

Abstrakt

Grampozitivní bakterie *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 je významným průmyslovým producentem aminokyselin a dalších metabolitů. Její genom kóduje 7 podjednotek sigma (σ) RNA polymerázy: primární faktor σ^A , primárnímu faktoru podobný σ^B a pět alternativních faktorů sigma, σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M (faktory s extracytoplazmatickou funkcí). Tato práce se zaměřila na odhalení dosud neznámých regulonů stresových faktorů sigma nebo upřesnění popisu regulonů, jejichž geny jsou řízeny faktory σ^D , σ^E , σ^H a σ^M , které byly zčásti popsány pro svou aktivitu při odpovědích na povrchový (σ^D a σ^E), tepelný (σ^E , σ^H a σ^M) a oxidativní stres (σ^H a σ^M). Vycházeli jsme z toho, že geny každého regulonu jsou přepisovány z jedné třídy promotorů.

Pro účely detailní analýzy promotorů bylo třeba vyvinout metody, které rychle a spolehlivě přiřadí faktor sigma k jednotlivým promotorům, a tedy i genům. K tomuto účelu byla vyvinuta kombinace metod *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripce) umožňující zpřesnit toto přiřazení. Těmito metodami jsme identifikovali 9 σ^H/σ^E -promiskuitních promotorů (*PamtR*, *Pcg0378*, *Pcg1121*, *Pcg3309*, *Pcg3344*, *PcglR*, *PdnaJ*, *PdnaK* a *PsigB*), 7 σ^D/σ^H -promiskuitních promotorů (*Pcg0607*, *Pcg2047*, *Pcmt2*, *PfadD2*, *Plpd*, *PlppS* a *PrsdA*) a 9 σ^H/σ^M -promiskuitních promotorů (*PbenA*, *PcatA1*, *Pcg0256*, *Pcg0668*, *Pcg0785*, *Pcg2322*, *Pcg2534*, *PsigM C. callunae* a *PsigM C. deserti*). Byly definovány konvenční sekvence dosud nepopsaných σ^E -dependentních (-35: GGAAC; -10: GTT) a σ^M -dependentních (-35: GGGAACC; -10: GTCNAA) promotorů.

Homologním modelováním byly objeveny a cílenou mutagenézí potvrzeny klíčové aminokyseliny pro specifické rozpoznání σ^H/σ^E -promiskuitních (arginin R185 faktoru σ^E a methionin M170 faktoru σ^H pro rozpoznání nukleotidové pozice -31) a σ^D/σ^H -promiskuitních promotorů (alanin A60 faktoru σ^D a lysin K53 faktoru σ^H pro rozpoznání druhého nukleotidu v oblasti -10 či valin V169 s alaninem A166 faktoru σ^D a serin S171 s threoninem T168 faktoru σ^H pro rozpoznání druhé pozice v oblasti -35).

Naše výsledky ukazují, že promiskuitní promotory jsou u *C. glutamicum* poměrně častou regulační strategií umožňující se vyrovnat efektivně s komplexními environmentálními stresi a nikoli neobvyklou výjimkou. Faktor σ^H u *C. glutamicum* hraje jako jeden z potenciálních globálních regulátorů zjevně nejdůležitější roli v regulační síti faktorů sigma, neboť je při rozpoznávání promotorů méně specifický než ostatní faktory sigma.

Klíčová slova: *Corynebacterium glutamicum*, faktor sigma, promiskuitní promotor, transkripce