koc, E.C. (2008). Identification of phosphorylation sites in mammalian mitochondrial ribosomal protein DAP3. *Protein Sci* 17, 251-260.
- Minami, N., Suzuki, T., and Tsukamoto, S. (2007). Zygotic Gene Activation and Maternal Factors in Mammals. *Journal of Reproduction and Development* 53, 707-715.
- Missiakas, D., and Raina, S. (1998). The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* 28, 1059-1066.
- Moody, M.J., Young, R.A., Jones, S.E., and Elliot, M.A. (2013). Comparative analysis of non-coding RNAs in the antibiotic-producing *Streptomyces* bacteria. *BMC Genomics* 14, 558.
- Müller, P., Gimpel, M., Wildenhain, T., and Brantl, S. (2019). A new role for CsrA: promotion of complex formation between an sRNA and its mRNA target in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol* 16, 972-987.
- Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F.J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., and Pérez, J. (2016). Myxobacteria: Moving, Killing, Feeding, and Surviving Together. *Front Microbiol* 7, 781.
- Nádvořník, R., Vomastek, T., Janecek, J., Techniková, Z., and Branny, P. (1999). Pkg2, a novel transmembrane protein Ser/Thr kinase of *Streptomyces granaticolor*. *J Bacteriol* 181, 15-23.
- Nett, M., Ikeda, H., and Moore, B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26, 1362-1384.
- Nishiyama, T., Sakemi, H., Sumi, H., Tokunaga, S., Doi, K., and Ogata, S. (2000). A chromosomal locus encoding a phosphoserine phosphatase- and a truncated MinD-like protein affects differentiation in *Streptomyces azureus* ATCC14921. *FEMS Microbiology Letters* 190, 133-139.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.
- Noens, E.E., Mersinias, V., Willemse, J., Traag, B.A., Laing, E., Chater, K.F., Smith, C.P., Koerten, H.K., and Van Wezel, G.P. (2007). Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 64, 1244-1259.

- Olano, C., Méndez, C., and Salas, J.A. (2009). Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* 26, 628-660.
- Olivarius, S., Plessy, C., and Carninci, P. (2009). High-throughput verification of transcriptional starting sites by Deep-RACE. *BioTechniques* 46, 130-132.
- Oliver, K.M., Russell, J.A., Morant, N.A., and Hunter, M.S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1803-1807.
- Oliynyk, M., Samborsky, M., Lester, J.B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., Haydock, S.F., and Leadlay, P.F. (2007). Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nature Biotechnology* 25, 447-453.
- Otani, H., Udworthy, D.W., and Mouncey, N.J. (2022). Comparative and pangenomic analysis of the genus *Streptomyces*. *Scientific Reports* 12, 18909.
- Paget, M.S., and Helmann, J.D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* 4, 203.
- Paget, M.S., Kang, J.G., Roe, J.H., and Buttner, M.J. (1998). sigmaR, 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.
- Palecková, P., Bobek, J., Felsberg, J., and Mikulík, K. (2006). Activity of translation system and abundance of tmRNA during development of *Streptomyces aureofaciens* producing tetracycline. *Folia Microbiol (Praha)* 51, 517-524.
- Paleckova, P., Bobek, J., and Mikulik, K. (2009). tmRNA of *Streptomyces collinus* and *Streptomyces griseus* during the growth and in the presence of antibiotics. *Microb Biotechnol* 2, 114-122.
- Palecková, P., Felsberg, J., Bobek, J., and Mikulík, K. (2007). tmRNA abundance in *Streptomyces aureofaciens*, *S. griseus* and *S. collinus* under stress-inducing conditions. *Folia Microbiol (Praha)* 52, 463-470.
- Panek, J., Bobek, J., Mikulik, K., Basler, M., and Vohradsky, J. (2008). Biocomputational prediction of small non-coding RNAs in *Streptomyces*. *BMC Genomics* 9, 217.
- Panja, S., Schu, D.J., and Woodson, S.A. (2013). Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange. *Nucleic Acids Res* 41, 7536-7546.
- Papalazaridou, A., Kanata, E., and Sivropoulou, A. (2011). Germinant Generation from  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Strain 1.1. *Current Microbiology* 62, 1431-1437.
- Park, J.-H., Lee, J.-H., and Roe, J.-H. (2019). SigR, a hub of multilayered regulation of redox and antibiotic stress responses. *Molecular Microbiology* 112, 420-431.
- Park, J., Yim, S.S., and Wang, H.H. (2021). High-Throughput Transcriptional Characterization of Regulatory Sequences from Bacterial Biosynthetic Gene Clusters. *ACS Synthetic Biology* 10, 1859-1873.
- Persson, B.C., Bylund, G.O., Berg, D.E., and Wikström, P.M. (1995). Functional analysis of the *ffh-trmD* region of the *Escherichia coli* chromosome by using reverse genetics. *J Bacteriol* 177, 5554-5560.
- Petersen, F., Zähler, H., Metzger, J.W., Freund, S., and Hummel, R.P. (1993). Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. *J Antibiot (Tokyo)* 46, 1126-1138.

- Phelan, V.V., Liu, W.T., Pogliano, K., and Dorrestein, P.C. (2011). Microbial metabolic exchange--the chemotype-to-phenotype link. *Nat Chem Biol* 8, 26-35.
- Piel, J. (2004). Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* 21, 519-538.
- Piette, A., Derouaux, A., Gerkens, P., Noens, E.E., Mazzucchelli, G., Vion, S., Koerten, H.K., Titgemeyer, F., De Pauw, E., Leprince, P., Van Wezel, G.P., Galleni, M., and Rigali, S. (2005). From dormant to germinating spores of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new perspectives from the *crp* null mutant. *J Proteome Res* 4, 1699-1708.
- Price, B., Adamidis, T., Kong, R., and Champness, W. (1999). A *Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory gene, *absB*, encodes an RNase III homolog. *J Bacteriol* 181, 6142-6151.
- Quendera, A.P., Seixas, A.F., Dos Santos, R.F., Santos, I., Silva, J.P.N., Arraiano, C.M., and Andrade, J.M. (2020). RNA-Binding Proteins Driving the Regulatory Activity of Small Non-coding RNAs in Bacteria. *Front Mol Biosci* 7, 78.
- Rabyk, M., Yushchuk, O., Rokytskyy, I., Anisimova, M., and Ostash, B. (2018). Genomic Insights into Evolution of AdpA Family Master Regulators of Morphological Differentiation and Secondary Metabolism in *Streptomyces*. *Journal of Molecular Evolution* 86, 204-215.
- Rajkowitsch, L., and Schroeder, R. (2007). Dissecting RNA chaperone activity. *Rna* 13, 2053-2060.
- Raymond, F., Ouameur, A.A., Déraspe, M., Iqbal, N., Gingras, H., Dridi, B., Leprohon, P., Plante, P.L., Giroux, R., Bérubé, È., Frenette, J., Boudreau, D.K., Simard, J.L., Chabot, I., Domingo, M.C., Trottier, S., Boissinot, M., Huletsky, A., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., and Corbeil, J. (2016). The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *Isme j* 10, 707-720.
- Relhan, V., Mahajan, K., Agarwal, P., and Garg, V.K. (2017). Mycetoma: An Update. *Indian J Dermatol* 62, 332-340.
- Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., and Santamaría, R.I. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microbial Cell Factories* 12, 127.
- Romero-Rodríguez, A., Maldonado-Carmona, N., Ruiz-Villafán, B., Koirala, N., Rocha, D., and Sánchez, S. (2018). Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 111, 761-781.
- Rosenberg, A., Soufi, B., Ravikumar, V., Soares, N.C., Krug, K., Smith, Y., Macek, B., and Ben-Yehuda, S. (2015). Phosphoproteome dynamics mediate revival of bacterial spores. *BMC Biology* 13, 76.
- Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J.C., Pernet, D., Laplante, J.J., Millon, L., and Piarroux, R. (2005). Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case-control study. *Mycopathologia* 160, 273-279.
- Rückert, C., Albersmeier, A., Busche, T., Jaenicke, S., Winkler, A., Friðjónsson Ó, H., Hreggviðsson, G., Lambert, C., Badcock, D., Bernaerts, K., Anne, J., Economou, A., and Kalinowski, J. (2015). Complete genome sequence of *Streptomyces lividans* TK24. *J Biotechnol* 199, 21-22.
- Rutherford, S.T., and Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Salas, J.A., Guijarro, J.A., and Hardisson, C. (1983). High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination. *J Bacteriol* 155, 1316-1323.
- Santiago-Frangos, A., and Woodson, S.A. (2018). Hfq chaperone brings speed dating to bacterial sRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 9, e1475.

- Saramago, M., Barrria, C., Dos Santos, R.F., Silva, I.J., Pobre, V., Domingues, S., Andrade, J.M., Viegas, S.C., and Arraiano, C.M. (2014). The role of RNases in the regulation of small RNAs. *Curr Opin Microbiol* 18, 105-115.
- Scarborough, C.L., Ferrari, J., and Godfray, H.C.J. (2005). Ecology: Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310, 1781.
- Seipke, R.F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D.W., Goss, R.J., and Hutchings, M.I. (2011). A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS One* 6, e22028.
- Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., and Hutchings, M.I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol Rev* 36, 862-876.
- Sello, J.K., and Buttner, M.J. (2008). The gene encoding RNase III in *Streptomyces coelicolor* is transcribed during exponential phase and is required for antibiotic production and for proper sporulation. *J Bacteriol* 190, 4079-4083.
- Setinova, D., Smidova, K., Pohl, P., Music, I., and Bobek, J. (2017). RNase III-Binding-mRNAs Revealed Novel Complementary Transcripts in *Streptomyces*. *Front Microbiol* 8, 2693.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101, 514-525.
- Sexton, D.L., and Tocheva, E.I. (2020). Ultrastructure of Exospore Formation in *Streptomyces* Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Front Microbiol* 11, 581135.
- Shi, Z., Yang, W.Z., Lin-Chao, S., Chak, K.F., and Yuan, H.S. (2008). Crystal structure of *Escherichia coli* PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *Rna* 14, 2361-2371.
- Shiina, T., Tanaka, K., and Takahashi, H. (1991). Sequence of *hrdB*, an essential gene encoding sigma-like transcription factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2): homology to principal sigma factors. *Gene* 107, 145-148.
- Scharfen, J., Buncek, M., Jezek, P., Urbaskova, P., Fridrichova, M., Kristufek, V., and Chronakova, A. (2010). [Filamentous "contaminants" in the mycobacteriology laboratory; their culture, identification and clinical significance]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 16, 48-57.
- Sinai, L., Rosenberg, A., Smith, Y., Segev, E., and Ben-Yehuda, S. (2015). The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. *Molecular Cell* 57, 695-707.
- Smidova, K., Zikova, A., Pospisil, J., Schwarz, M., Bobek, J., and Vohradsky, J. (2019). DNA mapping and kinetic modeling of the HrdB regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* 47, 621-633.
- Smirnov, A., Forstner, K.U., Holmqvist, E., Otto, A., Gunster, R., Becher, D., Reinhardt, R., and Vogel, J. (2016). Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 11591-11596.
- Smirnov, A., Schneider, C., Hor, J., and Vogel Prof. Dr, J. (2017). Discovery of new RNA classes and global RNA-binding proteins. *Current Opinion in Microbiology* 39, 152-160.
- Soung, G.Y., Miller, J.L., Koc, H., and Koc, E.C. (2009). Comprehensive analysis of phosphorylated proteins of *Escherichia coli* ribosomes. *J Proteome Res* 8, 3390-3402.
- Storz, G., Vogel, J., and Wassarman, K.M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 43, 880-891.

- Strakova, E., Bobek, J., Zikova, A., Rehulka, P., Benada, O., Rehulkova, H., Kofronova, O., and Vohradsky, J. (2013a). Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*. *J Proteome Res* 12, 525-536.
- Strakova, E., Bobek, J., Zikova, A., and Vohradsky, J. (2013b). Global features of gene expression on the proteome and transcriptome levels in *S. coelicolor* during germination. *PLoS One* 8, e72842.
- Süsstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., and Thompson, C.J. (1998). Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 30, 33-46.
- Swiercz, J.P., Hindra, Bobek, J., Bobek, J., Haiser, H.J., Di Berardo, C., Tjaden, B., and Elliot, M.A. (2008). Small non-coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* 36, 7240-7251.
- Šiková, M., Janoušková, M., Ramaniuk, O., Páleníková, P., Pospíšil, J., Bartl, P., Suder, A., Pajer, P., Kubičková, P., Pavliš, O., Hradilová, M., Vítovská, D., Šanderová, H., Převorovský, M., Hnilicová, J., and Krásný, L. (2019). Ms1 RNA increases the amount of RNA polymerase in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 111, 354-372.
- Tan, H., Yang, H., Tian, Y., Wu, W., Whatling, C.A., Chamberlin, L.C., Buttner, M.J., Nodwell, J., and Chater, K.F. (1998). The *Streptomyces coelicolor* sporulation-specific sigma WhiG form of RNA polymerase transcribes a gene encoding a ProX-like protein that is dispensable for sporulation. *Gene* 212, 137-146.
- Tan, S., Lin, Y., Foo, K., Koh, H.F., Tow, C., Zhang, Y., Ang, L.W., Cui, L., Badaruddin, H., Ooi, P.L., Lin, R.T., and Cutter, J. (2016). Group B *Streptococcus* Serotype III Sequence Type 283 Bacteremia Associated with Consumption of Raw Fish, Singapore. *Emerg Infect Dis* 22, 1970-1973.
- Tanaka, K., Shiina, T., and Takahashi, H. (1988). Multiple Principal Sigma Factor Homologs in Eubacteria: Identification of the "rpoD Box". *Science* 242, 1040-1042.
- Tanaka, K., Shiina, T., and Takahashi, H. (1991). Nucleotide sequence of genes *hrdA*, *hrdC*, and *hrdD* from *Streptomyces coelicolor* A3(2) having similarity to *rpoD* genes. *Mol Gen Genet* 229, 334-340.
- Tanaka, Y., Kasahara, K., Hirose, Y., Murakami, K., Kugimiya, R., and Ochi, K. (2013). Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes. *J Bacteriol* 195, 2959-2970.
- Tatli, M., Hebert, A.S., Coon, J.J., and Amador-Noguez, D. (2019). Genome Wide Phosphoproteome Analysis of *Zymomonas mobilis* Under Anaerobic, Aerobic, and N(2)-Fixing Conditions. *Front Microbiol* 10, 1986.
- Teixeira, L., Ferreira, Á., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 6, 2753-2763.
- Tenconi, E., Traxler, M.F., Hoebreck, C., Van Wezel, G.P., and Rigali, S. (2018). Production of Prodiginines Is Part of a Programmed Cell Death Process in *Streptomyces coelicolor*. *Front Microbiol* 9, 1742.
- Tezuka, T., Hara, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2009). Identification and gene disruption of small noncoding RNAs in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 191, 4896-4904.
- Thomas, K.J., 3rd, and Rice, C.V. (2014). Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall. *Biometals* 27, 1361-1370.
- Thomason, M.K., and Storz, G. (2010). Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet* 44, 167-188.



- Thompson, B.J., Widdick, D.A., Hicks, M.G., Chandra, G., Sutcliffe, I.C., Palmer, T., and Hutchings, M.I. (2010). Investigating lipoprotein biogenesis and function in the model Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 77, 943-957.
- To, C.C., and Vohradsky, J. (2010). Measurement variation determines the gene network topology reconstructed from experimental data: a case study of the yeast cyclin network. *The FASEB Journal* 24, 3468-3478.
- Tocheva, E.I., Li, Z., and Jensen, G.J. (2010). Electron cryotomography. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003442.
- Toro, N., Jiménez-Zurdo, J.I., and García-Rodríguez, F.M. (2007). Bacterial group II introns: not just splicing. *FEMS Microbiol Rev* 31, 342-358.
- Tran, N.T., Huang, X., Hong, H.-J., Bush, M.J., Chandra, G., Pinto, D., Bibb, M.J., Hutchings, M.I., Mascher, T., and Buttner, M.J. (2019). Defining the regulon of genes controlled by  $\sigma^E$ , a key regulator of the cell envelope stress response in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 112, 461-481.
- Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C., and Kolter, R. (2013). Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio* 4.
- Ueda, K., Tomaru, Y., Endoh, K., and Beppu, T. (1997). Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces tanashiensis*. *J Antibiot (Tokyo)* 50, 693-695.
- Vaňková Hausnerová, V., Marvalová, O., Šíková, M., Shoman, M., Havelková, J., Kambová, M., Janoušková, M., Kumar, D., Halada, P., Schwarz, M., Krásný, L., Hnilicová, J., and Pánek, J. (2022). Ms1 RNA Interacts With the RNA Polymerase Core in *Streptomyces coelicolor* and Was Identified in Majority of Actinobacteria Using a Linguistic Gene Synteny Search. *Front Microbiol* 13, 848536.
- Verma, J., Attri, S., Arora, S., and Manhas, R.K. (2023). Antioxidant and chemoprotective potential of *Streptomyces levis* strain isolated from human gut. *AMB Express* 13, 69.
- Vetsigian, K., Jajoo, R., and Kishony, R. (2011). Structure and evolution of *Streptomyces* interaction networks in soil and in silico. *PLoS Biol* 9, e1001184.
- Viegas, S.C., Silva, I.J., Saramago, M., Domingues, S., and Arraiano, C.M. (2011). Regulation of the small regulatory RNA MicA by ribonuclease III: a target-dependent pathway. *Nucleic Acids Res* 39, 2918-2930.
- Vockenhuber, M.P., Sharma, C.M., Statt, M.G., Schmidt, D., Xu, Z., Dietrich, S., Liesegang, H., Mathews, D.H., and Suess, B. (2011). Deep sequencing-based identification of small non-coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*. *RNA Biol* 8, 468-477.
- Vockenhuber, M.P., and Suess, B. (2012). *Streptomyces coelicolor* sRNA scr5239 inhibits agarase expression by direct base pairing to the dagA coding region. *Microbiology (Reading)* 158, 424-435.
- Wakefield, J., Hassan, H.M., Jaspars, M., Ebel, R., and Rateb, M.E. (2017). Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. *Front Microbiol* 8, 1284.
- Ward, J.M., and Hodgson, J.E. (1993). The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a 'super-cluster' in three *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 110, 239-242.
- Wassarman Karen, M. (2018). 6S RNA, a Global Regulator of Transcription. *Microbiology Spectrum* 6, 10.1128/microbiolspec.rwr-0019-2018.

- Wassarman, K.M., and Saecker, R.M. (2006). Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* 314, 1601-1603.
- Wassarman, K.M., and Storz, G. (2000). 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* 101, 613-623.
- Waters, L.S., and Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136, 615-628.
- Watson, A.K., Kepplinger, B., Bakhiet, S.M., Mhmoud, N.A., Chapman, J., Allenby, N.E., Mickiewicz, K., Goodfellow, M., Fahal, A.H., and Errington, J. (2022). Systematic whole-genome sequencing reveals an unexpected diversity among actinomycetoma pathogens and provides insights into their antibacterial susceptibilities. *PLoS Negl Trop Dis* 16, e0010128.
- Weitbrecht, K., Müller, K., and Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* 62, 3289-3309.
- Willkomm, D.K., Minnerup, J., Hüttenhofer, A., and Hartmann, R.K. (2005). Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. *Nucleic Acids Research* 33, 1949-1960.
- Woodson, S.A., Panja, S., and Santiago-Frangos, A. (2018). Proteins That Chaperone RNA Regulation. *Microbiol Spectr* 6.
- Wower, J., Wower, I.K., Kraal, B., and Zwieb, C.W. (2001). Quality control of the elongation step of protein synthesis by tmRNP. *J Nutr* 131, 2978s-2982s.
- Wu, X., Chen, J., Xu, M., Zhu, D., Wang, X., Chen, Y., Wu, J., Cui, C., Zhang, W., and Yu, L. (2017). 16S rDNA analysis of periodontal plaque in chronic obstructive pulmonary disease and periodontitis patients. *J Oral Microbiol* 9, 1324725.
- Xu, Y., and Vetsigian, K. (2017). Phenotypic variability and community interactions of germinating *Streptomyces* spores. *Sci Rep* 7, 699.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., and Yokota, A. (2010). A life cycle of branched aerial mycelium- and multiple budding spore-forming bacterium *Thermosporothrix hazakensis* belonging to the phylum Chloroflexi. *J Gen Appl Microbiol* 56, 137-141.
- Yamamoto, Y., Sunohara, T., Jojima, K., Inada, T., and Aiba, H. (2003). SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. *Rna* 9, 408-418.
- Yim, G., Wang, H.H., and Davies, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 1195-1200.
- Yutin, N., and Galperin, M.Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ Microbiol* 15, 2631-2641.
- Zhang, N., and Buck, M. (2015). A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. *Biomolecules* 5, 1012-1019.
- Zhao, L., Sun, L., Guo, L., Lu, X., Malik, W.A., Chen, X., Wang, D., Wang, J., Wang, S., Chen, C., Nie, T., and Ye, W. (2022). Systematic analysis of Histidine photophosphotransfer gene family in cotton and functional characterization in response to salt and drought tolerance. *BMC Plant Biology* 22, 548.