

Svoluji k zapůjčení své dizertační práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.
Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Hana Dostálová

Funkce stresových sigma faktorů RNA polymerázy SigD, SigE,
SigH a SigM v transkripční regulační síti *Corynebacterium*
glutamicum

Function of stress sigma factors of RNA polymerase SigD, SigE,
SigH and SigM in transcription regulation network
of *Corynebacterium glutamicum*

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí práce:
Ing. Miroslav Pátek, CSc. (Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.)
Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 2019

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady během mého vypracovávání dizertační práce. Také bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Laboratoře modulace genové exprese za ochotu, pomoc a tvorbu příjemného pracovního prostředí.

Práce byla vypracována v Laboratoři modulace genové exprese Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. v Praze v období 2012 – 2019 v rámci projektu GAČR 17-06991S.

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: GGAACC; -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

Abstract

Grampositive bacterium *Corynebacterium glutamicum* is an important industrial producer of amido acids and other metabolites. Its genome encodes 7 sigma (σ) subunits of RNA polymerase: primary factor σ^A , primary-like σ^B and five alternative sigma factors, σ^C , σ^D , σ^E , σ^H and σ^M (sigma factors with extracytoplasmic function). This study is focused on revealing so far unknown regulons of stress sigma factors or closer description of regulons whose genes are controlled by σ^D , σ^E , σ^H and σ^M . These factors were partially described for their activity during surface (σ^D and σ^E), heat (σ^E , σ^H and σ^M) and oxidative (σ^H and σ^M) stress response. We assumed that the genes of each regulon are transcribed from promoters of a single class.

For the purpose of detailed promoter analysis, it was necessary to develop methods which can quickly and reliably assign sigma factor to particular promoters and, thus, respective genes. For this purpose, a combination of *in vivo* (two-plasmid system) and *in vitro* (*in vitro* transcription) techniques was developed that allow to specify this assignment. We identified 9 σ^H/σ^E -promiscuous promoters (*PamtR*, *Pcg0378*, *Pcg1121*, *Pcg3309*, *Pcg3344*, *PclgR*, *PdnaJ*, *PdnaK* and *PsigB*), 7 σ^D/σ^H -promiscuous promoters (*Pcg0607*, *Pcg2047*, *Pcmt2*, *PfadD2*, *Plpd*, *PlppS* and *PrsdA*) a 9 σ^H/σ^M -promiscuous promoters (*PbenA*, *PcatA1*, *Pcg0256*, *Pcg0668*, *Pcg0785*, *Pcg2322*, *Pcg2534*, *PsigM C. callunae* and *PsigM C. deserti*) with these methods. Consensus sequences of not yet described σ^E -dependent (-35: GGAAC; -10: GTT) and σ^M -dependent (-35: GGGAACC; -10: GTCNAA) promoters were defined.

Amino acids crucial for specific recognition of σ^H/σ^E -promiscuous promoters (arginine R185 of factor σ^E and methionine M170 of factor σ^H for recognition of -31 nucleic position) and σ^D/σ^H -promiscuous promoters (alanine A60 of factor σ^D and lysine K53 of factor σ^H for recognition of second nucleotide in region -10 or valine V169 with alanine A166 of factor σ^D and serine S171 with threonine T168 of factor σ^H for recognition of second position in region -35) were found by homologous modeling and confirmed by targeted mutagenesis.

Our results show that promiscuous promoters are not an unusual exception in *C. glutamicum* but represent relatively frequent regulatory strategy enabling the organism to effectively cope with complex environmental stresses. The *C. glutamicum* σ^H factor plays evidently the most important role as one of the potential global regulators in regulatory network of sigma factors because it is less specific in recognition of promoters than others sigma factors.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, sigma factor, promiscuous promoter, transcription

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíle práce	2
2. Přehled literatury	3
2.1. Rod <i>Corynebacterium</i>	3
2.1.1. Využití kmenů <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
2.2. Transkripce a její regulace.....	7
2.2.1. RNA polymeráza	7
2.2.2. Promotory	8
2.2.2.1. Promiskuitní promotory.....	9
2.2.3. Faktory sigma	10
2.2.3.1. Role faktorů sigma při iniciaci transkripce.....	10
2.2.3.2. Rozdělení faktorů sigma	10
2.2.3.2.1. Rodina σ^{70}	11
2.2.3.2.2. Rodina σ^{54}	13
2.2.3.3. Faktory sigma u <i>Corynebacterium glutamicum</i>	14
2.2.4. Faktory anti- σ	19
2.2.4.1. Klasifikace faktorů anti- σ	20
2.2.4.2. Mechanismy rozvolnění komplexu σ /anti- σ	21
2.2.4.3. Faktory anti- σ u <i>Corynebacterium glutamicum</i>	22
3. Materiál a metody	24
3.1. Materiál.....	24
3.1.1. Kultivační půdy	24
3.1.2. Bakteriální kmeny.....	24
3.1.3. Plazmidy	25
3.1.3.1. Použité plazmidové vektory	25
3.1.3.2. Zkonstruované plazmidy	31
3.1.4. Primery pro PCR	33
3.1.5. Komerční soupravy.....	39
3.1.6. Použitý software	39
3.1.7. Přístroje.....	40
3.2. Metody	41
3.2.1. Kultivace kmenů <i>E. coli</i> a <i>C. glutamicum</i>	41
3.2.2. Izolace nukleových kyselin.....	41
3.2.2.1. Izolace plazmidové DNA z kmene <i>E. coli</i>	41
3.2.2.2. Miniizolace plazmidové DNA z kmene <i>E. coli</i>	42
3.2.2.3. Miniizolace plazmidové DNA z <i>C. glutamicum</i>	43
3.2.2.4. Extrakce DNA fenolem	44
3.2.2.5. Srážení DNA etanolem	44
3.2.2.6. Izolace chromozomální DNA z <i>C. glutamicum</i>	45
3.2.3. Transformace	45
3.2.3.1. Transformace <i>E. coli</i>	45
3.2.3.2. Transformace buněk <i>C. glutamicum</i> elektroporací.....	46
3.2.4. Dlouhodobé uchovávání buněk v glycerolu při -70 °C	47
3.2.5. Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu	47
3.2.6. Elektroforetická analýza SDS-PAGE	48
3.2.7. Izolace plazmidové DNA a jejích fragmentů z agarózového gelu	49
3.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	49
3.2.9. Štěpení DNA restrikcími endonukleázami	50

3.2.10. Ligace fragmentů plazmidové DNA	51
3.2.11. Stanovení aktivity promotorů fluorometricky	51
3.2.12. <i>In vitro</i> transkripční systém	53
3.2.12.1. Izolace jádra RNA polymerázy a faktorů sigma	53
3.2.12.2. Klonování promotorových oblastí pomocí komplementárních oligonukleotidů	54
3.2.12.3. Příprava templátové DNA	55
3.2.12.4. Transkripční reakce <i>in vitro</i>	56
4. Výsledky	58
4.1. Konstrukce dvouplazmidového systému	58
4.1.1. Výběh expresního a <i>promoter-probe</i> vektoru	58
4.1.1.1. Klonování genu <i>gfpuv</i> v expresním vektoru pEC-XT99A	59
4.1.1.2. Optimalizace podmínek exprese v buňkách <i>C. glutamicum</i>	59
4.1.1.3. Optimalizace podmínek homogenizace buněk <i>C. glutamicum</i>	60
4.1.1.4. Klonování genů faktorů sigma v expresním vektoru pEC-XT99A	61
4.1.1.5. Klonování promotorů v <i>promoter-probe</i> vektoru pEPR1	62
4.1.2. Testování promotorů rozpoznávaných různými faktory sigma	62
4.1.2.1. Testování σ^A -dependentního promotoru <i>P2sigA</i>	62
4.1.2.2. Testování σ^B -dependentního promotoru <i>Pfba</i>	64
4.1.2.3. Testování σ^C -dependentního promotoru <i>Pcg2556</i>	66
4.1.2.4. Testování σ^D -dependentního promotoru <i>Pcmt1</i>	67
4.1.2.5. Testování σ^E -dependentního promotoru <i>PsigB</i>	69
4.1.2.6. Testování σ^H -dependentního promotoru <i>PrshA</i>	70
4.1.2.7. Testování předpokládaného σ^M -dependentního promotoru <i>PtrxB1</i>	72
4.2. σ^H/σ^E -promiskuitní promotory	73
4.2.1. Analýza aktivit promotorů	75
4.2.1.1. Konstrukce vektorů s promotory	75
4.2.1.2. <i>In vivo</i> a <i>in vitro</i> analýza promotorů	76
4.2.2. Homologní modelování	80
4.2.3. Ověření <i>in silico</i> modelů metodou <i>in vivo</i>	81
4.2.3.1. Konstrukce vektorů s mutovanými faktory sigma	83
4.2.3.2. Konstrukce vektorů s mutovanými promotory	83
4.2.3.3. <i>In vivo</i> analýza dvouplazmidových systémů	83
4.3. σ^D/σ^H -promiskuitní promotory	86
4.3.1. Konstrukce vektorů s promotory	87
4.3.2. <i>In vivo</i> a <i>in vitro</i> analýza promotorů	87
4.3.3. Homologní modelování	91
4.3.4. Ověření <i>in silico</i> modelů metodou <i>in vivo</i>	93
4.3.4.1. Konstrukce plazmidů nesoucích mutovaný faktor σ^H	93
4.3.4.2. <i>In vivo</i> analýza dvouplazmidových systémů	93
4.4. σ^H/σ^M -promiskuitní promotory	95
4.4.1. Konstrukce vektorů s promotory	98
4.4.2. <i>In vivo</i> a <i>in vitro</i> analýza promotorů	99
4.4.3. Vliv mutantního konstruktu pEC-XT99A/ <i>sigM</i> na σ^M -dependentní promotory	104
5. Diskuze	106
6. Souhrn	120
7. Seznam citované literatury	121

Seznam použitých zkratek

A – adenin

aa – aminokyselinový zbytek

Ap – ampicilin

APS – amonumpersulfát

ASD – strukturní motiv N-terminální domény faktoru anti- σ

ATP – adenosintrifosfát

bEBP – protein vázající bakteriální enhancer (*bacterial enhancer-binding protein*)

bp – páry bází

BSA – hovězí sérový albumin

C – cytosin

CBD – doména vázající jádro RNA polymerázy (*core binding domain*)

CG – *Corynebacterium glutamicum*

CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleosidtrifosfát

dTTP – deoxythymidintrifosfát

EC – *Escherichia coli*

EDTA – kyselina etylendiaminotetraoctová

ELH-HTH doména – doména tvořená extra dlouhým α helixem a strukturou helix-smyčka-helix

G – guanin

IHF – DNA vazebný protein (*integration host factor*)

IPTG – isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

KAc – octan draselný

Kb – tisíce párů bází

Km – kanamycin

Km30 – kanamycin o koncentraci 30 μ g/ml

k. – kyselina

nt – nukleotidy

OD₆₀₀ – optická denzita při vlnové délce 600 nm

PCR – polymerázová řetězová reakce

PMSF – fenylmetylsulfonylfluorid

RNA –ribonukleová kyselina

RNAP – RNA polymeráza

RPc – „uzavřený“ komplex během iniciace transkripce

RPo – „otevřený“ komplex během iniciace transkripce

SDS – sodiumdodecylsulfát

σ – sigma, označení pro faktory sigma

T – thymin

Tc – tetracyklin

Tc10 – tetracyklin o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin

Tris – tris-hydroxymetylaminometan

TSP – transkripční počátek

WT – divoký typ (*wild type*)

ZAS – zinek vážící anti-sigma doména

1. Úvod

Corynebacterium glutamicum je grampozitivní nepatogenní nesporulující fakultativně anaerobní bakterie řazená do kmene Actinobacteria. Již od 60. let minulého století se *C. glutamicum* využívá pro průmyslovou produkci L-aminokyselin, přičemž dominantními produkty jsou kyselina L-glutamová a L-lysin. Bakterie *C. glutamicum* je také využívána pro extracelulární produkci různých heterologních proteinů. Současným trendem genových manipulací u *C. glutamicum* je bioinženýrství transkripčních regulátorů, využívající i metod syntetické biologie, zaměřené na cílené a striktně regulované zvýšení produkce žádaných látek. Vedle využití v biotechnologických procesech slouží *C. glutamicum* též jako modelový organismus pro studium ostatních korynebakterií a také patogenních druhů kmene Actinobacteria (např. mykobakterie).

Iniciace transkripce z promotorů u bakterií vyžaduje oddělitelnou specifickou podjednotku RNA polymerázy faktor sigma (σ). Faktor sigma umožňuje rozeznat promotor a navázat RNA polymerázu k promotorové oblasti DNA. V *C. glutamicum* bylo objeveno sedm faktorů sigma - primární faktor σ^A , neesenciální faktor σ^B podobný primárnímu faktoru sigma a pět alternativních faktorů sigma (σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M).

Funkce stresových faktorů sigma lze odhalit identifikací genů, které patří do příslušného regulonu faktoru sigma. Tyto geny se vyznačují tím, že jsou přepisovány z promotorů patřících do příslušné třídy. Charakterizace promotorů je tedy klíčová podmínka pro správné přiřazení genů do jednotlivých regulonů faktorů sigma (sigmulonů).

Bakteriální promotory se mohou rozdělit do dvou základních skupin, a to na skupinu promotorů vegetativních genů rozpoznávaných faktorem σ^A a skupinu stresových promotorů rozeznávaných alternativními faktory sigma (u *C. glutamicum*: σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H nebo σ^M). Některé geny přitom patří do dvou či více sigmulonů, jelikož jsou transkribovány z několika promotorů rozeznávaných různými faktory sigma. V nedávné době byly u *C. glutamicum* navíc objeveny promotory rozpoznávané dvěma či více stresovými faktory sigma (promiskuitní promotory). To je umožněno překrýváním specifity faktorů sigma při rozeznávání promotorů. Tyto komplexní vztahy mezi faktory sigma a promotory jsou součástí buněčných regulačních sítí a přispívají tak k optimální odpovědi bakteriální buňky na různé environmentální stimuly a kombinované stresové podmínky.

1.1. Cíle práce

Cílem této dizertační práce bylo najít v *C. glutamicum* dosud neznámé regulony řízené stresovými faktory sigma (σ^E a σ^M) a u některých regulonů upřesnit jejich popis (σ^D a σ^H). Práce byla zaměřena zejména na lokalizaci promotorů příslušných genů, definování konvenční sekvence těchto promotorů a nalezení případných překryvů specifity faktorů sigma při rozeznávání promotorů. Identifikací a zařazením promotoru do třídy (tedy příslušnosti k danému faktoru sigma) lze spolehlivě odhalit geny, které patří do hledaného regulonu faktoru sigma.

Pro účely detailní analýzy promotorů bylo nejprve třeba vyvinout metodu, která spolehlivě přiřadí faktor sigma k jednotlivým promotorům. Součástí *in vivo* metodiky byla konstrukce dvouplazmidového systému, který zahrnuje expresní vektor s klonovaným genem pro faktor sigma a promotor-test vektor nesoucí zkoumaný promotor. Kombinace této *in vivo* techniky s *in vitro* transkripčním systémem měla být spolehlivým přístupem pro analýzu těchto promotorů. Cílem bylo ověřit data získaná použitím globálních technik na úrovni genomu (transkriptomiky, proteomiky) detailní analýzou na úrovni genu a promotoru.

Dizertační práce měla tyto dílčí cíle:

- 1) Konstrukce dvouplazmidového systému pro analýzu promotorů
- 2) Nalezení vztahu mezi regulony faktorů σ^H a σ^E pomocí popisu promotorů genů
- 3) Identifikace genů patřících do regulonu faktoru σ^D a definice jejich promotorů
- 4) Identifikace genů patřících do regulonu faktoru σ^M a definice jejich promotorů

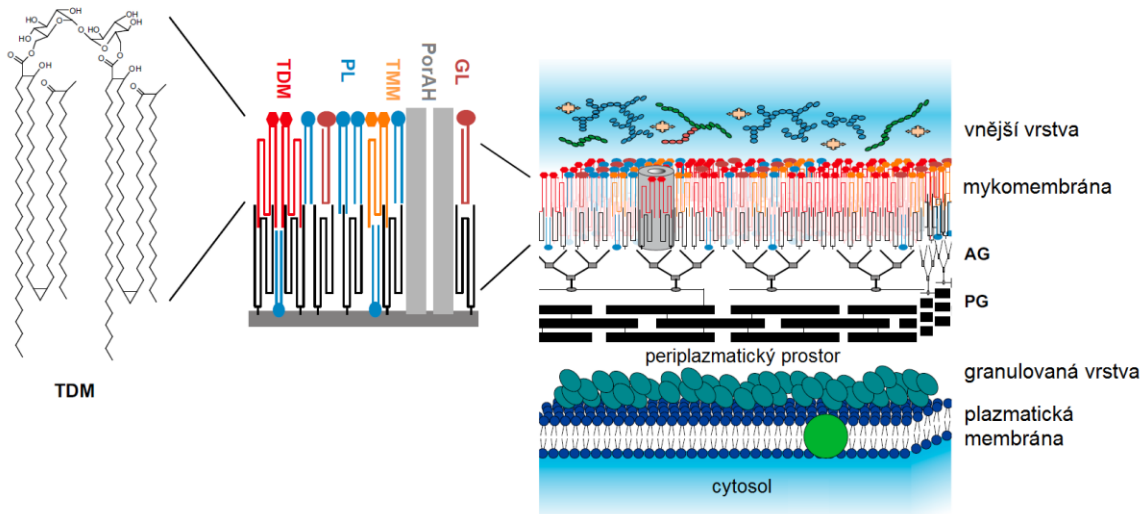
2. Přehled literatury

2.1. Rod *Corynebacterium*

Bakteriální rod *Corynebacterium* se řadí do kmene Actinobacteria, řádu Actinomycetales, který také obsahuje rody *Mycobacterium*, *Streptomyces* a *Nocardia* (Ventura *et al.*, 2007). Jedná se o grampozitivní nesporulující bakterie, které nejsou acidorezistentní (Souček, 1996). V DNA jejich genomu mírně převažují GC páry (54 %).

Pro bakterie tohoto rodu je charakteristická jejich mykomembrána (Obr. 1). Tato vnější vrstva buněčné stěny, obsahující α -rozvětvené β -hydroxylované mastné kyseliny s dlouhými řetězci (mykolové kyseliny) připomíná vnější membránu gramnegativních bakterií a funguje jako vnější permeabilní bariéra (Jarlier a Nikaido, 1990; Gebhardt *et al.*, 2007). Mykomembránu tvoří dvojvrstva: vnitřní část obsahuje mykolové kyseliny kovalentně vázané na heteropolysacharid arabinogalaktan, zatímco vnější část zahrnuje mykolové kyseliny vázané na trehalosu a další lipidy či proteiny. Délka řetězců mykolových kyselin jednotlivých rodů bakterií skupiny *Mycolata* je proměnlivá a závisí na růstových podmínkách (Marrakchi *et al.*, 2014). Nejkratší řetězce mykolových kyselin mají druhy rodu *Corynebacterium* (C₁₆ až C₃₆) (Yang *et al.*, 2012), zatímco u mykobakterií dosahují řetězce mykolových kyselin délky až C₉₀ (Barry *et al.*, 1998). Jelikož mykolové kyseliny hrají důležitou roli v patogenezi, je jejich syntéza studována jako možný cíl antibiotik (Pawelczyk a Kremer, 2014), a to zejména u kmene *C. glutamicum*, který je blízce příbuzný patogenním druhům (Portevin *et al.*, 2004).

Rod *Corynebacterium* zahrnuje jak lidské a zvířecí patogeny, tak i nepatogenní druhy. Mezi patogeny se řadí *Corynebacterium diphtheriae* (původce záškrtu), *Corynebacterium ulcerans* (původce angín), *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (původce endokarditidy), *Corynebacterium jeikeium* (způsobující infekce u imunokompromitovaných pacientů po kardiochirurgických zákrocích), *Corynebacterium urealyticum* (původce močové infekce) a *Corynebacterium pseudotuberculosis* (zvířecí patogen vyvolávající záněty mizních uzlin a zápaly plic) (Souček, 1996).



Obrázek 1. Schéma buněčné stěny obsahující mykolové kyseliny.

Vnější vrstva se skládá především z glukánů, proteinů a nevelkého množství lipidů. Vnitřní vrstva je tvořena paralelním uspořádáním řetězců mykolových kyselin (černě) vázaných na arabinogalaktan (AG), který se kovalentně váže na peptidoglykan (PG). Vnitřní vrstva se patrně skládá z volných lipidů zahrnujících trehalóza dimykoláty (TDM, červeně), trehalóza monomykoláty (TMM, oranžově), různé glykolipidy (GL, hnědě), fosfolipidy (PL, modře) a porin modifikovaný mykoláty (PorAH, šedě). Zobrazený TDM má velmi dlouhý uhlíkový řetězec, který se musí zabalit po složení na místě motivů (zde mykolová jednotka, cyklopropan a keto skupina), aby se zformoval do běžné tloušťky membrány 7-8 nm. Granulární vrstva nad plazmatickou membránou je složena z proteinů. Tyto proteiny mohou precipitovat během přípravy vzorku pro transmisní elektronovou mikroskopii a výsledkem je silnější vzhled vnější vrstvy plazmatické membrány. Podle Zuber *et al.*, 2008; Marrakchi *et al.*, 2014; Toyoda a Inui, 2018; upraveno.

Corynebacterium glutamicum je nepatogenní nesporeující fakultativně anaerobní bakterie mající rovné nebo zakřivené tyčinky, často kyjovitě rozšířené a seskupené palisádovitě nebo do pravouhlých útvarů. Toto seskupení vzniká posunutím buněk při buněčném dělení. Mateřská buňka se po prodloužení a vzniku septa štěpí na 2 dceřiné buňky, které v místě dělení zůstávají nejprve spojeny a svírají úhel 90°-100° (Souček, 1996). Kolonie *C. glutamicum* jsou charakteristické svým nažloutlým zabarvením způsobeným biosyntézou C50 karotenoidu dekaprenoxanthinu a jeho glykosidů (Krubasik *et al.*, 2001).

Genetické manipulace byly u *C. glutamicum* zahájeny v roce 1984 (Katsumata *et al.*, 1984; Ozaki *et al.*, 1984; Santamaría *et al.*, 1984), kdy byly izolovány malé plazmidy z různých kmenů tohoto druhu. Od té doby byly vyvinuty další metody pro genové manipulace, které byly úspěšně použity pro analýzu funkcí genů a pro konstrukci či vylepšení produkčních kmenů. Na mnohem vyšší úroveň se genetické modifikace dostaly po stanovení úplné sekvence genomu dvou kmenů *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003; Yukawa *et al.*, 2007). Současným hitem genových manipulací u *C. glutamicum* je

inženýrství transkripčních regulátorů, neboť umožňuje cílené zvýšení produkce žádaných látek (Toyoda *et al.*, 2015; Taniguchi a Wendisch, 2015; Taniguchi *et al.*, 2017a).

V současné době slouží *C. glutamicum* jako modelový organismus pro blíže příbuzné patogenní druhy při studiu struktury a biogeneze buněčných obalů, např. analýze složení mykolové membrány, u kmenů ze skupiny Actinobacteria (Hoffmann *et al.*, 2008; Bansal-Mutalik a Nikaido, 2011; Marchand *et al.*, 2011; Toyoda a Inui, 2018).

2.1.1. Využití kmenů *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum se již od 60. let minulého století využívá pro průmyslovou produkci L-aminokyselin (Yamada *et al.*, 1972; Aida *et al.*, 1986; Leuchtenberger, 1996; Ikeda, 2003), které jsou dosud stále nejběžnější ze všech fermentačních produktů *C. glutamicum*. Kromě klasického genetického šlechtění (náhodné mutagenese a selekce) byly produkční kmeny pro různé L-aminokyseliny vytvořeny pomocí cíleného genového inženýrství, přičemž dominantními produkty jsou kyselina L-glutamová (3,1 miliony tun/rok)¹ a L-lysin (2,2 milionu tun/rok)² (Tab. 1). Zároveň bylo prokázáno, že buňky *C. glutamicum* mohou syntetizovat a exportovat i farmaceuticky důležité D-aminokyseliny (Bommarius *et al.*, 1998; Stäbler *et al.*, 2011).

Tabulka 1. Výběr ekonomicky důležitých aminokyselin produkovaných *C. glutamicum*.

Aminokyselina	Využití	Reference
L-glutamová	Potravinářství	Kinoshita <i>et al.</i> , 1957; Leuchtenberger <i>et al.</i> , 2005
L-lysin	Potravinářství, krmivářství	Becker <i>et al.</i> , 2011
L-valin	Farmacie, zemědělství	Holátko <i>et al.</i> , 2009
L-ornithin	Farmacie, potravinářství	Jiang <i>et al.</i> , 2013a, 2013b; Kim <i>et al.</i> , 2015
L-leucin	Farmacie, krmivářství, dietní produkty	Vogt <i>et al.</i> , 2014
γ-aminomáselná (GABA)	Zdravotnictví, potravinářství, krmivářství	Jorge <i>et al.</i> , 2016

¹ <http://www.ajinomoto.com/en/ir/pdf/Food-Oct2016.pdf>

² http://www.ajinomoto.com/en/ir/pdf/Life_Support-Oct2016.pdf

Genom *C. glutamicum* poskytuje rovněž bohatý repertoár atraktivních metabolických drah pro průmyslovou produkci různých metabolitů (Ikeda a Nagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2006), který syntetická biologie ještě rozšířila o nové a nepřirodní chemikálie či biochemikálie, biomateriály a biopaliva (Tab. 2). Z hlediska rozšíření použitelných levných substrátů pro biotechnologické aplikace jsou

konstruovány kmeny *C. glutamicum* pro efektivní utilizaci pentózových cukrů odvozených od hemicelulózy i pro přímou utilizaci hemicelulózy (např. D-xylóza (Radek *et al.*, 2017), L-arabinóza (Kawaguchi *et al.*, 2018)).

Tabulka 2. Výběr chemikálií, materiálů a paliv produkovaných *C. glutamicum*.

Produkt	Využití	Reference
Dimethyl-, trimethyl-, tetramethylpyrazin	Potravinářství - aroma a příchutě do potravin	Dickschat <i>et al.</i> , 2010
Kyselina mravenčí	Zdravotnictví, průmysl	Xafenias <i>et al.</i> , 2016
Etanol	Bio-palivo, chemický průmysl, kosmetika	Jojima <i>et al.</i> , 2015
Isobutanol	Bio-palivo	Yamamoto <i>et al.</i> , 2013
Kadaverin (1,5-diaminopentan)	Potravinářství, automobilový průmysl	Kim <i>et al.</i> , 2018
Putrescín (1,4-diaminobutan)	Bioplasty, farmacie, zemědělství	Li <i>et al.</i> , 2018
Kyselina poly-3-hydroxymásečná	Biologicky odbouratelný polymer	Song <i>et al.</i> , 2013
Nylon (polyamid)	Farmacie, průmysl	Kind <i>et al.</i> , 2014
Kyselina 5-aminovalerová	Průmysl	Shin <i>et al.</i> , 2016
Kyselina jantarová	Chemický průmysl, farmacie, potravinářství, zemědělství	Jojima <i>et al.</i> , 2016
Kyselina glutarová	Průmysl	Kim <i>et al.</i> , 2019

Vzhledem k tomu, že bakterie *C. glutamicum* exkretuje velmi malý počet proteinů do media a nemá funkční extracelulární proteázy (Yim *et al.*, 2016), je vhodná pro extracelulární produkci různých heterologních proteinů. Mezi tyto proteiny patří průmyslové enzymy (např. α -amyláza, endoxylanáza (Yim *et al.*, 2016)) a farmaceutické proteiny (např. velbloudí protilátkový fragment VHH proti lidskému lysozymu (Yim *et al.*, 2016)), jednořetězcový variabilní fragment (scFv) proti antraxovému toxinu (Yim *et al.*, 2014) či rostlinné polyfenoly mající antimikrobiální, protirakovinné nebo protizánětlivé účinky, jako například quercetin (Kallscheuer *et al.*, 2017). Příkladem úspěšných konstruktů pro extracelulární produkci je nový sekreční systém využívající signální peptid PorB (An *et al.*, 2013).

V poslední době je u *C. glutamicum* také na vzestupu inženýrství transkripčních regulátorů a faktorů sigma pro zvýšení produkce žádaných sloučenin. Nadprodukce primárního faktoru σ^A zvyšuje produkci lykopenu až 8x a přírodního karotenoidu dekaprenoxanthinu až dvojnásobně (Taniguchi *et al.*, 2017a). Nadprodukce dalšího faktoru sigma, σ^H , zvyšuje syntézu riboflavinu (Taniguchi a Wendisch, 2015; Toyoda *et*

al., 2015). Dalším směrem vývoje produkčních kmenů může být využití promotoru regulovaného faktorem σ^B aktivovaného během stacionární fáze růstu (Kim *et al.*, 2016).

2.2. Transkripce a její regulace

Klíčovým enzymem bakteriální transkripce je multimerní holoenzym RNA polymerázy.

Proces transkripce se rozděluje u bakterií do tří stadií – iniciace transkripce, elongace řetězce RNA a terminace transkripce s uvolněním vzniklé molekuly RNA. Během iniciace se váže holoenzym RNA polymerázy (obsahující faktor sigma) na promotorovou oblast DNA, poté se faktor sigma uvolní a jádro enzymu zahájí elongační fázi syntézy RNA.

Elongace probíhá v transkripční bublině, tj. v části, kde došlo k lokálnímu rozvinutí DNA, přičemž vznikající řetězec je vytěšňován od templátového vlákna DNA.

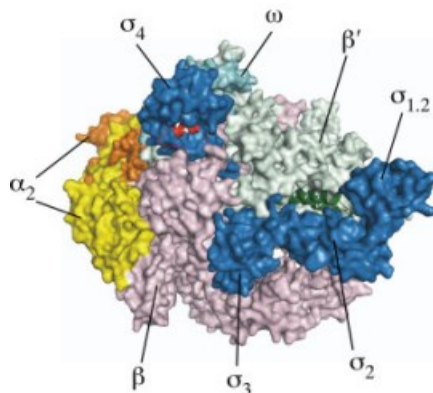
Terminace biosyntézy RNA nastává v místě terminátoru transkripce, kdy se terminační komplex rozpadne a uvolní vzniklou molekulu RNA (Snustad a Simmons, 2009).

2.2.1. RNA polymeráza

Bakteriální RNA polymeráza (RNAP) se skládá z katalytického jádra, obsahujícího pět podjednotek - dimer 2α , β , β' , ω , a disociovatelné podjednotky faktoru sigma (σ) (Obr. 2). RNAP s navázaným faktorem sigma se označuje jako holoenzym, což je aktivní forma enzymu. Podjednotka α hraje důležitou roli nejen v sestavení RNA polymerázy, která probíhá v pořadí $\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_2\beta\beta' \rightarrow \alpha_2\beta\beta'\sigma$, ale i v rozpoznání promotorové sekvence a v interakci RNA polymerázy s transkripčními aktivátory. Podjednotky β a β' společně tvoří katalytické centrum RNA polymerázy a účastní se všech fází transkripce. Podjednotka β je v kontaktu s templátovou DNA, s nově syntetizovanou RNA a substrátovými ribonukleotidy, zatímco podjednotka β' je hlavně v kontaktu se vznikajícím řetězcem RNA. Poslední podjednotkou jádra RNA polymerázy je podjednotka ω , která nemá přímou roli v transkripci, ale funguje jako chaperon pro složení podjednotky β' (Amster-Choder, 2009).

Faktor sigma je zodpovědný za rozpoznání promotorové oblasti DNA a není vázán k jádru RNA polymerázy stejně pevně jako ostatních pět podjednotek, nýbrž je snadno disociovatelný (Madigan *et al.*, 2012).

Holoenzym RNA polymerázy selektivně rozpoznává promotorové oblasti, zatímco jádro RNA polymerázy zodpovídá pouze za elongaci a terminaci transkripce, nikoliv však za selektivní iniciaci transkripce (Amster-Choder, 2009).



Obrázek 2. Holoenzym RNA polymerázy.

Jednotlivé podjednotky RNA polymerázy jsou znázorněny barevně – podjednotka α_2 dimer žlutě, podjednotka β růžově, podjednotka β' světle zeleně, podjednotka ω zelenomodře a faktor sigma σ tmavě modře. Popsány jsou i jednotlivé domény faktoru sigma (Geiduschek a Kassavetis, 2010).

2.2.2. Promotory

Promotor genu je charakteristický úsek DNA, který RNA polymeráza rozpoznává prostřednictvím faktoru sigma a zahajuje tak transkripci. Typický promotor *E. coli* rozpoznávaný holoenzymem RNAP+ σ^{70} obsahuje čtyři konzervované oblasti: oblast -35, mezerník (*spacer*) mezi oblastmi -35 a -10, oblast -10 a počátek transkripce. Báze, jež je bodem startu transkripce, je obvykle purin (A nebo G). Obě promotorové oblasti -35 a -10 jsou specifické hexanukleotidy se středem ve vzdálenosti přibližně 35 nt či 10 nt před počátkem transkripce, přičemž jejich konvenční sekvence (-35: TTGACA, -10: TATAAT) byly stanoveny statisticky. Délka mezerníku mezi oblastmi -35 a -10 je obvykle 17 ± 1 nt. Pokud se délka mezerníku odchyluje od této hodnoty, promotorová aktivita se snižuje (Amster-Choder, 2009).

Některé promotory však obsahují ještě další oblasti ovlivňující účinnost (sílu) promotoru při iniciaci transkripce, a to například UP element nacházející se na pozici přibližně 40 - 60 nt před počátkem transkripce. Je to oblast bohatá na báze A+T, která interaguje s podjednotkou α RNA polymerázy a zvyšuje tak sílu promotoru (Ross *et al.*, 2001). Další oblastí ovlivňující sílu promotoru je dimer TG v pozici -13 a -12 proti směru transkripce od promotorové oblasti -10 (TGNTATAAT) (Burr *et al.*, 2000).

Promotory se mohou rozdělit do dvou základních skupin, a to podle faktorů sigma, které rozpoznávají příslušnou promotorovou sekvenci. Skupina vegetativních promotorů je rozpoznávána esenciálním faktorem σ^A a zahrnuje největší počet promotorů. Skupina stresových promotorů je podstatně menší, avšak je dále dělena podle toho, jakým faktorem sigma (u *C. glutamicum*: σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H nebo σ^M) jsou jednotlivé promotory rozpoznávány (Amster-Choder, 2009; Pátek a Nešvera, 2011).

2.2.2.1. Promiskuitní promotory

Soubor genů regulovaný určitým faktorem sigma se označuje jako sigmulon. Bylo zjištěno, že dochází též k překryvu jednotlivých sigmulonů. Na první pohled se to sice může zdát jako nadbytečná regulace, avšak tato komplexnost vylepšuje odpověď na různé environmentální stimuly a kombinované stresové podmínky. Některé geny patří do dvou či více sigmulonů, jelikož jsou transkribovány buď z několika promotorů rozeznávaných různými faktory sigma, nebo jsou transkribovány dvěma či více různými holoenzymy (jádro RNA polymerázy + faktor σ), které řídí transkripci ze stejného promiskuitního promotoru (Luo a Helmann, 2009; Seo *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014).

U *Bacillus subtilis* byl objeven významný regulační překryv mezi geny účastnicími se odpovědi na povrchový stres rozpoznávanými faktory sigma σ^M , σ^W a σ^X (Jordan *et al.*, 2008). U *Mycobacterium tuberculosis* byl objeven promotor genu kódujícího alternativní faktor σ^B rozpoznávaný třemi různými alternativními faktory σ^E , σ^H a σ^L (Dainese *et al.*, 2006). V *C. glutamicum* byla prokázána překrývající se specifita faktorů σ^E a σ^H u genů kódujících proteázu (*clpB*), chaperony (*dnaK* a *dnaJ2*) a regulátor teplotního stresu (*clgR*) (Šilar *et al.*, 2016). Mnoho genů *C. glutamicum* účastnicích se odpovědi na stresové podmínky je transkribováno nejen ze stresových promotorů, ale také z překryvných či poblíž ležících vegetativních promotorů rozpoznávaných σ^A a/nebo σ^B (Engels *et al.*, 2004; Ehira *et al.*, 2009; Busche *et al.*, 2012; Šilar *et al.*, 2016).

Můžeme tedy předpokládat, že promiskuitní promotory se u bakterií vyskytují častěji, než se očekávalo.

2.2.3. Faktory sigma

2.2.3.1. Role faktorů sigma při iniciaci transkripce

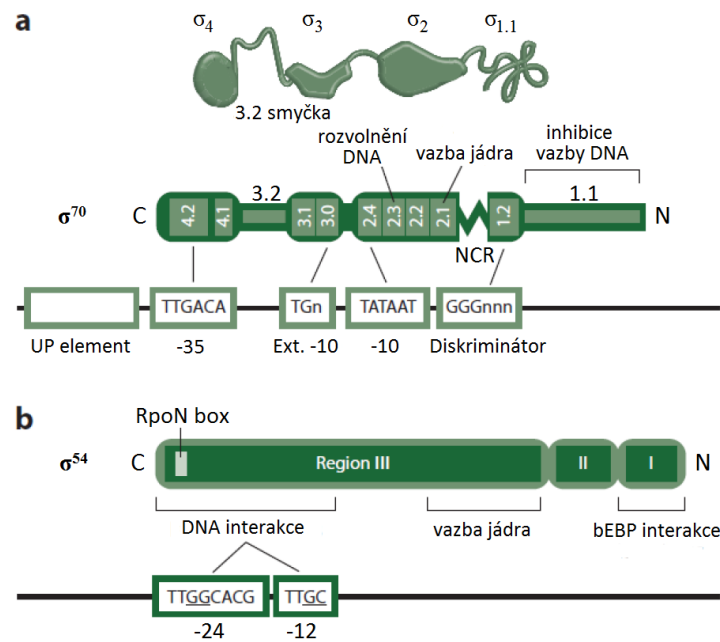
Iniciace transkripce z promotorů u bakterií vyžaduje oddělitelnou specifickou podjednotku RNA polymerázy, faktor sigma (σ). Funkcí faktoru sigma je rozeznat promotor a navést tak RNA polymerázu k místu, kde má být zahájena transkripce genu. Po vytvoření prvních osmi nebo devíti vazeb ribonukleotidů vznikajícího řetězce RNA se faktor sigma uvolňuje a nastává elongační fáze syntézy RNA.

Bakterie mají vždy primární faktor sigma, který je zodpovědný za transkripci většiny genů, které jsou aktivní hlavně během exponenciální fáze růstu. Tento primární faktor sigma je esenciální a geny jím regulované jsou označovány jako vegetativní (*housekeeping*).

Bakteriální genomy kromě toho také kódují různý počet neesenciálních alternativních faktorů sigma, které rozpoznávají promotory genů aktivních během stacionární fáze růstu, při odpovědi na různé stresové podmínky, při různých vývojových fázích buňky (např. při sporulaci) nebo mají různé speciální funkce (např. tvorba bičíku) (Pátek a Nešvera, 2011).

2.2.3.2. Rozdělení faktorů sigma

Bakteriální faktory sigma se rozdělují do dvou strukturně a funkčně rozdílných rodin σ^{70} a σ^{54} (Obr. 3) podle jejich homologie ke dvěma faktorům sigma *Escherichia coli* (Gruber a Gross, 2003). Faktory sigma rodiny σ^{70} byly nalezeny ve všech známých bakteriálních druzích, zatímco faktory sigma rodiny σ^{54} (vyžadující ATP a enhancer) jsou poměrně vzácné (Chaney *et al.*, 2001).



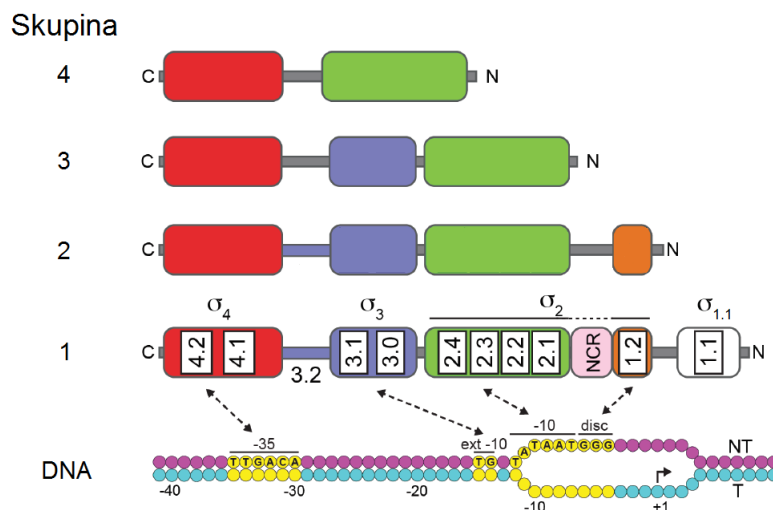
Obrázek 3. Domény faktorů sigma a jejich funkce.

a) Schéma domén faktorů sigma rodiny σ^{70} a jejich asociace s promotorovými oblastmi: UP elementem, -35 nt hexamerem, rozšířenou -10 nt oblastí (Ext. -10), -10 nt hexamerem a diskriminátorem. NCR = nekonzervovaná oblast.

b) Schéma domén faktorů sigma rodiny σ^{54} a jejich asociace s konvenčními sekvencemi promotorových oblastí -24 nt a -12 nt. Rozpoznávací motivy konvenčních sekvencí promotorových oblastí jsou podtrženy. bEBP = protein vázající bakteriální enhancer (Österberg *et al.*, 2011).

2.2.3.2.1. Rodina σ^{70}

Faktory sigma rodiny σ^{70} se rozdělují do čtyř skupin podle přítomnosti dvou až čtyř konzervovaných oblastí (Gruber a Gross, 2003). Každá konzervovaná oblast je tvořena odlišnou helikální doménou ($\sigma_{1.1}$, σ_2 , σ_3 nebo σ_4) stanovenou studii na izolovaných fragmentech (Obr. 4) (Campbell *et al.*, 2002).



Obrázek 4. Konzervované oblasti a domény rodiny σ^{70} faktorů sigma.

Doména 1.1 ($\sigma_{1.1}$) je označena bíle, doména 2 (σ_2) oranžově a zeleně, doména 3 (σ_3) modře a doména 4 (σ_4) červeně. Nekonzervovaná oblast (NCR) je označena růžově. Promotorové oblasti -35 a -10 jsou na DNA zvýrazněny žlutě, transkripční počátek je označen +1 a ohnutou šipkou. NT = netemplátová DNA; T = templátová DNA; ext-10 = rozšířená promotorová oblast -10; disc = diskriminátor (Cook a Ussery, 2013; Paget, 2015; upraveno).

2.2.3.2.1.1. Strukturní organizace rodiny σ^{70}

Doména $\sigma_{1.1}$ se nachází pouze ve skupině 1 a je zodpovědná za prevenci vazby na DNA před vytvořením holoenzymu RNAP (Schwartz *et al.*, 2008). Po vazbě faktoru sigma na jádro RNA polymerázy blokuje doména $\sigma_{1.1}$ aktivní místo RNA polymerázy, takže musí být eliminována během tvorby otevřeného transkripčního komplexu (Mekler *et al.*, 2002).

Nejkonzervovanější je doména σ_2 , která je součástí rozsáhlého propojení s RNA polymerázou (Murakami *et al.*, 2002). Během procesu rozvíjení DNA tvoří doména σ_2 specifické interakce s jednovláknovou netemplátovou DNA v promotorové oblasti -10, čímž přitahuje DNA a stabilizuje otevřený komplex (Feklistov a Darst, 2011). Ve skupině 1 a 2 interaguje oblast 1.2 domény σ_2 s diskriminátorem na netemplátovém řetězci DNA (optimální sekvence 5'-GGG-3'), která se nachází ihned po směru transkripce od promotorové oblasti -10 (Zhang *et al.*, 2012).

Doména σ_3 je kompaktní doména tvořená třemi helixy a účastní se rozpoznání rozšířené oblasti -10 (Barne *et al.*, 1997), kde stabilizuje otevřený transkripční komplex (Voskuil a Chambliss, 2002).

Jen o něco méně konzervovanou doménou oproti doméně σ_2 je doména σ_4 , která se váže s promotorovou oblastí -35 a tvoří druhé nejrozsáhlejší propojení s RNA polymerázou. Tato doména také představuje kontaktní místo pro transkripční aktivátory, které se vážou na řetězec DNA v protisměru transkripce od promotorové oblasti -35 (Campbell *et al.*, 2002).

Některé faktory sigma skupiny 1 navíc obsahují nekonzervovanou oblast (NCR) proměnlivé délky a složení, která se u *E. coli* účastní vazby jádra RNA polymerázy a uvolnění RNA polymerázy z promotoru (Leibman a Hochschild, 2007).

2.2.3.2.1.2. Struktura a funkce faktorů sigma rodiny σ^{70}

Skupina 1 rodiny σ^{70} zahrnuje faktory sigma rozpoznávající vegetativní geny, které představují většinu genů v genomu. Skupina 1 obsahuje všechny čtyři domény (Gruber a Gross, 2003), tj. včetně domény $\sigma_{1.1}$ specifické pro tuto skupinu (Schwartz *et al.*, 2008).

Skupina 2 faktorů sigma je svou strukturou blízce příbuzná skupině 1 faktorů sigma, ale neobsahuje doménu $\sigma_{1.1}$ a není pro buňku esenciální (Vuthoori *et al.*, 2001). Faktory sigma této skupiny se obvykle účastní adaptace na stres zahrnující nutriční limitaci a další stresy spojené se stacionární fází.

Faktory sigma skupiny 3 obsahují domény σ_2 , σ_3 a σ_4 a účastní se zcela specifických buněčných procesů (sporulace, syntéza bičíku) či odpovědi na tepelný stres (Gruber a Gross, 2003). Faktory sigma této skupiny vyžadují všechny tři rozpoznávací motivy promotorové oblasti (oblast -35, rozšířenou oblast -10 a oblast -10) stejně jako stabilní mezerník (Koo *et al.*, 2009). Na rozdíl od ostatních skupin se skupina 3 nenachází u *C. glutamicum*.

Skupina 4 je známa jako skupina alternativních faktorů sigma s extracytoplazmatickou funkcí (ECF). Jde o nejmenší faktory sigma, jelikož obsahují pouze domény σ_2 a σ_4 (Gruber a Gross, 2003). Tato skupina je nejpočetnější a také nejrozmanitější, co se týče primární sekvence, neboť obsahuje alespoň 43 hlavních fylogeneticky odlišných typů. Počet alternativních faktorů sigma kódovaných genomem se může velmi lišit, od nuly (např. chlamydie – intracelulární obligátní bakterie) až po více než 30 faktorů sigma (např. *Myxococcus xanthus*) (Staroń *et al.*, 2009). Tato skupina faktorů je aktivní během vyrovnávání se buňky se specifickými podmínkami, jako je odpověď na povrchový, tepelný či oxidativní stres (Gruber a Gross, 2003). Jejich koncentrace v buňce je striktně regulována, a to jak na úrovni transkripce či translace, tak i posttranslačně. Nejčastější je posttranslační regulace pomocí odpovídajících faktorů anti- σ , které brání vazbě faktorů sigma k RNA polymeráze (Campbell *et al.*, 2008).

2.2.3.2.2. Rodina σ^{54}

Tyto faktory sigma jsou reprezentovány faktorem $\sigma^{54/N}$ kmene *E. coli*, který řídí rozpoznání promotorových oblastí lokalizovaných na pozicích 24 nt a 12 nt proti směru transkripce (Barrios *et al.*, 1999). Ačkoliv byla jeho role objevena při asimilaci dusíku, faktor sigma σ^{54} se účastní i dalších fyziologických procesů, a to např. stavby bičíku (Arora *et al.*, 1997) nebo produkce extracelulárního alginátu (Zielinski *et al.*, 1992).

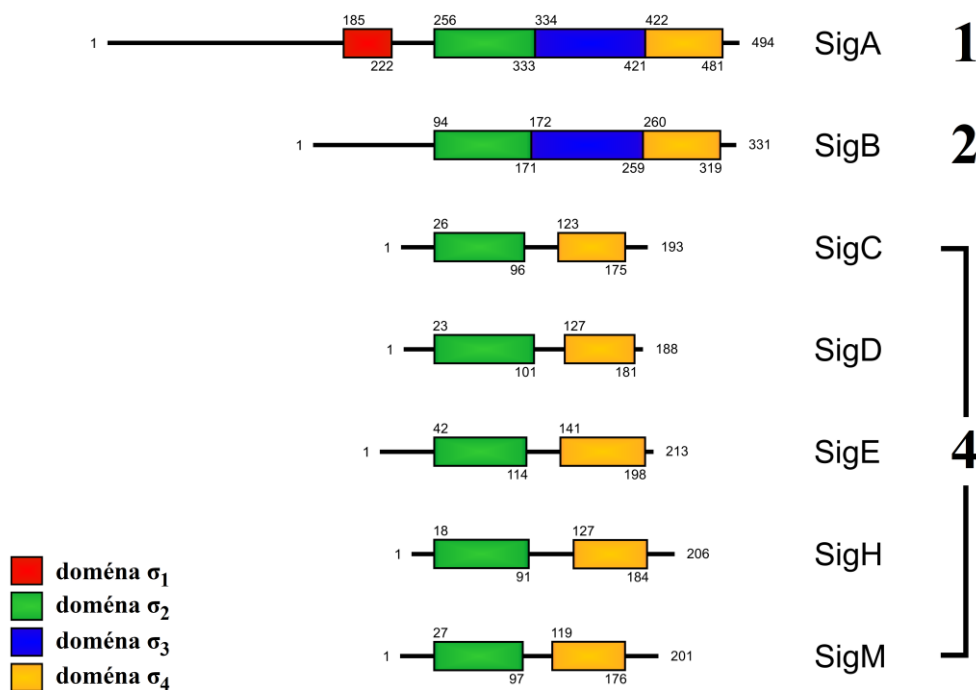
Faktory sigma rodiny σ^{54} mají stejnou funkci jako faktory sigma rodiny σ^{70} , ale neshodují se v primární sekvenci a regulují transkripci jiným mechanismem. Jejich hlavní odlišnou vlastností je neschopnost po vazbě na RNA polymerázu samovolně rozvolnit DNA, a tak vytvořit otevřený iniciační komplex. K tomu je třeba protein vázající bakteriální enhancer (bEBP), který využívá hydrolýzu ATP pro konformační změny, přičemž velice často se celého procesu účastní i DNA-vazebný protein IHF (*integration host factor*) (Wigneshweraraj *et al.*, 2008).

Tato rodina σ^{54} je charakteristická tím, že se skládají ze tří funkčních domén - N-terminální regulační domény (přijímá podněty a sestavuje aktivní hexamerní formu

aktivátoru), centrální AAA+ ATPázové domény (váže faktor sigma a hydrolyzuje ATP) a C-terminální domény (váže se na DNA a sekvenci enhanceru) (Rappas *et al.*, 2007).

2.2.3.3. Faktory sigma u *Corynebacterium glutamicum*

Jednotlivé typy genů kódujících faktory sigma u 19 druhů rodu *Corynebacterium* (Pátek a Nešvera, 2011) byly pojmenovány podle sekvenční podobnosti příslušných faktorů sigma s již charakterizovanými příbuznými faktory sigma u *M. tuberculosis*. V kmeni *C. glutamicum* bylo objeveno sedm faktorů sigma – primární faktor σ^A , neesenciální, primárnímu faktoru podobný σ^B a pět alternativních faktorů sigma s extracytoplasmatickou funkcí: σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M .



Obrázek 5. Schéma domén faktorů sigma *C. glutamicum*.

Strukturní organizace faktorů sigma skupiny 1, 2 a 4. Čísla nad a pod barevnými boxy označují aminokyselinové zbytky na začátku a na konci konzervované domény. Začátek proteinu je označen číslicí „1“ a poslední číslo vpravo označuje C-koncovou aminokyselinu.

Faktor σ^A

σ^A je esenciální primární faktor sigma ze skupiny 1 rodiny σ^{70} . Řídí transkripci většiny genů exprimovaných během exponenciální fáze růstu a jeho přítomnost klesá na začátku přechodné fáze mezi exponenciální a stacionární fází růstu (Larisch *et al.*, 2007). Geny rozpoznávané faktorem σ^A se označují jako vegetativní (*housekeeping*). Předpokládá se, že většina genů aktivních během exponenciální fáze růstu je řízena σ^A -dependentními promotory, nelze ale vyloučit přítomnost dalšího promotoru

rozpoznávaného jiným faktorem sigma či možnost rozpoznání promotorové oblasti dvěma a více faktory sigma (Pátek a Nešvera, 2011).

Před genem *sigA* byly metodou stanovení transkripčních počátků objeveny čtyři potenciální σ^A -dependentní promotory a jeden σ^H -dependentní promotor (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013; Toyoda *et al.*, 2015)

Z velkého množství domnělých σ^A -dependentních promotorů byla určena konvenční sekvence oblasti -35 (ttgncA) a oblasti -10 (TAnnnT) s nespécifickým mezerníkem 16-19 nt. Promotorová oblast -35 není příliš konzervovaná (Pátek a Nešvera, 2011; Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013), což může být způsobeno vysokým počtem promotorů s rozšířenou promotorovou oblastí -10 (TGnTATAAT) (Seeburg *et al.*, 1977; Keilty a Rosenberg, 1987; Wösten, 1998), která zvyšuje rozpoznávací specifitu faktoru sigma. Přítomnost TG motivu na pozici -13 a -12 proti směru transkripce od oblasti -10 totiž naznačuje možné zvýšení síly promotoru (Pátek a Nešvera, 2011).

Faktor σ^B

σ^B je neesenciální faktor sigma ze skupiny 2 rodiny σ^{70} . Jeho zastoupení v buňce *C. glutamicum* je nejvyšší v přechodné a časné stacionární fázi růstu (Larisch *et al.*, 2007).

Faktor σ^B se účastní odpovědi na různorodé stresy (např. stres způsobený nedostatkem kyslíku) (Ehira *et al.*, 2008), biosyntézy dTTP (Cho *et al.*, 2012), adaptace na kyselinu mléčnou (Jakob *et al.*, 2007) a stringentní odpovědi (Brockmann-Gretza a Kalinowski, 2006). Účastní se také regulace metabolismu glukózy, a to nejen za nedostatku kyslíku, ale i v exponenciální fázi růstu, a navíc může být dalším vegetativním faktorem sigma v exponenciální fázi růstu (Ehira *et al.*, 2008).

Součástí σ^B regulonu jsou dále geny účastníci se metabolismu a transportu aminokyselin, obranného stresového mechanismu či membránových a regulačních procesů (Larisch *et al.*, 2007).

Před genem *sigB* byl objeven σ^H -dependentní promotor (Ehira *et al.*, 2009; Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

Metodou stanovení transkripčních počátků bylo přesně zjištěno pouze 13 potenciálních σ^B -dependentních promotorů. Ačkoli je promotorová oblast -10 (TAaaaTtga) velmi podobná konvenční sekvenci předpokládaných σ^A -dependentních promotorů, byl nalezen možný rozdíl v sekvenci, který umožňuje σ^B působit specificky na určité promotory. Analýza 114 domnělých σ^B -dependentních promotorů totiž prokázala preferenci G v diskriminátoru na pozici -5 proti směru transkripce. Konzervovaný G na

pozici -5 tedy může mít důležitou funkci v předpokládaném diskriminátoru, nicméně tento vztah může být komplexní a pravděpodobně nezávislý na σ^B (Albersmeier *et al.*, 2017). Na rozdíl od oblasti -10, pro promotorovou oblast -35 nebylo možno definovat konzervovaný motiv (Pátek a Nešvera, 2011), což poukazuje na její menší důležitost. Inaktivací σ^B se jen částečně snížil přepis identifikovaných σ^B -dependentních promotorů (Ehira *et al.*, 2008), ale geny, jejichž exprese se zvýšila během přechodné fáze růstu v divokém kmeni *C. glutamicum*, vykazaly velmi podobný transkripční profil jako vegetativní geny v kmeni *C. glutamicum* $\Delta sigB$ (Larisch *et al.*, 2007). Lze předpokládat u těchto genů přítomnost dalšího σ^A -dependentního promotoru nebo překrývající se specifitu σ^A a σ^B (Pátek a Nešvera, 2011).

Faktor σ^C

Faktor σ^C se řadí do podskupiny faktorů sigma ECF36 ze skupiny 4 rodiny σ^{70} , které se nacházejí pouze u kmene Actinobacteria (Staroń *et al.*, 2009).

σ^C je klíčový regulátor exprese genů kódujících proteiny účastníci se aerobní respirace. Pozitivně reguluje geny cytochromů *bd* a *aa3* a naopak negativně reguluje gen cytochromu *bc1*.

σ^C regulon zahrnuje geny operonu *cydABDC*, *ctaA*, *ctaB* a operonu *ctaE-qcrCA1B* a je indukován během odpovědi na limitaci kyslíkem (Toyoda a Inui, 2016a). Zároveň bylo prokázáno, že geny σ^C regulonu jsou též indukovány během nitrátové respirace (Nishimura *et al.*, 2011).

Promotor genu *sigC* je rozpoznáván vegetativním faktorem σ^A a nebyla nalezena přítomnost faktoru anti- σ (Toyoda a Inui, 2016a). Nabízí se tedy možnost regulace aktivity promotoru vzájemnou interakcí promotorových oblastí -10 a -35, jak bylo popsáno u genu *sigC* kmene *M. tuberculosis*, který je nejpodobnější genu *sigC* kmene *C. glutamicum* (Thakur *et al.*, 2007).

σ^C -dependentní promotory mají jinými faktory sigma nerozeznatelnou konvenční sekvenci oblasti -35 (GGAACT) a oblasti -10 (CGACA/T) s mezerníkem o délce 16 nukleotidů (Toyoda a Inui, 2016a), takže jsou zcela unikátní.

Faktor σ^D

Faktor σ^D se řadí do podskupiny faktorů sigma ECF40 ze skupiny 4 rodiny σ^{70} , které se rovněž nacházejí pouze u aktinobakterií (Staroń *et al.*, 2009).

σ^D je zodpovědný za stresovou odpověď na limitaci kyslíkem (Ikeda *et al.*, 2009) a zároveň hraje roli v regulaci udržení integrity buněčné stěny (Taniguchi *et al.*, 2017b), přičemž v kmeni s deletovaným faktorem anti- σ^D byla prokázána toxicita faktoru σ^D za jeho nadexprese (Toyoda a Inui, 2018).

σ^D regulon obsahuje geny ve vztahu k syntéze korynemykolových kyselin (*fadD2*, *pks*), geny kódující korynemykolyltransferázy (*cop1*, *cmt1*, *cmt2*, *cmt3*), L,D-transpeptidázu zodpovídající za rezistenci vůči lysozymu (*lppS*), podjednotku hlavního kanálu buněčné stěny (*porH*) a regulační faktor povrchových lipidů (*elrF*) (Taniguchi *et al.*, 2017b).

Promotor genu faktoru σ^D je rozpoznáván vegetativním faktorem σ^A a není tak autoregulován. Po směru transkripce od genu *sigD* se nachází gen pro jeho faktor anti- σ , *rsdA*, který je přepisován ze σ^D -dependentního promotoru.

U σ^D -dependentních promotorů byla prokázána konvenční sekvence oblasti -35 (GTAAC) a oblasti -10 (CGAT) s mezeríkem 16-17 nukleotidů (Toyoda a Inui, 2018).

Faktor σ^E

Faktor σ^E se řadí do podskupiny faktorů sigma ECF14 ze skupiny 4 rodiny σ^{70} . Faktory sigma z této podskupiny se opět nacházejí pouze u kmene Actinobacteria a jsou charakteristické přítomností genu kódujícího *O*-metyltransferázu lokalizovaného přímo před genem faktoru sigma (Staroň *et al.*, 2009).

σ^E se účastní odpovědi na tepelný a povrchový stres (Park *et al.*, 2008) a odpovědi na stres vyvolaný kyselinou ferulovou (Chen *et al.*, 2017). V delečním kmeni $\Delta sigE$ *C. glutamicum* se zvýšila citlivost na nedostatek hořčíku a na působení SDS, lysozymu, EDTA a teploty. Zároveň tento kmen vykazoval extrémní citlivost na působení různých antibiotik, a to kyseliny nalidixové, penicilinu a vankomycinu (Park *et al.*, 2008). Regulon σ^E však nebyl dosud detailněji popsán.

Gen *sigE* a gen jeho faktoru anti- σ , *cseE*, jsou přepisovány jako operon a jejich transkripce je stimulována teplotou. Interakce proteinů SigE a CseE byla prokázána metodou *in vitro* (Park *et al.*, 2008).

Konvenční sekvence σ^E -dependentních promotorů nebyla dosud popsána. Nedávno však bylo prokázáno, že promotory genů *P1clgR*, *P2dnaK* a *P2dnaJ2* jsou rozpoznávány jak faktorem σ^E , tak i σ^H (Šilar *et al.*, 2016), což naznačuje překrývání promotorové specifity faktorů σ^E a σ^H .

Faktor σ^H

Faktor σ^H se řadí do podskupiny faktorů sigma ECF12 ze skupiny 4 rodiny σ^{70} . Většina faktorů sigma této podskupiny je asociována se svým faktorem anti- σ (Staroň *et al.*, 2009), který obsahuje N-terminální ZAS doménu (zinek vážící anti-sigma doménu) reagující na oxidativní stres tvorbou vratné disulfidové vazby za uvolnění zinkového ligandu. Podle fyziologických podmínek pevně váže nebo naopak uvolňuje faktor sigma (Hillion a Antelmann, 2015).

Faktor σ^H se účastní odpovědi na tepelný, oxidativní, chemický a růstovou fází indukovaný stres (Ehira *et al.*, 2009; Busche *et al.*, 2012; Toyoda *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Toyoda a Inui, 2016b).

σ^H regulon obsahuje nejméně 83 genů, z nichž většina se účastní thiolové oxidačně redukční rovnováhy (Busche *et al.*, 2012). Součástí regulonu jsou geny kódující Trx/TrxR systém (*trxB*, *trxB1*, *trxC*), metabolismus mykothiolu (*mshC*, *mca*, *mtr*), *dsbA* obdobné thioldisulfidoxidoreduktázy (*cg2838*, *cg2661*), methioninsulfoxidreduktázy (*msrA*, *msrB*), geny funkčně spojené s fágy (*cg0378*), tRNA-(5-methylaminometyl-2-thiouridylát)-metyltransferázu (*cg1397*), geny kódující proteazomální konjugační dráhu podobnou ubiquitinu (*pup*) a enzymy opravující poškozenou DNA (*uvrA*, *uvrD3*) (Ehira *et al.*, 2009; Busche *et al.*, 2012). Faktor σ^H řídí expresi nejen svého vlastního *sigH-rshA* operonu a genů regulátorů dalších stresových odpovědí, jako jsou HspR (Barreiro *et al.*, 2009), ClgR (Engels *et al.*, 2004), SufR (Ehira *et al.*, 2009), WhcA (Choi *et al.*, 2009) a WhcE (Kim *et al.*, 2005), ale i transkripci genů kódujících faktory σ^A , σ^B a σ^M (Halgašová *et al.*, 2001; Nakunst *et al.*, 2007; Ehira *et al.*, 2008; Toyoda *et al.*, 2015). Zároveň byly identifikovány σ^H -dependentní promotory neležící v operonech, které se účastní pentózofosfátové dráhy, biosyntézy riboflavinu a absorpce zinku (Toyoda *et al.*, 2015), takže je σ^H u *C. glutamicum* považován za jeden z globálních regulátorů (Schröder a Tauch, 2010).

Přestože se gen *sigH* a gen jeho faktoru anti- σ , *rshA*, nacházejí v operonu řízeném 4 vegetativními promotory rozpoznávanými faktorem σ^A , gen *sigH* není autoregulován (Taniguchi a Wendisch, 2015), avšak před vlastním genem *rshA* byl prokázán σ^H -dependentní promotor (Busche *et al.*, 2012).

Pro σ^H -dependentní promotory byla určena konvenční sekvence oblasti -35 (g/tGGAAt) a oblasti -10 (t/cGTTgaa) s mezeríkem 16-19 nukleotidů (Ehira *et al.*, 2009; Busche *et al.*, 2012).

Faktor σ^M

Faktor σ^M se řadí do podskupiny faktorů sigma ECF27 ze skupiny 4 rodiny σ^{70} a účastní se u *C. glutamicum* odpovědi na tepelný, chladový a oxidativní stres vyvolaný převážně diamidem.

Přestože bylo u *C. glutamicum* popsáno 23 genů σ^M regulonu kódujících komponenty *suf* systému, geny kódující thioredoxin reduktázu, thioredoxiny, chaperony a proteiny účastníci se odpovědi na tepelný stres (Nakunst *et al.*, 2007), později byla většina z těchto genů, a to *suf* operon, *groES*, *groEL*, *grpE*, *hspR* (Ehira *et al.*, 2009) a *sufR*, *trxB*, *trxB1*, *trxC*, *cwlM*, *clpB* a *dnaJ* (Ehira *et al.*, 2009; Busche *et al.*, 2012), charakterizována jako σ^H -dependentní. Před genem *sigM* byl nalezen předpokládaný σ^H -dependentní promotor (Nakunst *et al.*, 2007; Ehira *et al.*, 2008).

Pro σ^M -dependentní promotory byla charakterizována konvenční sekvence oblasti -35 (gGGAAT) a oblasti -10 (C/TGTTGA/G) (Nakunst *et al.*, 2007). Jelikož však byly σ^M -dependentní promotory identifikovány také jako σ^H -dependentní, lze předpokládat, že existuje překryv rozpoznávací specifity faktorů σ^M a σ^H .

2.2.4. Faktory anti- σ

Faktory anti- σ regulující aktivitu alternativních faktorů sigma jsou často integrální membránové proteiny vnitřní membrány tvořené N-terminální cytoplazmatickou doménou (vazba faktoru sigma) a periplazmatickou doménou, která reaguje na podmínky v periplazmě. Jejich geny jsou často přepisovány spolu s geny faktorů sigma (Hermann, 2002). Na rozdíl od faktorů sigma jsou faktory anti- σ sekvenčně a strukturně rozmanité. Obecně platí, že faktory anti- σ stabilizují faktor sigma ve formě, která znemožňuje vazbu faktoru sigma s RNA polymerázou tak, že oboustrannou vazbou s doménami σ_2 a σ_4 zablokují klíčová vazebná místa (Campbell *et al.*, 2008).

Podrobné studie dvou faktorů anti- σ , RseA z kmene *E. coli* a ChR z kmene *Rhodobacter sphaeroides* spolu se sekvenčním profilováním a klastrovou analýzou většího množství domnělých faktorů anti- σ vedly k identifikaci základního strukturního motivu, N-terminální domény faktoru anti- σ , nazvaného ASD (anti-sigma doména). Zároveň bylo zjištěno, že přibližně 30 % těchto faktorů anti- σ obsahuje doménu, která váže zinek (ZAS) (Zdanowski *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2007).

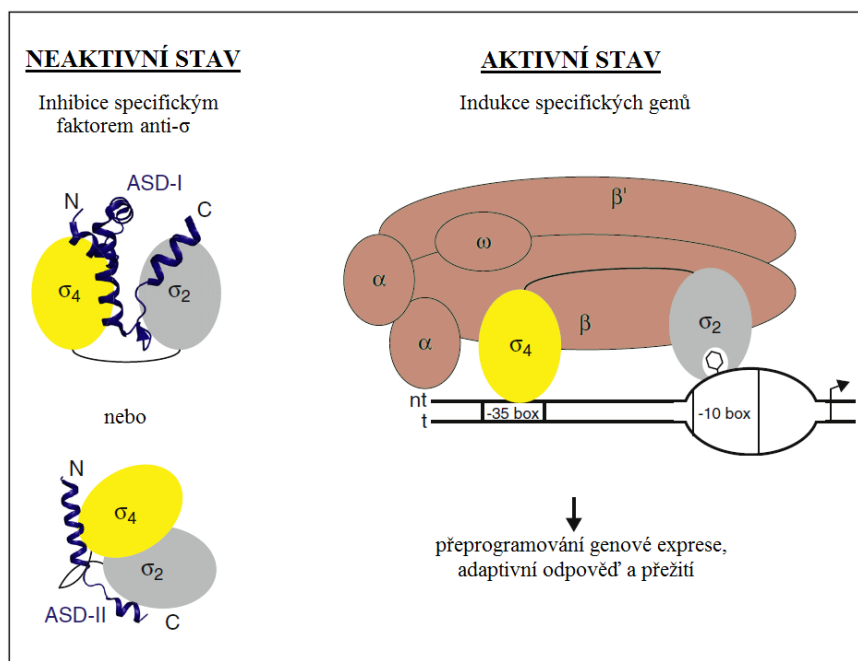
Reaktivace faktorů sigma probíhá různými mechanismy uvolnění od vazby sigma- (anti- σ) během odpovědi na specifický podnět, který často zprostředkovává přenašeč extracelulárního signálu do cytoplazmy (Österberg *et al.*, 2011).

2.2.4.1. Klasifikace faktorů anti- σ

Podle způsobu interakce s faktory sigma byly popsány dvě hlavní skupiny faktorů anti- σ : 1) faktory anti- σ , které se včleňují mezi domény σ_2 a σ_4 (ASD I) a 2) faktory anti- σ , které obalují domény σ_2 a σ_4 (ASD II) (Campbell *et al.*, 2007).

Příklad první skupiny byl poprvé pozorován u *E. coli*, kde tvoří strukturální komplex kmene faktoru σ^E a příslušného faktoru anti- σ (RseA). V tomto komplexu RseA zaujme ohnutý tvar tvořený čtyřmi α helixy a vmezeří se mezi domény σ_2 a σ_4 (Campbell *et al.*, 2003) (Obr. 6). Tyto faktory anti- σ jsou buď modifikovány proteolýzou, nebo konformačně pozměněny, aby se mohly uvolnit od faktoru sigma (Mascher, 2013).

Na strukturální úrovni byly podrobně charakterizovány dva příklady faktorů anti- σ druhého typu, které se obalují okolo domén σ_2 a σ_4 (ASD II) (Obr. 6). Prvním je komplex faktoru sigma CnrH a faktoru anti- σ CnrY z druhu *Cupriavidus metallidurans* (Maillard *et al.*, 2014) a druhým je komplex tvořený faktorem sigma EcfG, homologem faktoru sigma PhyR a faktorem anti- σ NepR u bakterie z třídy Alphaproteobacteria (Campagne *et al.*, 2012). Struktura faktoru sigma CnrH v komplexu s cytoplazmatickou doménou jeho faktoru anti- σ CnrY odhalila, že domény σ_2 a σ_4 jsou úzce obepínány dvěma helixy faktoru anti- σ tak, že se doména σ_4 dotýká domény σ_2 v místě její interakce s promotorovou oblastí -10. Výsledkem je tedy zablokování vazebných míst faktoru CnrH pro RNA polymerázu (Maillard *et al.*, 2014). Regulace komplexu faktoru sigma PhyR a faktoru anti- σ NepR je označována jako regulace prostřednictvím napodobování faktoru sigma. Zahrnuje mechanismus výměny partnerů, ve kterém PhyR napodobuje faktor sigma EcfG a tím vyváže faktor anti- σ NepR z jeho inhibiční interakce s faktorem sigma. Pravděpodobně existují i další regulační strategie, ve kterých mohou být ASD II např. modifikovány specifickými proteiny, jakou jsou kinázy a proteázy (Campagne *et al.*, 2012), ale ty jsou zatím jen ve stadiu hypotéz.



Obrázek 6. Interakce faktorů sigma a anti- σ .

Nalevo je znázorněn neaktivní stav, tj. inhibice faktoru sigma specifickým faktorem anti- σ . Domény σ_2 a σ_4 faktoru sigma jsou znázorněny šedě a žlutě, zatímco faktor anti- σ modře. Domény faktoru anti- σ jsou znázorněny v postavení vůči faktoru sigma podle toho, do jaké skupiny patří (ASD I nebo ASD II). Napravo je znázorněn aktivní stav, kdy je faktor sigma navázán na RNA polymerázu. Jádru RNA polymerázy je znázorněno hnědě. Promotorové oblasti -35 a -10 jsou označeny jako -35 box a -10 box, šipka znázorňuje transkripční start. V transkripčním okně je znázorněna vyčnívající báze -10 boxu reagující s doménou σ_2 RNA polymerázy na netemplátové DNA (nt). Templátová DNA je značena písmenem t. ASD = *anti-sigma domain* (Campagne *et al.*, 2015).

2.2.4.2. Mechanismy rozvolnění komplexu σ /anti- σ

Přesný mechanismus pro uvolnění do cytoplazmy orientovaného faktoru sigma během odpovědi na signál je znám jen v několika málo případech. Přesto mohou být rozděleny do tří obecnějších skupin - výměna partnerů, přímá detekce a regulovaná proteolýza (Campagne *et al.*, 2012).

Regulovaná proteolýza je mechanismus pro přenos signálu přes membrány, který byl nalezen ve všech říších (Brown *et al.*, 2000) a je i často používaným kontrolním mechanismem u alternativních faktorů sigma spouštěných během odpovědi na extracytoplazmatické podněty. Obvykle zahrnuje postupné štěpení části faktoru anti- σ přesahující přes membránu vnější proteázou, následuje štěpení proteázou na úrovni membrány a výsledkem je uvolnění cytoplazmatické domény. Příkladem je komplex σ^E /RseA z kmene *E. coli* rozvolněný proteázou DegS na straně jedné a proteázou RseP (YaeL) na straně druhé (Alba *et al.*, 2002).

Během přímé detekce je signál zachycen přímo faktorem anti- σ a přetransformován do konformačních změn, které uvolní faktor sigma. Prvním popsáním příkladem tohoto typu byl komplex σ^R /RsrA u *S. coelicolor* (Li *et al.*, 2003).

Mechanismus výměny partnerů je rozšířen zvláště u grampozitivních bakterií a je podrobně studován u *B. subtilis*. Tento mechanismus obsahuje čtyři základní komponenty (modelovým příkladem je faktor σ^B): faktor sigma (σ^B), faktor anti- σ (protein kináza RsbW), faktor anti-anti- σ (RsbV) a vstupní fosfatázový komplex (RsbTU nebo RsbQP). K aktivaci uvolněním či deaktivaci navázáním faktoru σ^B a jeho anti- σ (RsbW) je potřeba defosforylovat (+) či fosforylovat (-) RsbV komplexem RsbTU nebo RsbQP (Hecker *et al.*, 2007).

2.2.4.3. Faktory anti- σ u *Corynebacterium glutamicum*

Podle homologie s faktory anti- σ z kmene *M. tuberculosis* byly v genomu *C. glutamicum* identifikovány dva geny kódující předpokládané faktory anti- σ ležící po směru transkripce od genů *sigE* a *sigH* (Pátek, 2005). Nedávno byl objeven další faktor anti- σ ležící po směru transkripce za genem *sigD* (Toyoda a Inui, 2018). Faktor anti- σ^E je označován CseE, faktor anti- σ^H RshA a anti- σ^D RsdA.

Faktor anti- σ^E (CseE)

Gen *cseE* (*cg1272*) kódující faktor anti- σ CseE (164 aa) se nachází 188 nt po směru transkripce od genu *sigE*.

CseE pravděpodobně reguluje aktivitu faktoru σ^E vratnou protein-protein interakcí, přičemž jeho čtyři konzervované cysteinové zbytky mohou hrát důležitou roli v řízení aktivity σ^E (Park *et al.*, 2008). Faktor anti- σ CseE patří do skupiny anti- σ ZAS (zinek vážící anti-sigma doména) (Staroń *et al.*, 2009).

Faktor anti- σ (RshA)

Gen *rshA* (*cg0877*) kódující faktor anti- σ RshA (89 aa) se nachází v operonu s genem *sigH*. RshA obsahuje konzervované cysteinové zbytky, které regulují interakci s faktorem σ^H . Za nestresových podmínek je faktor σ^H inhibován redukovanou formou RshA, avšak oxidací těchto cysteinových zbytků se komplex σ^H /RshA rozvolní. Jelikož transkripce genu *rshA* probíhá ze σ^H -dependentního promotoru a součástí σ^H regulační sítě jsou dráhy redukčních sloučenin thioredoxinu a mykothiolu, dochází k rychlému vypnutí stresové odpovědi po ukončení stresových podmínek. Jakmile se obnoví thiolová

oxidačně redukční rovnováha v buňce, opětovně se redukují cysteinové zbytky RshA a tím se obnoví jeho funkčnost. Podle navrženého modelu σ^H regulonu, RshA přímo reguluje stresovou odpověď na disulfidový a teplotní stres (Busche *et al.*, 2012).

Také faktor anti- σ RshA patří do skupiny anti- σ nazývaných ZAS (Staroń *et al.*, 2009).

Faktor anti- σ RsdA

Gen *rsdA* (*cg0697*) kódující faktor anti- σ RsdA (342 aa) se nachází v operonu s genem *sigD*, přičemž transkripce genu *rsdA* probíhá i ze σ^D -dependentního promotoru ležícího uvnitř genu *sigD*. Předpokládá se, že RsdA odpovídá na poškození buněčné membrány nebo buněčné stěny způsobené environmentálním stresem (např. SDS, lysozym nebo ampicilin) (Toyoda a Inui, 2018).

Faktor anti- σ RsdA je jediným zástupcem faktorů anti- σ kmene *C. glutamicum*, u kterého byl předpovězen transmembránový region (Toyoda a Inui, 2018).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Kultivační půdy

Půda 2xYT (1 000 ml)

Bylo odváženo 16 gramů tryptonu (Oxoid), 10 gramů yeast extraktu (Serva) a 5 gramů NaCl (Lachema) a doplněno destilovanou vodou do jednoho litru, sterilizováno autoklávováním. Kultivační půda měla pH 6,8; tato hodnota nebyla upravována. Pro přípravu pevné půdy bylo na jeden litr půdy přidáno 15 gramů agaru (Liofilchem).

Pro selekci na antibiotikum kanamycin (Serva) bylo po sterilizaci přidáno 300 μ l zásobního roztoku (100 μ g/ml). Finální koncentrace tedy byla 30 μ g/ml.

Pro selekci na tetracyklin (Serva) se přidalo po sterilizaci 2 ml zásobního roztoku tetracyklinu (5 mg/ml) pro výslednou koncentraci 10 μ g/ml.

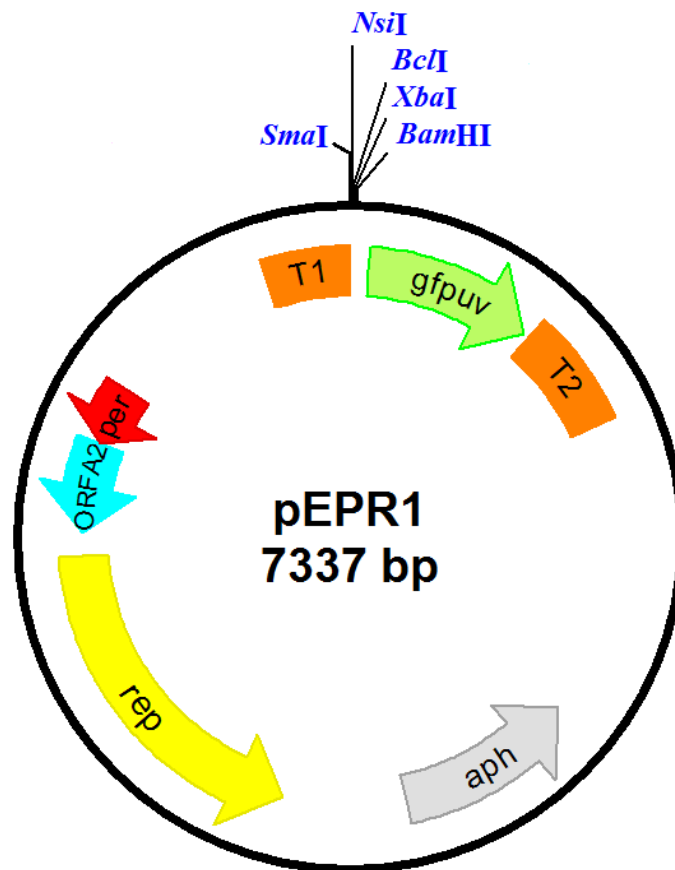
3.1.2. Bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	– kmen umožňující α -komplementaci β -galaktosidázy (Hanahan, 1985)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	– expresní kmen (Studier & Moffatt, 1986)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	– typový kmen (<i>C. glutamicum</i> WT)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> rpoC-H8	– kmen s 8 histidinovou kotvou na C-konci proteinu RpoC (Holátka <i>et al.</i> , 2012)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> Δ sigH	– kmen s chromozomální delecí v genu sigH (Radoslav Šilar, 2007)

3.1.3. Plazmidy

3.1.3.1. Použité plazmidové vektory

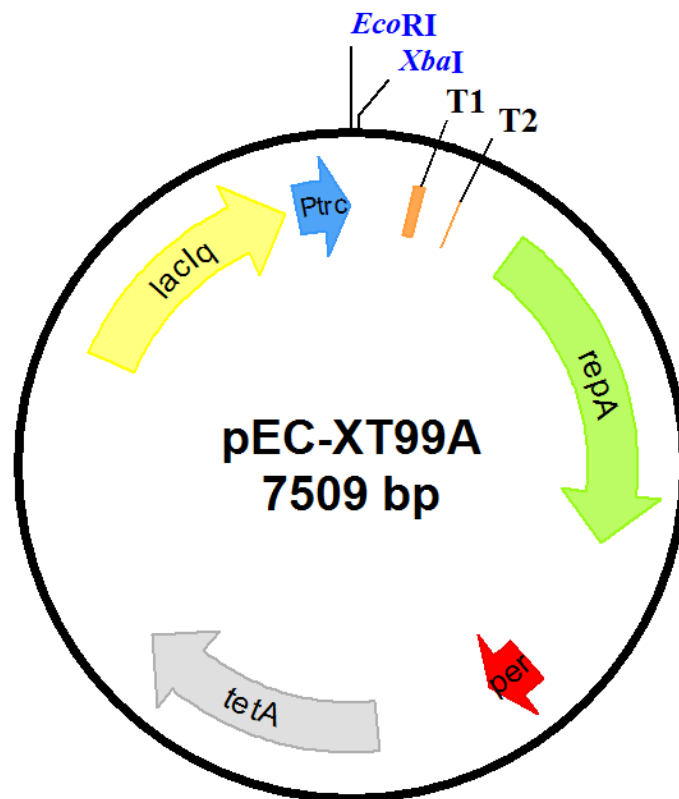
- pEPR1 - Km^R (kanamycin), podvojný (*E. coli* a *C. glutamicum*) promoter-probe vektor, bezpromotorový *gfpuv* jako reportérový gen (Knoppová *et al.*, 2007)
- pEC-XT99A - Tc^R (tetracyklin), podvojný (*E. coli* a *C. glutamicum*) expresní vektor, IPTG-inducibilní *trc* promotor (Kirchner a Tauch, 2003)
- pET-22b(+)- Ap^R (ampicilin), expresní vektor *E. coli* pro izolaci proteinů, T7 promotor, His-Tag kódující sekvence (Novagen)
- pKSAC45 - Km^R, sebevražedný vektor replikující se v *E. coli*, nereplikující se v *C. glutamicum*, *sacB* gen (Holátka *et al.*, 2009)
- pRLG770 - Ap^R, vektor *E. coli* pro in vitro transkripci, *rrnB* terminátor (Ross *et al.*, 1990)



Obrázek 7. Mapa promoter-probe vektoru pEPR1.

Podvojný replikativní vektor pEPR1 (Knoppová *et al.*, 2007) pro měření síly promotorů v *E. coli* a *C. glutamicum*. Vektor pEPR1 má pět unikátních klonovacích míst (*Sma*I, *Nsi*I, *Bcl*I, *Xba*I a *Bam*HI).

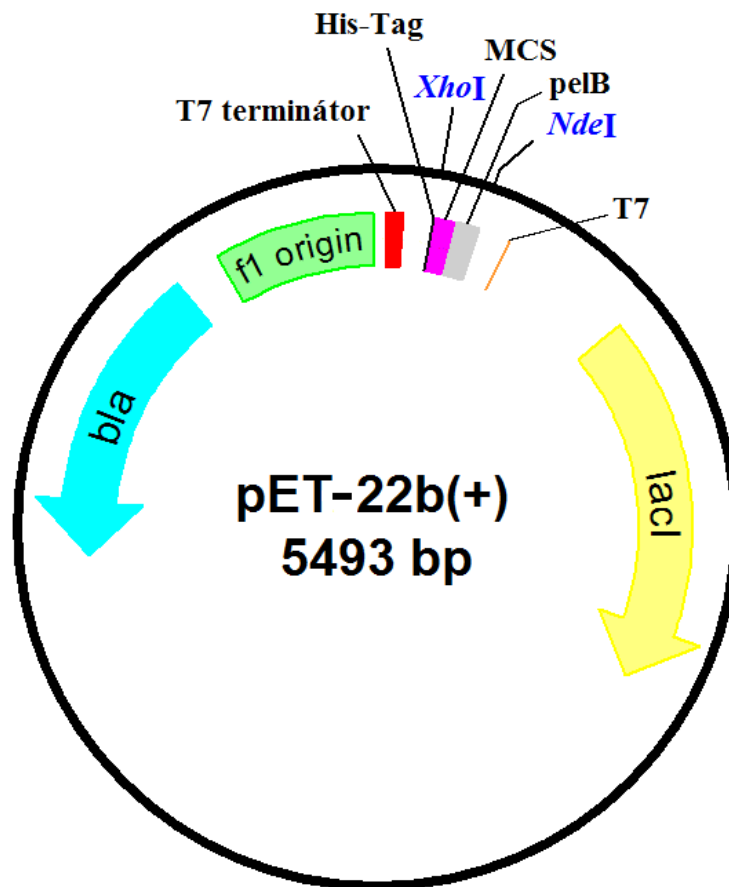
- *aph* = gen kódující enzym aminoglykosidfosfotransferázu, která determinuje rezistenci ke kanamycinu (Km^R)
- *gfpuv* = bezpromotorový (reporterový) gen kódující zelený fluorescenční protein
- *rep* = gen kódující replikázu
- *per* = gen kódující pozitivní efektor replikace
- T1(*TleuB*+*TrrnB*) a T2(*TrpA*+*TrpL*) = transkripční terminátory



Obrázek 8. Mapa expresního vektoru pEC-XT99A.

Podvojný replikativní expresní vektor pEC-XT99A (Kirchner a Tauch, 2003) pro nadexpresi klonovaného genu v *E. coli* a *C. glutamicum*.

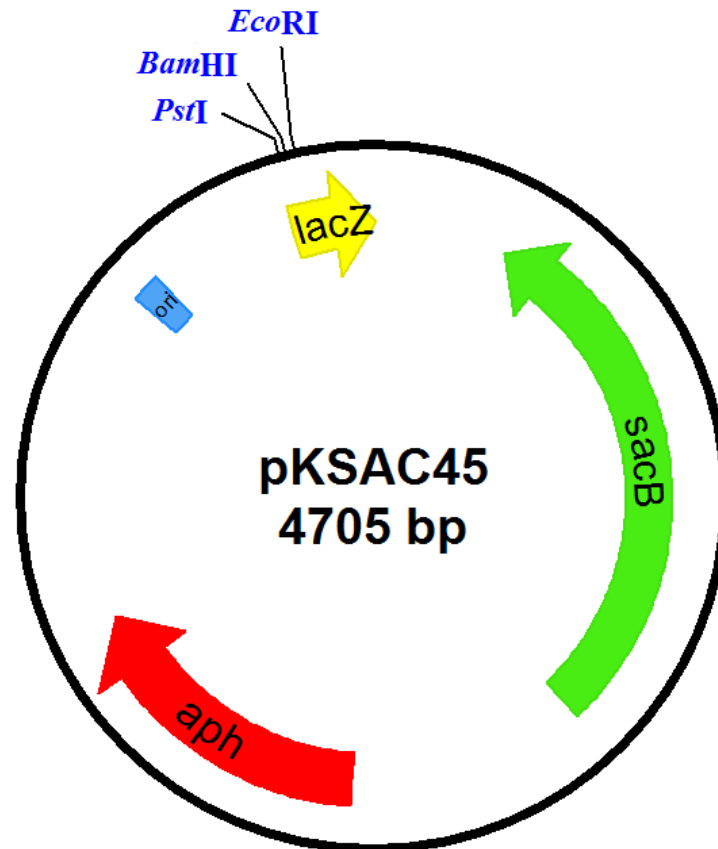
- *tetA* = gen kódující protein TetA účastnící se tetracyklinové rezistence (Tc^R)
- *lacIq* = gen kódující Lac represor
- *repA* = gen kódující replikační protein RepA
- *per* = gen kódující pozitivní efektor replikace
- *Ptrc* = IPTG inducibilní promotor
- T1, T2 = transkripční terminátory



Obrázek 9. Mapa expresního vektoru pET-22b(+).

Expresní vektor *E. coli* pET-22b(+) (Novagen) pro klonování genů a následnou nadprodukční izolaci proteinů. (+) za názvem vektoru značí přítomnost f1 originu.

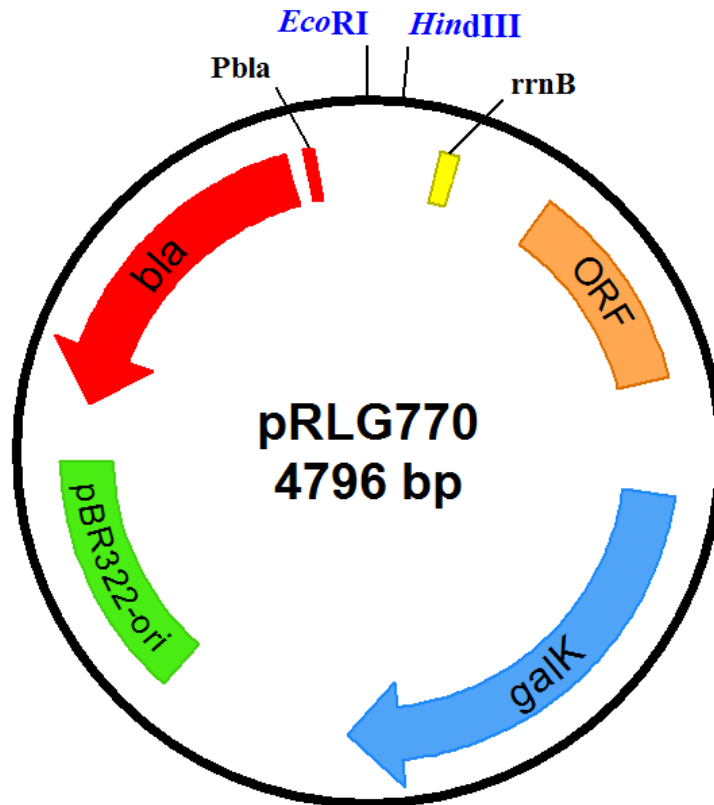
- *bla* = gen kódující penicilin β-laktamázu (Ap^R)
- f1 origin = f1 origin replikace, který umožňuje produkci jednovláknové plazmidové DNA pro mutagenezi a sekvenační aplikace
- T7 terminátor = T7 transkripční terminátor
- His-Tag = C-terminální His-Tag sekvence
- MCS = mnohonásobné klonovací místo
- *pelB* = N-terminální signální sekvence pro potenciální periplazmatickou lokalizaci
- T7 = IPTG inducibilní promotor T7
- *lacI* = gen kódující Lac represor



Obrázek 10. Mapa sebevražedného vektoru pKSAC45.

Replikativní vektor pKSAC45 (Holátko *et al.*, 2009) replikující se v *E. coli* a integrativní v *C. glutamicum* pro zavádění chromozomálních mutací v *C. glutamicum*.

- *aph* = gen kódující enzym aminoglykozidfosfotransferázu, která determinuje rezistenci ke kanamycinu (Km^R)
- *ori* = replikační počátek
- *lacZ* = gen kódující β-galaktosidázu
- *sacB* = gen kódující levansukrázu



Obrázek 11. Mapa transkripčního vektoru pRLG770 pro testování *in vitro* transkripce.

Vektor *E. coli* pro *in vitro* transkripční systém nesoucí studovanou promotorovou oblast, ze které začíná transkripce a končí *rrnB* terminátorem za vzniku ~150 nt produktu (Ross *et al.*, 1990).

- *bla* = gen kódující β -laktamázu (Ap^{R})
- *ori* = replikační počátek
- *Pbla* = promotor genu *bla*
- *rrnB* = terminátor
- ORF = otevřený čtecí rámec
- *galk* = gen kódující galaktokinázu

3.1.3.2. Zkonstruované plazmidy

Tabulka 3. Seznam plazmidů zkonstruovaných v této práci.

Konstrukt	Charakteristika
pEC-XT99A/ <i>gfp</i>	Gen <i>gfpuv</i> , nadprodukce Gfpuv
pEC-XT99A/ <i>sigA</i>	Gen <i>sigA</i> , nadprodukce SigA
pEC-XT99A/ <i>sigB</i>	Gen <i>sigB</i> , nadprodukce SigB
pEC-XT99A/ <i>sigC</i>	Gen <i>sigC</i> , nadprodukce SigC
pEC-XT99A/ <i>sigD</i>	Gen <i>sigD</i> , nadprodukce SigD
pEC-XT99A/ <i>sigE</i>	Gen <i>sigE</i> , nadprodukce SigE
pEC-XT99A/ <i>sigH</i>	Gen <i>sigH</i> , nadprodukce SigH
pEC-XT99A/ <i>sigM</i>	Gen <i>sigM</i> , nadprodukce SigM
pEC-XT99A/ <i>sigM</i> ΔP _{trc}	Gen <i>sigM</i> bez indukibilního promotoru P _{trc}
pEC-XT99A/ <i>sigH</i> mut	Gen <i>sigH</i> s mutací Met→Arg
pEC-XT99A/ <i>sigE</i> mut	Gen <i>sigE</i> s mutací Arg→Met
pEC-XT99A/SIGHmutK-A	Gen <i>sigH</i> s mutací Lys→Ala
pEC-XT99A/SIGHmutTMSR-ARVA	Gen <i>sigH</i> s mutací ThrMetSerArg→AlaArgValAla
pEPR1/ <i>Pfba</i>	Promotor genu <i>fba</i> (70 nt)
pRLG770/ <i>Pfba</i>	Promotor genu <i>fba</i> (65 nt)
pEPR1/ <i>Pcmt1</i>	Promotor genu <i>cmt1</i> (65 nt)
pRLG770/ <i>Pcmt1</i>	Promotor genu <i>cmt1</i> (62 nt)
pEPR1/ <i>Pcg2556</i>	Promotor genu <i>cg2556</i> (217 nt)
pRLG770/ <i>Pcg2556</i>	Promotor genu <i>cg2556</i> (75 nt)
pEPR1/ <i>PrshA</i>	Promotor genu <i>rshA</i> (278 nt)
pRLG770/ <i>PrshA</i>	Promotor genu <i>rshA</i> (60 nt)
pEPR1/ <i>PsigB</i>	Promotor genu <i>sigB</i> (378 nt)
pEPR1/P2 <i>sigA</i>	Vegetativní promotor P2 genu <i>sigA</i> (265 nt)
pRLG770/P2 <i>sigA</i>	Vegetativní promotor P2 genu <i>sigA</i> (123 nt)
pEPR1/ <i>PtrxB1</i>	Promotor genu <i>trxB1</i> (336 nt)
pEPR1/ <i>Plpd</i>	Promotor genu <i>lpd</i> (84 nt)
pRLG770/ <i>Plpd</i>	Promotor genu <i>lpd</i> (85 nt)
pEPR1/ <i>Pcg0607</i>	Promotor genu <i>cg0607</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>Pcg0607</i>	Promotor genu <i>cg0607</i> (75 nt)
pEPR1/ <i>PrsdA</i>	Promotor genu <i>rsdA</i> (341 nt)
pRLG770/ <i>PrsdA</i>	Promotor genu <i>rsdA</i> (70 nt)
pEPR1/ <i>Pcmt3</i>	Promotor genu <i>cmt3</i> (85 nt)
pRLG770/ <i>Pcmt3</i>	Promotor genu <i>cmt3</i> (85 nt)
pEPR1/ <i>Pcg2047</i>	Promotor genu <i>cg2047</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>Pcg2047</i>	Promotor genu <i>cg2047</i> (75 nt)
pEPR1/ <i>PlppS</i>	Promotor genu <i>lppS</i> (90 nt)
pRLG770/ <i>PlppS</i>	Promotor genu <i>lppS</i> (80 nt)
pEPR1/ <i>PfadD2</i>	Promotor genu <i>fadD2</i> (73 nt)
pRLG770/ <i>PfadD2</i>	Promotor genu <i>fadD2</i> (80 nt)
pEPR1/ <i>Pcmt2</i>	Promotor genu <i>cmt2</i> (90 nt)

pRLG770/ <i>Pcmt2</i>	Promotor genu <i>cmt2</i> (78 nt)
pEPR1/ <i>Pcg1056</i>	Promotor genu <i>cg1056</i> (80 nt)
pRLG770/ <i>Pcg1056</i>	Promotor genu <i>cg1056</i> (70 nt)
pEPR1/ <i>Pcg0420</i>	Promotor genu <i>cg0420</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>Pcg0420</i>	Promotor genu <i>cg0420</i> (70 nt)
pEPR1/ <i>PcatA1</i>	Promotor genu <i>catA1</i> (350 nt)
pRLG770/ <i>PcatA1</i>	Promotor genu <i>catA1</i> (360 nt)
pEPR1/ <i>PbenA</i>	Promotor genu <i>benA</i> (403 nt)
pRLG770/ <i>PbenA</i>	Promotor genu <i>benA</i> (410 nt)
pEPR1/ <i>Pcg0256</i>	Promotor genu <i>cg0256</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>Pcg0256</i>	Promotor genu <i>cg0256</i> (80 nt)
pEPR1/ <i>Pcg0785</i>	Promotor genu <i>cg0785</i> (80 nt)
pRLG770/ <i>Pcg0785</i>	Promotor genu <i>cg0785</i> (80 nt)
pEPR1/ <i>Pcg0668</i>	Promotor genu <i>cg0668</i> (65 nt)
pRLG770/ <i>Pcg0668</i>	Promotor genu <i>cg0668</i> (70 nt)
pEPR1/ <i>Pcg2322</i>	Promotor genu <i>cg2322</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>Pcg2322</i>	Promotor genu <i>cg2322</i> (80 nt)
pEPR1/ <i>Pcg2534</i>	Promotor genu <i>cg2534</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>Pcg2534</i>	Promotor genu <i>cg2534</i> (80 nt)
pEPR1/ <i>PsigM C. callunae</i>	Promotor genu <i>sigM C. callunae</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>PsigM C. callunae</i>	Promotor genu <i>sigM C. callunae</i> (70 nt)
pEPR1/ <i>PsigM C. deserti</i>	Promotor genu <i>sigM C. deserti</i> (75 nt)
pRLG770/ <i>PsigM C. deserti</i>	Promotor genu <i>sigM C. deserti</i> (75 nt)
pEPR1/ <i>PtrxB</i>	Promotor genu <i>trxB</i> (333 nt)
pEPR1/ <i>PsufR</i>	Promotor genu <i>sufR</i> (417 nt)
pRLG770/ <i>PsufR</i>	Promotor genu <i>sufR</i> (60 nt)
pEPR1/ <i>PclpP1</i>	Promotor genu <i>clpP1</i> (345 nt)
pRLG770/ <i>PclpP1</i>	Promotor genu <i>clpP1</i> (60 nt)
pEPR1/ <i>PuvrD3</i>	Promotor genu <i>uvrD3</i> (65 nt)
pRLG770/ <i>PuvrD3</i>	Promotor genu <i>uvrD3</i> (60 nt)
pEPR1/ <i>Pmca</i>	Promotor genu <i>mca</i> (60 nt)
pRLG770/ <i>Pmca</i>	Promotor genu <i>mca</i> (60 nt)
pEPR1/ <i>PmshC</i>	Promotor genu <i>mshC</i> (65 nt)
pRLG770/ <i>PmshC</i>	Promotor genu <i>mshC</i> (65 nt)
pEPR1/ <i>Pcg0378</i>	Promotor genu <i>cg0378</i> (204 nt)
pRLG770/ <i>Pcg0378</i>	Promotor genu <i>cg0378</i> (65 nt)
pEPR1/ <i>Pcg1121</i>	Promotor genu <i>cg1121</i> (299 nt)
pRLG770/ <i>Pcg1121</i>	Promotor genu <i>cg1121</i> (70 nt)
pEPR1/ <i>Pcg3344</i>	Promotor genu <i>cg3344</i> (228 nt)
pRLG770/ <i>Pcg3344</i>	Promotor genu <i>cg3344</i> (65 nt)
pEPR1/ <i>Pcg3309</i>	Promotor genu <i>cg3309</i> (275 nt)
pEPR1/ <i>Pcg3309mut</i>	Promotor genu <i>cg3309</i> s mutací v -35 oblasti (80 nt)
pEPR1/ <i>PtrxB1mut</i>	Promotor genu <i>trxB1</i> s mutací v -35 oblasti (80 nt)

3.1.4. Primery pro PCR

Tabulka 4. Seznam použitých oligonukleotidů (Sigma-Aldrich).

Primer	Sekvence oligonukleotidu (5'-3')
CM3	CGGCGGATTTGTCCTACT
30F	CCACCTGACGTCTAAGAAACC
1620R	GCGCTACGGCGTTTCACTTC
P770F2	ATTGTCTCATGAGCGGATAC
P770R2	CTCCGATCATAAGCTGTCAAAC
ECXT99AF	CCCGTTCTGGATAATGTTTT
ECXT99AR	GCTACGGCGTTTCACTTCTG
GFPEXF1	TTCTGC AGAATTCCGGATCCAAGTTCA
GFPEXR1	TTTCTAGAT CGGCCAGCCACATCAGC
SIGAPECF	GC GAATT CATCCTCAGCATCACTC
SIGAPECR	TG TCTAGAC GAACCAAAGCAACAG
SIGBPECF	AG GAATT CGTTGAACCTCTTGAAC
SIGBPECR	GC TCTAGAA CTCGCCGGTAAAATA
SIGDPECXTF	CT GAATTCT AAACTTTTAGGGTTTTGATG
SIGDPECXTR	GTC TCTAG ATTACTTGTTCCTCGCTGCTC
SIGCPECR	TTGA TCTAGAT CATCTGCTAACCTTGG
SIGCPECF	GGT GAATT CGGTCTGAACTGGTAT
EXSIGMTCF1	AAGAGCTCTGCAG GCCATACTAAGCCGCATAA
EXSIGMTCR1	AATCTAGAT CAAAGTAGTAAACGTAAAAGTGC
EXSIGETCF1	AAGAATTCGTGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATGAAAAAGAAGTCCCGA GATGACGCACCCG
EXSIGETCR1	AA TCTAGAA AGTTCCTGTCCGCACCAC
EXSIGHTCF1	AAGAATTCCTGCAG ATAGTCAACACGCATTTTCGAAAGGGGC
EXSIGHTCR1	AA TCTAGAC GAGTCGCTGCGGTTGAGA
PFBAPPEPRF	GAGGAAATATCACACGACAAAAGTTGAGTGATGCAGGCATAATTGGCTATA GGCAACT G
PFBAPPEPRR	GATTCAGTTGCCTATAGCCAATTATGCCTGCATCACTCAACTTTTGTCTGTG TGATATTTCTCT CTGCA
PFBAP770F	AATTCAGGAAATATCACACGACAAAAGTTGAGTGATGCAGGCATAATTGGC TATAGGCAACT A
PFBAP770R	AGCTTAGTTGCCTATAGCCAATTATGCCTGCATCACTCAACTTTTGTCTGTG TGATATTTCTCT G
PCMT1PEPRF	G TCGAAAAGGTAAAGCGCCTGTTAACGTAATAGCTTGAAATATAGATGTA AATTAAAG
PCMT1PEPRR	GATCCTTTAATTTACATCTATATTTCAAGCTATTACGTTAACAGGCGCTTT ACCTTTTCGAA CTGCA
PCMT1P770R	AGCTTTAATTTACATCTATATTTCAAGCTATTACGTTAACAGGCGCTTTAC CTTTTCG

PCMT1P770F	AATTCGAAAAGGTAAAGCGCCTGTTAACGTAATAGCTTGAAATATAGATGTAAATTAA
PCG2556R	AAGGG A TCCTTCTTGTTTGCTG
PCG2556F	ACACT GCAG AAATCTGGTTCAGGTATTC
CG2556P770F	AATTCACCAATTCTTTAAAGCTCTCACCCCTCTTTAGGGAACTGAATGCGGTCTGTACTCGACTACTGGATCATG A
CG2556P770R	AGCTT TTCATGATCCAGTAGTCGAGTACAGACCGCATTTCAGTTCCTTAAAGAGGGTGAGAGCTTTAAAGAATTGGT G
PRSHAHP	AA CTGCAG ATGCAATGAATCAACTC
PRSHADB	GAG GATCC CAGGGCAGCCACAATC
PRSHAP770F	AATTC TCCCAGCTCCATCGTGGAAGAAAACAGCTCCGAGGAATGTTAAAGGAAGTAGCGA GA
PRSHAP770R	AGCTT CTTCGCTACTTCTTTAACATTCTCGGAGCTGTTTTCTTCCACGATGGAGTCGGG AG
PSIGBHP3	GGCT GCAG CGGTGATTGAAAAGA
PSIGBDB3	GT GGAT CCGATGCCGTTGAGGTAA
PSIGAF2	GGCT GCAG ACCAACACCTCACCCCA
PSIGAR	GGTG GGATCC CCTGGAAAGTCTCAT
PSIGAP770R	TCCA AGCT TAGCGTTCATTATAGTTGA
PSIGAP770F	AT GAATTC TCGAAAGGTGATTTTTG CC
TRPTCGF1	CAGTTGTGTGATGTGGCAATGTTTCACG
GFP1	CTAATTCAACAAGAA TGGGAC
TRXB1F	GTCT GCAG ATCAATATCCACACCCT
TRXB1R	GCCGG ATC CTGTGCTCTCAAATGT
PCG0441UPF	GCGACTTGCAAATAGTTCATTTTCGGCAGAGTGCTAACGGTTAGGCACTATTTC CGTTAGTTCTTTTGTAGTCG
PCG0441UPR	GATCC GACTACAAAAGAACTAACGGAAAATAGTGCCTAACCGTTAGCACTCTGCCGAAATGAACTATTTGCAAGTCGCT GCA
PCG0441UP770F	AATTC CGACTTGCAAATAGTTCATTTTCGGCAGAGTGCTAACGGTTAGGCACATTTTCCGTTAGTTCTTTTGTAGT CA
PCG0441UP770R	AGCTT GACTACAAAAGAACTAACGGAAAATAGTGCCTAACCGTTAGCACTCTGCCGAAATGAACTATTTGCAAGTCG G
PCG0607F	GAAT TCAAATCCGTGTTGCGCGTTAATAAGGAACAATATCGGTGTGATTCCGATATATTAATCAGCTT G
PCG0607R	GATC CAAGCTGATTAATATATCGCGAATCACACCGATATTGTTCTTATTAACGCGCAACACGGATTTGAATT CTGCA
PCG0607P770F	AATTC AATTCAAATCCGTGTTGCGCGTTAATAAGGAACAATATCGGTGTGATTCGCGATATATTAATCAGCTT A
PCG0607P770R	AGCTT AAGCTGATTAATATATCGCGAATCACACCGATATTGTTCTTATTAACGCGCAACACGGATTTGAATT G
PIADPEPRF	TATGCT GCAG CTCGTATTGGAGG
PIADPEPRR	CCAAG GATCC CTCTCAAGATAAGAATGT

P1AD770F	AATTC TTTGCCTGGTCAGCGATGGAAGTAACAGAGTTAGGGAACCTTCTCG ATCTACTGAGTGAAA
P1AD770R	AGCTTTT CACTCAGTAGATCGAGAAGTTCCCTAACTCTGTTACTTCCATCG CTGACCAGCGCAAAG
PCMT3PEPRF	GATGCACCGGGG GAAACTATGGGGATTTTGGGGAGGTTGTTACAAAACCA TACGTCTGTGAAGATATGACGAGTGC G
PCMT3PEPRR	GATCCG CACTCGTCATATCTTCACAGACGTATGGTTTTGTAACAACCTCCC CCAAAATCCCCATAGTTTCCCCCGGTGCAT CTGCA
PCMT3770F	AATTC ATGCACCGGGGAAACTATGGGGATTTTGGGGAGGTTGTTACAAA ACCATACGTCTGTGAAGATATGACGAGTGC A
PCMT3770R	AGCTT GCACTCGTCATATCTTCACAGACGTATGGTTTTGTAACAACCTCCC CCAAAATCCCCATAGTTTCCCCCGGTGCAT G
PCG2047F	GTCGCATCAAGC ATTTTTTAGTGACGTAACATCAAAGAAGTATTCACTGAT GTAAGTAGTGGACTGAGCG
PCG2047R	GATCCG GCTCAGTCCACTACTTACATCAGTGAATACTTCTTTGATGTTACGT CACTAAAAAATGCTTGATGCGA CTGCA
PCG2047P770F	AATTC TGCGATCAAGCATTTTTTAGTGACGTAACATCAAAGAAGTATTCAC TGATGTAAGTAGTGGACTGAG CA
PCG2047P770R	AGCTT GCTCAGTCCACTACTTACATCAGTGAATACTTCTTTGATGTTACGT CACTAAAAAATGCTTGATGCGA G
PLPPSPEPRF	GCTCACAAAACCATTGAAAAGGCATTCTGGACGTAACGCTCCGGCATCTAC AAGGGATGATCAAAATAGCTACATGAGGAAATGTT G
PLPPSPEPRR	GATC CAACATTTCTCATGTAGCTATTTTGATCATCCCTTGTAGATGCCGG AGCGTTACGTCCAGAATGCCTTTTCAATGGTTTTGTGAG CTGCA
PLPPS770F	AATTC GCTCACAAAACCATTGAAAAGGCATTCTGGACGTAACGCTCCGGCA TCTACAAGGGATGATCAAAATAGCTACA
PLPPS770R	AGCTT GTAGCTATTTTGATCATCCCTTGTAGATGCCGGAGCGTTACGTCCA GAATGCCTTTTCAATGGTTTTGTGAG CG
PFADD2PEPRF	GGAACGGTCACTCGCTCAAGTAGTGTTAGTTTGCAAAAGTAATAAAATGTT CATCTTTGTCGATGGTCACAATAG G
PFADD2PEPRR	GATCC TATTGTGACCATCGACAAAGATGAACATTTTATTACTTTTGCAAA CTAACACTACTTGAGCGAGTGACCGTT CTGCA
PFADD2770F	AATTC GAACGGTCACTCGCTCAAGTAGTGTTAGTTTGCAAAAGTAATAAAA TGTTTATCTTTGTCGATGGTCACAATAG A
PFADD2770R	AGCTT CTATTGTGACCATCGACAAAGATGAACATTTTATTACTTTTGCAAA CTAACACTACTTGAGCGAGTGACCGTT G
PCMT2PEPRF	GGCTGTGATAACTACCCAAGAGTGTCACAACTTGGTAACGTGTGGGCGGAA AAACAAGATAGGCATCGAGAGGTATCAGCGGTCC A
PCMT2PEPRR	GATCC TGGACCGCTGATACCTCTCGATGCCTATCTTGTTTTCCGCCACACA CGTTACCAAGTTGTGACACTCTTGGGTAGTTATCACAGC CTGCA
PCMT2770F	AATTC GGCTGTGATAACTACCCAAGAGTGTCACAACTTGGTAACGTGTGGG CGGAAAAACAAGATAGGCATCGAGAG A
PCMT2770R	AGCTT CTCTCGATGCCTATCTTGTTTTTCCGCCACACGTTACCAAGTTGT GACACTCTTGGGTAGTTATCACAGC CG
PCG1056PEPRF	GAGCAGTAATTT GTTTTGACGACGCAGTAACGCAATCGGGGATTGTGGTCCG ATTCTTTAAGCAAGGGTAATGTCGAAAC G
PCG1056PEPRR	GATCC GTTTTCGACATTACCCTTGCTTAAAGAATCGACCACAATCCCCGATT CGTTACTGCGTCGTCAAAACAAATTACTGCT CTGCA

PCG1056770F	AATTCAGCAGTAATTTGTTTTGACGACGCAGTAACGCAATCGGGGATTGTG GTCGATTCTTTAAGCAAGA
PCG1056770R	AGCTTCTTGCTTAAAGAATCGACCACAATCCCCGATTGCGTTACTGCGTCG TCAAAACAATTACTGCTG
PCG0420PEPRF	GAAATATTTTGCATCTGAGCAGTTAGAAACGGTATGTCGGTAGTAACCGAT ACGATTTATTGAAGCTG
PCG0420PEPRR	GATCCAGCTTCAATAAATCGTATCGGTTACTACCGACATACCGTTTCTAAC TGCTCAGATGCAAAATATTTCTGCA
PCG0420770F	AATTCAAATATTTTGCATCTGAGCAGTTAGAAACGGTATGTCGGTAGTAAC CGATACGATTTATTGAAGCTA
PCG0420770R	AGCTTAGCTTCAATAAATCGTATCGGTTACTACCGACATACCGTTTCTAAC TGCTCAGATGCAAAATATTTG
PCATA1NEWF	CAAGAGACTGCGAGAGAAGTTGGTATT
PCATA1NEWR	TCGGATCCCTGCCTAGCGGAAAAAT
PCATA1770F	GAACCTCCAATTGAGTGAAAAG
PCATA1770R	GTC AAGCTTCTGCCTAGCGGAAAAATC
PBENANEWF	AGACTGCAAGGGGTGAAGTAGGG
PBENANEWR	GTGAGGATCCAAGAGAGTGAAAAG
PBENA770F	GTCA CAATTGTAGAGACTTTGGGGG
PBENA770R	CATGTGAAGCTTCAAGAGAGTG
PCG0256PEPRF	GGGGAACTCGCCTTGTTTTGCACCAACAGGGAACCTGGAGCGCAGTTTCG GGGTCTAAGTAGGTATGGGG
PCG0256PEPRR	GATCCCCATACCTACTTAGACCCCGAAACTGCGCTCCAGGTTCCCTGTTG GTGCAAAACAAGGCGAGTTTCCCCTGCA
PCG0256P770F	AATTCGGGAACTCGCCTTGTTTTGCACCAACAGGGAACCTGGAGCGCAGT TTCGGGGTCTAAGTAGGTATGGGA
PCG0256P770R	AGCTTCCCATACCTACTTAGACCCCGAAACTGCGCTCCAGGTTCCCTGTTG GTGCAAAACAAGGCGAGTTTCCCG
PCG0785PEPRF	GAGACCGCGCGGGCGAATTTGGGCTTGGAGGGAAACCAAACGGCCACTTTTC CAGTCCAACAAAGTATGAGG
PCG0785PEPRR	GATCCCTCATACTTTGTTGGACTGGAAAAGTGGCCGTTTGGTTCCCTCCAA GCCCAAATTCGCCCGCGCGGTCTCTGCA
PCG0785P770F	AATTCAGACCGCGCGGGCGAATTTGGGCTTGGAGGGAAACCAAACGGCCACT TTTCCAGTCCAACAAAGTATGAGA
PCG0785P770R	AGCTTCTCATACTTTGTTGGACTGGAAAAGTGGCCGTTTGGTTCCCTCCAA GCCCAAATTCGCCCGCGCGGTCTG
PCG0668PEPRFN	GTGAGAATCCCCTAATTTACATTC AAGGGAACCTTTTGGCCGTTTTTCC AGTCAAACACTTATTGACAGG
PCG0668PEPRRN	GATCCCTGTCAATAAGTGTGTTGACTGGAAAAACGGCCAAAAGGTTCCCTTG AATGTGAAATTAGGGGAATTCTCACTGCA
PCG0668P770FN	AATTCTGAGAATCCCCTAATTTACATTC AAGGGAACCTTTTGGCCGTTT TTCCAGTCAAACACTTATTGACAGA
PCG0668P770RN	AGCTTCTGTCAATAAGTGTGTTGACTGGAAAAACGGCCAAAAGGTTCCCTTG AATGTGAAATTAGGGGAATTCTCAG
PCG2322PEPRF	GCCCGTTTTAAAGAATTTTCTAAACTCGGGAACCTTTAGCCAACCTTTTC AAGTCCAACCCTTTTAAGAG

PCG2322PEPRR	GATCC TCTTAAAAGGGTTGGACTTGAAAAGTTGGCTAAAGGTTCCCGAGTT TTAGAAAATTCTTTTAAAACGGG CTGCA
PCG2322P770F	AATT CCCCGTTTTAAAAGAATTTTCTAAAACCTCGGGAACCTTTAGCCAACT TTTCAAGTCCAACCCTTTTAAGAA
PCG2322P770R	AGCT TTCTTAAAAGGGTTGGACTTGAAAAGTTGGCTAAAGGTTCCCGAGTT TTAGAAAATTCTTTTAAAACGGGG
PCG2534PEPRF	GTAAGTTCAAAAATAATTTGAATTTTAGGGAACCTACCCCGAACTTTTGC AGTCTAACGCTTATGAGT GG
PCG2534PEPRR	GATCC ACTCATAAGCGTTAGACTGCAAAAAGTTCGGGGTAGGTTCCCTAAA ATTCAAATTATTTTTTGAACT TACTGCA
PCG2534P770F	AATTC TAAGTTCAAAAATAATTTGAATTTTAGGGAACCTACCCCGAACTT TTGCAGTCTAACGCTTATGAGT GA
PCG2534P770R	AGCTT ACTCATAAGCGTTAGACTGCAAAAAGTTCGGGGTAGGTTCCCTAAA ATTCAAATTATTTTTTGAACT TAG
PSIGMCCF	GTTT CCGGCTTAGTTAGAACCAGCTGCCTTGTTTTGAAAAACGAGGCAGCT GGTTTTTGTTATTT CAGGTGGTG
PSIGMCCR	GATCC ACCACCTGAAATAACAAAAACCAGCTGCCTCGTTTTTCAAACAAG GCAGCTGGTTCTAACTAAGCCGGAAA CTGCA
PSIGMCC770F	AATTC CCTTGTTGAAAAACGAGGCAGCTGGTTTTTGTTATTT CAGGTGG TTTTTCAACCCCGACT A
PSIGMCC770R	AGCT TAGTCGGGGTTGAAAAACCACCTGAAATAACAAAAACCAGCTGCCTC GTTTTTCAAACAAG GG
PSIGMCDF	GCTAGATAGCTATTTGGACACACACATTCAGAAGAGGAACTGACAGTTATG CTCTGTGGTTAGACCCCTGTT G
PSIGMCDR	GATCC AAACAGGGGTCTAACCACAGAGCATAACTGTCAGTTCCTCTTCTGA ATGTGTGTGTCCAAATAGCTATCTAG CTGCA
PSIGMCD770F	AATTC TATTTGGACACACACATTCAGAAGAGGAACTGACAGTTATGCTCTG TGGTTAGACCCCTGTT A
PSIGMCD770R	AGCTT AAACAGGGGTCTAACCACAGAGCATAACTGTCAGTTCCTCTTCTGA ATGTGTGTGTCCAAATAG
SIGMPTRCF	ACCATGGAATTCGAGCTC
SIGMPTRCR	GCTGTCAAACCAGATCAATTC
TRXBF	CCGAA CTGCAG GGAATCAAAGTAGGTA
TRXBR	CGGG ATCC ATATACTGCTGCGGTA
SUFRF	TT CTGCAG TCGCATCATTCTACGC
SUFRR	GTGCAG GATCCA ACAGGATGAGAAGA
SUFRP770F	AATTC GAAGGGATTGGACACGGGAATGGAATTAGGGAACACTTGTGTTGTC TAAAGGTGAAAA
SUFRP770R	AGCTT TTTTACCTTTAGACAACACAAGTGTTCCCTAATTCCATTCCCGTGT CCAATCCCTTC G
CG1121PEPR1F	ATCC CTGCAGGC ACCCAAAC
CG1121PEPR1R	TCAAT GGATCC TTCGTTCGTCATCAAGTTA
CG1121P770F	AATTC AGTAAAGGTGTGAAAATAGTTCCTCACGTGGGGAACATACTGATC CTTGATGCGTTAACTTGATTGAC GA
CG1121P770R	AGCTT CGTCAATCAAGTTAACGCATCAAGGATCAGTATAGTTC CC CACGTG AGGAACTATTTT CACACCTTACTG

PCLPP1F	GGAATACT GCAGT GAAGAAGAAG
PCLPP1R	TTT GGATCC TATCGTCTACCTGG
CLPP1P770F	AATTC AGCGAACAGAGGGCGGTTTCATGGAAATACGCGGGTAGTCCGGTGAC ATTGAACCAAATGAA
CLPP1P770R	AGCTT TCAATTTGGTTCAATGTCACCGGACTACCCGCGTATTTCCATGAAAC CGCCTCTGTTTCGCT G
PUVRD3PEPRF	GCTTTA ACCGCTATCTGGAATGATTGATAGCTCCCAAGTGTTGTATCTATT CCAGTT G
PUVRD3PEPRR	GATCCA ACTGGAATAGATAACAACACTTGGGAGCTATCAATCATTCCAGATA GCGGTTAAAG CTGCA
PUVRD3P770F	AATTC CTTTAACCGCTATCTGGAATGATTGATAGCTCCCAAGTGTTGTATC TATTCCAGTT A
PUVRD3P770R	AGCTT AACCTGGAATAGATAACAACACTTGGGAGCTATCAATCATTCCAGATA GCGGTTAAAG G
PMCAPEPRF	GGGACG TTGGGTGTTTGGAAATGTTTGAAGCGCCTGATGCGTTGGATGGAGA GTTGGAG G
PMCAPEPRR	GATCC TCCAACCTCTCCATCCAACGCATCAGGCGCTTCGAACATTCCAAACA CCCAACGTCC CTGCA
PMCAP770F	AATTC GGACGTTGGGTGTTTGGAAATGTTTGAAGCGCCTGATGCGTTGGATG GAGAGTTGGAA
PMCAP770R	AGCTT TCCAACCTCTCCATCCAACGCATCAGGCGCTTCGAACATTCCAAACA CCCAACGTCC G
PMSHCPEPRF	GGATTT TTTGGTTTGTGGAATAGGTGCACTGGCGGCTTGGTTGAAGTTTCA GGTGAC G
PMSHCPEPRR	GATCC GTCACCTGAAACTTCAACCAAGCCGCCAGTGCACCTATTCCACAAA CCAAAAAAT CTGCA
PMSHCP770F	AATTC GATTTTTTGGTTTGTGGAATAGGTGCACTGGCGGCTTGGTTGAAGT TTCAGGTGACA
PMSHCP770R	AGCTT GTCACCTGAAACTTCAACCAAGCCGCCAGTGCACCTATTCCACAAA CCAAAAAAT CG
cg0378 F	AA CTGCAG AGCTGGGGTTTTTCT
cg0378 R	AC GGATCC CTTACTCCTACAAC
P0378770F	AATTC GATTCCATTTACGATGGAACATTTTTGAAGAATACCTCGTTGAATC TAGTGCAA A
P0378770R	AGCTT TTGCACTAGATTCAACGAGGTATTCTTCAAAAATGTTCCATCGTAA ATGGAAT CG
cg3344 F	AT CTGCAG TGTTTCTTACTTTA
cg3344 R	GAG GATCC GTGCGTCTTCGTCA
P3344770F	AATTC CACTTACTTGATGCGGGAACAAATTTGAAGGTTTTTTCAGTTGCTAT AGGTATGACA
P3344770R	AGCTT GTCATACCTATAGCAACTGAAAACCTTCAAATTTGTTCCCGCATC AAGTAAGT GG
P3309F	GT CTGCAG TTTTTGTGGTTTTTCTC
P3309R	AG GGAT CCTACAAAGGTGGTTGAA
PCG3309MUTHF	GTTTTG CTTTTCGACGTCTCCCTCCTCCCGTGGGAAT TA ACTCTCTAACTAA GTGCGTTAAGGAAGGTAGAAG G

PCG3309MUTHR	GATCC TTCTACCTTCCTTAACGCACTTAGTTAGAG AGTTA TTCCCACGGGA GGAGGGAGACGTCGAAAAGCAAAA CTGCA
PTRXB1MUTEF	GTG CCGGTCAATGAAGAAAATCCTTGGCCGGGA CTTTC ACAGTCCGCTGA AAGTTGGTCTATATATAGAC G
PTRXB1MUTER	GATCCG TCTATATATAGACCAACTTTT CAGCGG ACTGT GAAAG TTCCC GGCC AAGGATTTTCTTCATTGACCGGCA CTGCA
SIGEmutR-MF	GGTACCGT GATG TCCCCTATT CACCG
SIGEmutR-MR	ATTTTCACTCCGAGGGTC
SIGHmutM-RF	CGGAACTGT GCGC TCCC GACTCCATC
SIGHmutM-RRa	AGTGGAACGTCCATGATCTCGG
SIGHmutK-AF	CACCTATAT GCGG CGTACCAGG
SIGHmutK-AR	TCTTGCACGAGATCTTCC
SIGHmutTMSR-ARVAF	CGTCGCA CTCCATCGTGGAAGAAAACAG
SIGHmutTMSR-ARVAR	CGCACAGC TCCGAGTGGAACGTCCAT
CG3309P770F	AATTC GCTTTTTCGACGTCTCCCTCCTCCCGTGGGA ACTTTCCTCTAACTAA GTGCGTTAAGGAAGGTAGAAA
CG3309P770R	AGCTT TTCTACCTTCCTTAACGCACTTAGTTAGAGGAAAGTTCCCACGGGA GGAGGGAGACGTCGAAAAG CG

restrikční místa, mutace

3.1.5. Komerční soupravy

NucleoSpin[®] gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel)

NucleoSpin[®] plasmid (Macherey-Nagel)

NucleoBond[®] xtra midi (Macherey-Nagel)

Q5[®] Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs)

3.1.6. Použitý software

MS Office 2010 CZ (<http://office.microsoft.com>)

pDRAW32 – analýza a zpracování nukleotidových sekvencí (<http://www.acaclone.com>)

Bio-vision[®] Software – analýza a zobrazení agarózových a polyakrylamidových gelů

EditSeq (DNASTAR, Inc.) – editace nukleotidových sekvencí

SeqBuilder (DNASTAR, Inc.) – analýza a zpracování nukleotidových sekvencí

PrimerSelect (DNASTAR, Inc.) – navrhování primerů

Quantity One – analýza a zobrazení autoradiografie na citlivé fólii (*screen*)

3.1.7. Přístroje

Tabulka 5. Použité přístroje.

Název	Výrobce
Automatický autokláv MAC-235EX	Sanyo, USA
Spektrofotometr WPA CO 8000 Biowave Cell Density Meter	Biochrom Ltd, UK
Termoblok Termostat BT100	KLEINFELD Labortechnik, Německo
Quantum [®] CX5	Vilber, Francie
Zdroj napětí pro elektroforézu ST 305	Life Technologies, USA
Elektroporátor Bio-Rad Gene Pulser	Bio-Rad, USA
FastPrep [®] -24	M. P. Biomedicals, LLC., USA
Laboratorní váhy L610D	Sartorius, SRN
Odstředivka MIKRO 200R	Hettich, Německo
Odstředivka PMC-880 Capsulefuge	Gilson, Inc., USA
Odstředivka RT6000B	Sorval, USA
Odstředivka Sigma 112	Sigma, SRN
pH metr PHM210	Radiometer Analytical S. A., Francie
Savant DNA 120 SpeedVac System	Thermo scientific, USA
Spektrofotometr Biomate 5	Thermospectronics, UK
TC-3000 Thermal Cycler	Barloworld Scientific, USA
Sonikátor UW2200	Bandelin Electronic, Německo
Časovač sonikátoru Sonoplus HD2200	Bandelin Electronic, Německo
Vortex Zx3	P-LAB a.s., ČR
Odstředivka Avanti [®] J-26 XPI	Beckman Coulter, USA
Analytické váhy AND GR-202	A & D Instruments LTD, Japonsko
Molecular Imager FX	Bio-Rad, USA
Vakuová sušička gelů 583	Bio-Rad, USA
Spektrofluorimetr Safire ²	Tecan, Rakousko
Magnetická míchačka Mini MR Standard	IKA, Německo
Odstředivka J6-MI	Beckman Coulter, USA
Nanofotometr [®] 1702	IMPLEN, Německo

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace kmenů *E. coli* a *C. glutamicum*

Materiál

Půda 2xYT

kanamycin Km (Serva)

tetracyklin Tc (Serva)

ampicilin Ap (Serva)

Postup

Buňky *E. coli* byly kultivovány při 37 °C na pevné půdě či v tekutém mediu 2xYT. Kultury *C. glutamicum* byly kultivovány při 30 °C na pevné půdě či v tekutém mediu 2xYT. Pro selekci kmenů nesoucích plazmidy s determinanty rezistencí byl do kultivačního media přidáván kanamycin s výslednou koncentrací 30 µg/ml a/nebo tetracyklin (10 µg/ml) či ampicilin (100 µg/ml). Kultivace v tekutém mediu probíhala na rotační třepačce při 180-200 ot./min.

3.2.2. Izolace nukleových kyselin

3.2.2.1. Izolace plazmidové DNA z kmene *E. coli*

Materiál

Pufř GET (50mM glukóza (Lachema), 10mM Na₂EDTA (Sigma), 25mM Tris-HCl (Sigma); pH 8,0)

Čerstvě připravený 0,2M NaOH-1% SDS (Sigma)

Octan draselný (KAc) (3M KAc (Sigma); pH 4,8 upraveno k. octovou (Lach-Ner))

Isopropanol (Lachema)

LiCl (5M LiCl (Sigma) v 50mM Tris-HCl; pH 7,5)

96% EtOH (Fagron)

RNáza A (20 mg/ml) (Serva)

Fenol (Serva) : chloroform (Penta) 1:1

Chloroform (Penta) : isoamylalkohol (Penta) 24:1

70% EtOH

Pufř TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Sigma); pH 8,0)

Postup

Přes noc narostlá kultura *E. coli* v 50 ml tekutého media 2xYT s příslušným antibiotikem byla zchlazena na 5 minut v ledu a po převedení do centrifugační zkumavky (Falcon) centrifugována 10 min při 4 500 x g v chlazené centrifuze. Po odstranění supernatantu se sediment resuspendoval v 5 ml ledového pufru GET a ponechal 5 min v ledu. Pak bylo přidáno 10 ml roztoku NaOH-SDS a vzorek se promíchal rychlým převrácením. Po chlazení 10 min v ledu se přidalo 7,5 ml 3M octanu draselného a velmi pomalým převrácením se promíchalo. Po 10min chlazení v ledu se vzorek centrifugoval 20 minut při 5 000 x g v chlazené odstředivce a supernatant se přes sterilní gázu přelil do nové centrifugační zkumavky (Falcon). Plazmidová DNA v supernatantu se srážela 12 ml isopropanolu 10 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci 10 min při 5 000 x g v chlazené centrifuze se vysušený sediment obsahující i RNA rozpustil ve 2 ml sterilní vody, přidaly se 2 ml LiCl a po promíchání se vzorek chladil 15 min v ledu. Po centrifugaci 10 min při 4 500 x g se supernatant přepipetoval do nové centrifugační zkumavky (Falcon). Supernatant obsahoval plazmidovou DNA a sediment RNA. Plazmidová DNA se precipitovala 10 ml 96% EtOH po dobu 30 min při -20 °C. Po centrifugaci 10 min při 4 500 x g v chlazené centrifuze se vysušený sediment rozpustil ve 400 µl pufru TE a přenesl do mikrozukavky Eppendorf (dále jen mikrozukavka). Přidaly se 3 µl RNázy A (20 mg/ml) a inkubovalo se 30 min při 37 °C. DNA byla přečištěna extrakcí fenolem, chloroformem, srážena etanolem a rozpuštěna v 50 µl sterilní vody.

3.2.2.2. Miniizolace plazmidové DNA z kmene *E. coli*

Materiál

Pufr GET (50mM glukóza, 10mM Na₂EDTA, 25mM Tris-HCl; pH 8,0)

Čerstvě připravený 0,2M NaOH-1% SDS

KAc (3M acetát K; pH 4,8 upraveno k. octovou)

RNáza A (40 µg/ml)

96% EtOH

70% EtOH

Postup

Buňky *E. coli* byly kultivovány na pevné půdě 2xYT s příslušným antibiotikem při 37 °C přes noc. Poté byla odebrána klička buněk a resuspendována ve 100 µl pufru GET připraveném v mikrozkuhavce. Mikrozkuhavka byla ponechána na 5 min v ledu a poté bylo přidáno 200 µl čerstvě připraveného roztoku NaOH-SDS. Mikrozkuhavka byla krátce (1 s) homogenizována a ponechána 5 min v ledu. Po chlazení v ledu bylo přidáno 150 µl ledového 3M octanu draselného, obsah byl pomalým převrácením promíchán a byl chlazen 15 min v ledu. Po chlazení byla mikrozkuhavka centrifugována při 14 000 x g po dobu 9 min při 4 °C. Supernatant obsahující plazmidovou DNA byl přepipetován do nové mikrozkuhavky, která byla ihned vložena do ledu a bylo přidáno 850 µl 96% EtOH. Obsah byl promíchán a plazmidová DNA ponechána srážet při -20 °C po dobu 30 min. Po precipitaci byl sediment opláchnut 200 µl 70% EtOH při pokojové teplotě a vysušen. Vysušený sediment byl rozpuštěn ve 20 µl roztoku RNázy A (40 µg/ml) a inkubován 30 minut při 37 °C. DNA byla přečištěna extrakcí fenolem, chloroformem, srážena etanolem a rozpuštěna v 50 µl sterilní vody.

3.2.2.3. Miniizolace plazmidové DNA z *C. glutamicum*

Materiál

GET (50mM glukóza, 10mM Na₂EDTA, 25mM Tris-HCl; pH 8,0)

GET+L (GET + lysozym (Serva) 5 mg/ml)

KAc (3M acetát K; pH 4,8 upraveno k. octovou)

20% SDS

2M NaOH

Isopropanol

96% EtOH

70% EtOH

RNáza A (40 mg/ml)

Postup

Z přes noc narostlé kultury *C. glutamicum* na misce 2xYT s příslušným antibiotikem byla odebrána klička buněk do mikrozkuhavky a resuspendována v 300 µl SET+L. Po 2 h inkubace při 37 °C bylo přidáno 400 µl čerstvě připraveného 1% roztoku NaOH-SDS, získaná směs promíchána převrácením a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 300 µl 3M octanu draselného a výsledná směs opět promíchána

pomalým převracením. Po patnáctiminutovém chlazení v ledu byla mikrozkušavka centrifugována 5 min při 4 °C a 14 000 x g. Po centrifugaci se supernatant obsahující plazmidovou DNA přepipetoval do nových mikrozkušavek a precipitoval 900 µl 96% EtOH po dobu 10 min při -20 °C. Po precipitaci byl sediment opláchnut 200 µl 70% EtOH a po vysušení rozpuštěn ve 20 µl RNázy A (40 mg/ml) a 10 min inkubován. DNA byla přečištěna extrakcí fenolem, chloroformem, srážena etanolem a rozpuštěna v 50 µl sterilní vody.

3.2.2.4. Extrakce DNA fenolem

Materiál

Fenol (Roth):chloroform (VWR Chemicals) 1:1

Chloroform:isoamylalkohol (Lach-ner) 24:1

Postup

K roztoku DNA byl přidán stejný objem směsi fenol:chloroform, obsah byl důkladně promíchán třepáním a centrifugován 2 min při 13 000 x g. Poté byla do nové mikrozkušavky odebrána pouze horní fáze, přidán stejný objem směsi chloroform/isoamylalkohol a obsah byl důkladně protřepán a centrifugován 2 min na 13 000 x g. Horní fáze byla odebrána do nové mikrozkušavky a získaná DNA byla zakoncentrována srážením etanolem.

3.2.2.5. Srážení DNA etanolem

Materiál

3M KAc

96% EtOH

70% EtOH

Postup

Před srážením byla k roztoku DNA přidána 1/10 objemu 3M octanu draselného a DNA byla srážena 96% etanolem při -20 °C po dobu alespoň 20 min. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet vysrážené DNA promyt přidáním 100 µl 70% etanolu. Po další centrifugaci byl pelet vysušen na SpeedVac Concentratoru a resuspendován ve sterilní vodě.

3.2.2.6. Izolace chromozomální DNA z *C. glutamicum*

Materiál

GET (50mM glukóza, 10mM Na₂EDTA, 25mM Tris-HCl; pH 8,0)

GET+L (GET+lysozym 5 mg/ml)

20% SDS

Proteináza K (20 mg/ml) (Sigma)

5M NaCl

CTAB/NaCl (10% CTAB (Sigma) v 0,7M NaCl)

Postup

Z přes noc kultivovaných buněk *C. glutamicum* v 10 ml tekutého media 2xYT v 100ml baňce při 30 °C byly odebrány 2 ml kultury a následně centrifugovány při 14 000 x g po dobu 1 min v 1,5ml mikrozkušavce. Buňky byly resuspendovány v 500 µl pufru GET+L, ihned bylo přidáno 50 µl 20% SDS a 3 µl proteinázy K a suspenze byla opatrně promíchána otáčením. Po inkubaci 1 h při 37 °C bylo přidáno 100 µl 5M NaCl a opětovně opatrně promícháno otáčením. Poté bylo přidáno 80 µl roztoku CTAB/NaCl, promícháno otáčením a inkubováno 10 min při 65 °C. Následně byla DNA extrahována fenolem, srážena etanolem a dialyzována na MFTM membránovém filtru 0,025 µM VSWP (Milipore).

3.2.3. Transformace

3.2.3.1. Transformace *E. coli* (Hanahan, 1985)

Materiál

Roztok RF1 100 ml (99,2mM RbCl (Sigma), 78,8mM MnCl₂ x 4H₂O (Lachema),
10,2mM CaCl₂ x 2H₂O (International enzymes limited),
29,54mM octan draselný, 15% (v/v) glycerol (Lachema); pH 5,8
upraveno kyselinou octovou, sterilizováno filtrací)

Roztok RF2 100 ml (10 mM MOPS (Serva), 9,92mM RbCl, 74,8mM CaCl₂ x 2H₂O,
15% (v/v) glycerol; pH 6,8 upraveno NaOH, sterilizováno
filtrací)

MG (1M MgCl₂ (Lachema), 1M MgSO₄ (Lachema))

Postup

Příprava kompetentních buněk

Z přes noc kultivovaných buněk *E. coli* v 5 ml tekutého media 2xYT v 50ml baňce při 30 °C bylo zaočkováno 50 ml media 2xYT v 500ml baňce na $OD_{600} = 0,2$. Kultivace probíhala za stálého třepání na $OD_{600} = 0,6$ při 30 °C. Po kultivaci se kultura ihned zchladila v ledu a poté centrifugovala na chlazené centrifuze 10 min při 4 500 x g. Supernatant byl pečlivě odstraněn a sediment byl resuspendován v 17 ml ledového RF1. Po 15 min chlazení v ledu byly buňky opět centrifugovány po dobu 10 min při 4 500 x g v chlazené centrifuze. Supernatant byl odlit, sediment resuspendován ve 4 ml ledového RF2 a ponechán 15 min v ledu. Takto připravené kompetentní buňky byly rozplněny do předchlazených mikrozkušavek po 200 μ l. Kompetentní buňky byly buď hned použity pro transformaci nebo zamrazeny v -70 °C.

Transformace

Ke 200 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 10 μ l ligační směsi nebo 1 μ l plazmidové DNA (0,1 až 1 μ g) a vše ponecháno na ledu 30 min. Poté se buňky stresovaly teplotním šokem po dobu 90 s při 42 °C a ihned zchladily v ledu. Po přidání 800 μ l tekutého media 2xYT byly buňky přeneseny do skleněné zkumavky a regenerovány za stálého třepání 45 min při 37 °C. 200 μ l transformační směsi bylo následně vyseto na pevnou půdu 2xYT s příslušným antibiotikem a kultivováno při 37 °C.

3.2.3.2. Transformace buněk *C. glutamicum* elektroporací (van der Rest et al., 1999)

Materiál

Pufr GT (10% glycerol (v/v), 8mM Tris-HCl; pH 7,4)

Roztok G (10% glycerol (v/v))

Postup

Příprava kompetentních buněk

Z přes noc kultivovaných buněk *C. glutamicum* v 10 ml tekutého media 2xYT ve 100ml baňce při 30 °C bylo zaočkováno 100 ml tekutého media 2xYT v 500ml baňce na $OD_{600} = 0,2$ a kultivováno za stálého třepání při 30 °C do $OD_{600} = 0,4-0,6$. Poté byly kultury zchlazeny v ledu, buněčná suspenze centrifugována v chlazené centrifuze 10 min

při 4 500 x g a supernatant důkladně odstraněn. Sediment byl resuspendován v 50 ml pufru GT a následně opět centrifugován v chlazené centrifuze 10 min při 4 500 x g. Toto promytí pufrům GT se opakovalo dvakrát. Po poslední centrifugaci se sediment resuspendoval v 1 ml roztoku G a rozdělil po 200 μ l do mikrozkušavek. Kompetentní buňky byly buď přímo použity pro transformaci nebo zamraženy v -70 °C.

Transformace elektroporací

Elektroporační kyvety byly vymyty etanolem, vysušeny a sterilizovány UV zářením po dobu 1 min. Elektroporační přístroj Gene Pulser byl nastaven na napětí 2,5 kV, kapacitu 25 μ F a odpor 200 Ω .

K 200 μ l kompetentních buněk v ledu bylo přidáno 1-10 μ g plazmidové DNA. Po jemném promíchání a minutové inkubaci byla buněčná suspenze přepipetována do předem vychlazených sterilních elektroporačních kyvet (šířka 0,2 cm) a vystavena elektrickému pulzu trvajícím 4,5-5,5 milisekund. Poté byl ihned přidán 1 ml media 2xYT a suspenze byla převedena do mikrozkušavky. Buňky byly následně stresovány 6 min při 46 °C a poté sterilně převedeny do skleněných zkumavek. Kultivace trvala 2 h při 30 °C za stálého třepání. Po inkubaci byl obsah přenesen do mikrozkušavky a centrifugován 1 min při 11 000 x g. Pelet byl opětovně resuspendován ve 200 μ l 2xYT media a tato suspenze byla vyseta na pevnou půdu 2xYT s příslušným antibiotikem. Kultivace probíhala při 30 °C.

3.2.4. Dlouhodobé uchování buněk v glycerolu při -70 °C

Materiál

50% sterilní glycerol (v/v)

Postup

Buňky *E. coli* či *C. glutamicum* byly kultivovány přes noc na rotační třepačce při 37 °C či 30 °C. Po kultivaci bylo 300 μ l buněčné kultury opatrně smícháno s 700 μ l 50% glycerolu a uchovááno při -70 °C.

3.2.5. Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

Materiál

Pufr TAE (40mM Tris-acetát, 1mM EDTA; pH 8,0 upraveno na k. octovou)

Agarosa (SeaKem[®] LE)

Nanášecí pufr (30% glycerol (v/v), 0,25% (w/v) bromfenolová modř (Serva))

GelRed (Biotium Inc.)

Postup

Elektroforetická separace plazmidové a chromozomální DNA či fragmentů DNA byla prováděna na agarózovém gelu o koncentraci 0,7-2% (podle velikosti analyzované DNA) v pufru TAE. Ke vzorkům bylo před nanesením na gel přidáno 1-5 μ l sterilní vody, 3 μ l nanášecího pufru a 1 μ l 10x ředěného barviva nukleových kyselin GelRed. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 50-90 V po různou dobu podle velikosti DNA. Po obarvení byla DNA vizualizována UV zářením a zobrazena pomocí digitální kamery Quantum[©] a počítačovým programem Bio-Vision[©] software.

3.2.6. Elektroforetická analýza SDS-PAGE

Materiál

elektroforetická souprava ATTA AE-6500 (ATTO Corporation, Japonsko)

Spodní pufr (3M Tris, 0,8% (w/v) SDS; pH 8,8)

Vrchní pufr (0,5M Tris, 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8)

40% akrylamid (akrylamid (Serva): bisakrylamid (Serva) 37,5:1)

10% APS (Serva)

TEMED (Sigma)

Pufr Laemelli (25mM Tris, 192mM glycin (Lach-ner), 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3)

Nanášecí pufr Nupage (Invitrogen)

Proteinový standard (New England Biolabs)

1M IPTG (Serva)

Barvicí roztok (0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250 (Sigma), 45% (v/v) metanol (VWR Chemicals), 10% (v/v) k. octová)

Odbarvovací roztok (40% (v/v) metanol, 10% (v/v) k. octová)

Postup

Prvně byl mezi elektroforetická skla nalit namíchaný „spodní“ gel (3,75 ml dH₂O + 1,875 ml spodního pufru + 1,875 ml akrylamidu + 30 μ l APS + 15 μ l TEMED) a po jeho ztuhnutí „vrchní“ gel (1,92 ml dH₂O + 756 μ l vrchního pufru + 336 μ l akrylamidu +

12 μl APS + 6 μl TEMED). Do sestavené elektroforetické soupravy byl umístěn ztuhlý polyakrylamidový gel a zalit pufrem Laemelli. Z gelu byl vyjmut hřeben, jamky promyty pufrem Laemelli pomocí injekční stříkačky a do vzniklých jamek byly nanесeny analyzované vzorky, které byly smíchány s nanášecím pufrem (5 mg proteinového vzorku + 3 μl nanášecího pufru + dH_2O pro doplnění do objemu 12 μl). Elektroforetická aparatura byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 70 V po dobu 1 h, které bylo následně zvýšeno na 120 V. Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy zóna bromfenolové modři doputovala ke spodnímu okraji gelu. Po ukončení elektroforézy byl gel barven barvicím roztokem za stálého a pomalého promíchávání při laboratorní teplotě po dobu 0,5-1 h. Následně byl gel odbarvován odbarvovacím roztokem.

Pro stanovení velikosti separovaných proteinů ve vzorku byl použit proteinový standard *Color prestained protein standard* (New England BioLabs).

3.2.7. Izolace plazmidové DNA a jejích fragmentů z agarózového gelu

Materiál

NucleoSpin[®] gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel)

Postup

DNA byla izolována pomocí komerční soupravy NucleoSpin[®] gel and PCR clean-up. Po elektroforetické separaci byl pás gelu obsahující požadovaný fragment DNA vyříznut skalpelem a přenesen do 2ml mikrozkuřavky. Dále se již postupovalo podle návodu komerční soupravy, přičemž purifikovaná DNA byla z kolonky GenElute eluována 20-50 μl dH_2O a případně zakoncentrována na SpeedVac Concentratoru na objem 10 μl .

3.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Materiál

DNA polymeráza Green *GoTaq* (Promega)

DNA polymeráza Q5[®] High-Fidelity (New England BioLabs)

DNA polymeráza *OneTaq* (New England BioLabs)

DNA polymeráza *PfuUltra* II Fusion HS (Agilent Technologies, Inc.)

DNA polymeráza *Pfx* Platinum (Invitrogen)

10 mM dNTP (New England BioLabs)

10 μ M primery

Tabulka 6. Složení reakční směsi pro PCR.

Komponenta	Objem v 50 μ l
Reakční pufr ^I	5-10 μ l
dNTP ^I	0,5-1,5 μ l
Polymeráza ^I	0,25-1 μ l
Templát ^{II}	≤ 1 μ l
Primer 1	1-1,5 μ l
Primer 2	1-1,5 μ l
MgSO ₄ ^{III}	1 μ l
Enhancer ^{IV}	10 μ l
Voda ^V	Doplněno do 50 μ l

^IPoužité množství bylo voleno podle použité polymerázy, udáno výrobcem.

^{II}Jako templát byla použita plazmidová DNA nebo chromozomální DNA.

^{III}MgSO₄ bylo použito pouze při použití *Pfx* polymerázy.

^{IV}Enhancer byl použit pouze při použití Q5[®] High-Fidelity polymerázy.

^VAutoklávovaná destilovaná voda.

Tabulka 7. Program PCR reakce.

Cyklus	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	94 °C	30-120 s	1
2	Denaturace	94 °C	15-30 s	25-30
	Hybridizace	$T_m \pm 5$ °C	30 s	
	Syntéza	68 nebo 72 °C	15-40 s	
3	Závěrečná syntéza	68 nebo 72 °C	3-5 min	1

Podmínky PCR reakce byly voleny podle návodu dodaného výrobcem použitých polymeráz (DNA polymeráza *OneTaq*, *Platinum Pfx*, *PfuUltra II Fusion HS*, *Green GoTaq* nebo Q5[®] High-Fidelity).

3.2.9. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Materiál

Restrikční endonukleázy použité v této práci (*PstI*, *BamHI*, *EcoRI*, *XbaI*, *HindIII*; New England Biolabs)

Postup

Plazmidová DNA byla štěpena restričními endo-deoxyribonukleázami při 37 °C 2-4 h. Po štěpení byla DNA přesrážena etanolem a resuspendována v destilované vodě.

3.2.10. Ligace fragmentů plazmidové DNAMateriál

T4 DNA ligáza (New England Biolabs)

PEG 4000 (Thermo Scientific)

Postup

Ligační směs (voda, vektor + izolovaný fragment v odpovídajícím poměru, 1 μl ligačního pufru, 1 μl PEG 4000) byla preinkubována 5 min při 45 °C. Po zchlazení na 4 °C byl přidán 1 μl ligačního enzymu T4 DNA ligázy, poté byla teplota zvýšena na 22 °C a vlastní ligace probíhala 2 h při 22 °C. Následně byla ligační směs použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli*.

Pro ligaci bylo pro celkový objem vzorku 10 μl obvykle použito 100-200 ng DNA vektoru, přičemž množství přidaného fragmentu bylo vypočteno podle vzorce:

$$m_I = (m_V \cdot L_I/L_V) \cdot MR$$

m_Imnožství inzertu [ng]

m_Vmnožství vektoru [ng]

L_Ivelikost inzertu [kb]

L_Vvelikost vektoru [kb]

MR.....zvolený molární poměr inzert/vektor (většinou 3:1)

3.2.11. Stanovení aktivity promotorů fluorometricky

Aktivita promotorů byla stanovována prostřednictvím intenzity fluorescence zeleného fluorescenčního proteinu Gfp, jehož gen *gfpuv* byl použit jako reportérový gen.

Bez buněčný extrakt byl měřen na spektrofluorimetru Safira². Excitační vlnová délka byla 397 nm se šířkou štěrbinou 5 nm, zatímco emisní vlnová délka 509 nm při šířce štěrbinou 20 nm.

Příprava bezbuněčného extraktuMateriál

Pufir PBS (136,9mM NaCl, 2,68mM KCl (Lachema), 10,05mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O (Lachema), 1,76mM KH₂PO₄ (Lach-Ner); pH 8,0 upraveno H₃PO₄(Lach-Ner))

PMSF (0,1M PMSF v 96% EtOH) (Serva)

2-merkaptóetanol (Sigma)

1M IPTG (Serva)

Postup

Do 125 ml tekuté půdy 2xYT Km30Tc10 byla zaočkována čerstvá kultura na OD₆₀₀ = 0,5. Kultivace probíhala za stálého třepání při 30 °C. Při dosažení OD₆₀₀ = 1 byl odebrán „nultý“ vzorek, zbylá kultura rozdělena na poloviny a jedna z nich zaindukována 1mM IPTG. Další odběry již probíhaly podle potřeb, a to většinou po 3, 6 a 24 h od začátku indukce.

Odebrán byl vždy takový objem kultury, aby obsahoval přibližně 1,8 mg buněk. Odebraný vzorek byl zchlazen v ledu a centrifugován při 4 °C (objem > 2 ml při 5000 x g 5 min, objem < 2 ml při 13 000 x g 1 min). Sediment byl promyt 1 ml směsí: pufir PBS + 0,1mM PMSF + 3mM 2-merkaptóetanol (dále směs PBS) a po opětovné centrifugaci resuspendován v 500 µl směsi PBS. Vzorky byly ponechány v chladu a temnu minimálně 3 h.

Poté byla suspenze přepipetována do speciálních 2ml mikrozkušavek pro drcení buněk. Do mikrozkušavek bylo přidáno 200 µl kuliček Balotina velikosti 10. Drcení probíhalo na přístroji Fast Prep 24 při rychlosti 6,0 m/s po dobu 60 s. Tento cyklus byl po pětiminutovém chlazení na ledu opakován ještě 2x. Následovala chlazená centrifugace 20 min při 14 000 x g, po níž byl supernatant opatrně přepipetován do nových 1,5ml mikrozkušavek. Získaný čirý supernatant byl dále použit pro stanovení proteinové koncentrace a pro fluorometrické stanovení aktivity promotoru.

Stanovení koncentrace proteinůMateriál

Reakční roztok (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), 4,8% (v/v)

EtOH, 8,5% (v/v) k. fosforečná (Lach-Ner))

BSA (bovine serum albumin 10 mg/ml) (Sigma)

Postup

Celková koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu byla stanovena metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976). K 5-20 μ l (do celkového objemu 20 μ l doplněno sterilní vodou) bezbuněčného extraktu bylo přidáno 980 μ l reakčního roztoku. Obsah byl promíchán a inkubován minimálně 10 min a maximálně 60 min. Poté byla změřena absorbance vzorku na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Výsledná celková koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena odečtením z grafu kalibrační křivky.

Kalibrační řada byla připravena stejným způsobem, avšak místo vzorku byla použita řada vodných roztoků BSA o koncentracích 0-1 mg/ml.

Stanovení specifické aktivity promotoru

Specifická aktivita promotoru byla stanovena podle výpočtu:

$$\text{fluorescence} / \text{konc. proteinů [mg/ml]} = \text{AU [fluorescence/mg proteinu]}$$

Intenzita fluorescence byla vyjádřena v arbitrárních jednotkách AU/mg proteinu. Pro určení pozadí fluorescence byl použit vektor pEC-XT99A či pEPR1.

3.2.12. *In vitro* transkripční systém**3.2.12.1. Izolace jádra RNA polymerázy a faktorů sigma**Materiál

Pufr P (300mM NaCl, 50mM Na₂HPO₄ (Lachema), 5% (v/v) glycerol, 3mM

2-merkaptoetanol, 0,1mM PMSF; pH 8,0)

Pufr P + gradient imidazolu (5-400 mM)

Kobaltnaté kuličky TALON[®] metal affinity resin (Clontech)

2M imizadol (pH 8,0) (Serva)

Reakční roztok (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), 4,8% (v/v) EtOH,
8,5% (v/v) k. fosforečná (Lach-Ner))

1M IPTG (Serva)

PMFS (0,1M PMSF v 96% EtOH) (Serva)

2-merkaptoetanol (Sigma)

Dialyzační zkumavky D-Tube[™] maxi 6-8 kDa (Merck)

Skladovací pufr (50mM Tris, 100mM NaCl, 50% (v/v) glycerol, 3mM

2-merkaptoetanol; pH 8,0)

ddH₂O (prostá RNáz a DNáz)

Elektroforetická vana P10DS (Owl Separation System Inc., USA)

Poly-Prep chromatografické kolonky (Bio-rad)

Fólie BAS-IP SR 2025 Imaging Plate (Fujifilm)

Kmen *C. glutamicum rpoC-His8* (Holátko *et al.*, 2012) byl kultivován v komplexním médiu 2xYT do dosažení pozdní exponenciální růstové fáze. Následně byl centrifugován 20 min při 4 000 x g a 4 °C, promyt a resuspendován v pufru P. Buněčná stěna byla narušena pulzní sonikací (sonikátor Bandelin, amplituda 20 %, cyklus 0,30 s, 10 opakování) za stálého chlazení. Mezi jednotlivými intervaly byl vzorek chlazen 1 min v ledu, aby nedošlo k denaturaci proteinů zvyšující se teplotou. Buněčný lyzát byl centrifugován v chlazené odstředivce 20 min při 27 000 x g a čirý supernatant byl přenesen do nových zkumavek. Následně byl přidán roztok s kobaltnatými kuličkami TALON[®] (vazba proteinů s histidinovou kotvou). Směs byla 2 h inkubována v chladu za pomalého rotačního kývání, poté centrifugována v chlazené odstředivce 5 min při 5 000 x g a sediment obsahující kobaltnaté kuličky s navázaným proteinem přenesen do chromatografických kolonek Poly-Prep. Směs v kolonkách byla promyta pufrům P obsahujícím 5mM imidazol. Eluce proteinu z chromatografické matrice TALON[®] byla provedena pufrům P s přidavkem imidazolu o koncentracích 10-400 mM. Nejvyšší výtěžek jádra RNA polymerázy byl stanoven ve frakcích obsahujících 10mM a 20mM imidazol. Pro stanovení koncentrace proteinů byla použita metoda podle Bradfordové a pro vizualizaci byly jednotlivé frakce analyzovány elektroforeticky v 10% polyakrylamidovém gelu. Frakce s nejvyšším výtěžkem byly spojeny, dialyzovány přes noc pomocí dialyzační zkumavky D-Tube[™] maxi (postup stanoven výrobcem) proti skladovacímu pufru a výsledné izolované jádro RNAPolymerázy uchováváno při -20 °C.

Proteiny jednotlivých faktorů sigma byly izolovány Holátkem *et al.*, 2012.

3.2.12.2. Klonování promotorových oblastí pomocí komplementárních oligonukleotidů

Materiál

Restriční endonukleázy (*EcoRI*, *HindIII*) (New England Biolabs)

Pufr 10x *Pfx* Platinum (Invitrogen)
50mM MgSO₄ (Invitrogen)
T4 DNA ligáza (New England Biolabs)
Komplementární oligonukleotidy

Postup

Plazmidová DNA byla postupně štěpena restrikními endonukleázami v celkovém objemu 50 µl v pufru CutSmart při 37 °C po dobu 2 h. Kontrola štěpení byla provedena elektroforézou v 1% agarózovém gelu.

Hybridizace (2x 2,5 µl oligonukleotidů (koncentrace 100 µM) + 5 µl pufru 10x *Pfx* Platinum + 1,25 µl 50mM MgSO₄, doplněno dH₂O do 50 µl) probíhala v PCR cycleru. Počáteční teplota byla 95 °C, která se každou minutu snížila o 1 °C až na konečnou teplotu 45 °C. Získané komplementární oligonukleotidy byly použity do ligační směsi.

Ligace 5 µl zhybridizovaných oligonukleotidů se 100 ng vektoru pRLG770 probíhala v termocykleru při teplotě 22 °C 2 h. Vzniklá ligační směs byla použita pro transformaci buněk *E. coli* DH5α. Transformované buňky byly vysety na pevnou půdu 2xYT s ampicilinem o koncentraci 100 µl/ml. Kontrola transformantů byla provedena metodou PCR s použitím kombinací kontrolních oligonukleotidů 30F+1620R a P770F2+P770R2.

3.2.12.3. Příprava templátové DNA

Materiál

Amicon Ultra-0,5 ml 30 kDa (Merck)

Postup

Templátový PCR fragment pro *in vitro* transkripci byl připraven pomocí PCR za použití DNA polymerázy Q5[®] High-Fidelity a oligonukleotidů 30F a CM3 z konstruktu pRLG770 s naklonovanou promotorovou oblastí. Následně byl PCR fragment přečištěn fenolováním a zakoncentrován pomocí kolony Amicon dle návodu dodaného výrobcem na finální objem 20 µl.

Purifikovaný PCR fragment byl velikostně ověřen v 1,5% agarózovém gelu a jeho koncentrace stanovena pomocí nanofotometru IMPLÉN.

3.2.12.4. Transkripční reakce *in vitro*

Tato metoda byla použita pro testování specifické iniciace transkripce pomocí holoenzymu RNA polymerázy s určitým faktorem sigma na studované promotorové oblasti naklonované ve vektoru pRLG770.

Materiál

Pufř DB (50mM Tris, 2mM EDTA, 0,1mM DTT, 1mM 2-merkaptoetanol, 233mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 130 μ g/ml lysozym; pH 8,0)

Transkripční pufř 20x konc. (400mM Tris, 100mM MgCl₂, 10mM DTT; pH 7,9)

BSA (10 mg/ml)

1M KCl

Nukleotidy ATP, CTP, GTP (20mM) a UTP (1mM)

Radioaktivně značený nukleotid α^{32} P-UTP

Stop pufř (2x pufř TBE, 7M močovina, 10mM EDTA, 1% SDS, 2x TBE pufř, 0,05% bromfenolová modř, 0,05% xylencyanol)

Pufř TBE (90mM Tris, 90mM kyselina boritá, 2mM EDTA; pH 8,3)

ddH₂O (striktně bez RNáz a DNáz)

Fólie absorbující radioaktivní záření (BAS-IP SR 2025 Imaging Plate, Fujifilm)

Chromatografický papír (3MM Chr, General Electric)

Postup

Příprava transkripční směsi probíhala za stálého chlazení v plexisklovém boxu umístěném v oddělené místnosti z důvodu používání radioaktivně značených sloučenin.

Enzymová směs holoenzymu RNA polymerázy byla za stálého chlazení připravena smícháním jádra RNA polymerázy s příslušným proteinem faktoru sigma (v různých poměrech – RNAP: σ^A 1:15, RNAP: $\sigma^{B,C,D,E,H,M}$ 1:30) a s pufřem DB do celkového objemu 1,5 μ l. Rekonstituce holoenzymu RNA polymerázy s příslušným faktorem sigma probíhala 10 min při 37 °C.

Za stálého chlazení byla připravena reakční směs skládající se z teplotové DNA, ddH₂O, transkripčního pufřu, KCl, BSA, nukleotidů (ATP, GTP, CTP, UTP) a radioaktivně značeného α^{32} P-UTP v celkovém objemu 8,5 μ l (Tab. 8).

K 1,5 μ l enzymové směsi bylo přidáno 8,5 μ l reakční směsi a inkubováno po dobu 15 min při teplotě 30 °C. Poté byla reakce zastavena přidáním 10 μ l stop pufřu. Vzorky byly analyzovány na vertikální elektroforéze nanesením na PAA gel (5,5% (v/v)

akrylamid, 7M močovina, TBE, 0,0857% (v/v) APS a 0,069% (v/v) TEMED). Gel byl následně přemístěn na chromatografický papír, vysušen 45 min při 80 °C na vakuové sušičce gelů a vložen do expoziční kazety obsahující fólii absorbující radioaktivní záření. Po 15 až 24hodinové expozici byl autoradiogram naskenován pomocí přístroje Molecular Imager FX a analyzován pomocí softwaru Quantity One.

Tabulka 8. Složení reakční směsi.

Složka	Objem [μ l]	C _{TRANSKRIPČNÍ SMĚS}
20x TB	0,5	1x
BSA	0,1	100 μ g/ml
Templátová DNA	1,0	150 ng DNA
ATP	0,1	200 μ M
GTP	0,1	200 μ M
CTP	0,1	200 μ M
UTP	0,1	10 μ M
³² P-UTP	0,1	
KCl	0,9	90 mM
ddH ₂ O	5,5	

4. Výsledky

Hlavním cílem této dizertační práce bylo určit skupiny genů (regulony) *C. glutamicum* řízené jednotlivými faktory sigma σ^D , σ^E , σ^H a σ^M , a také specifikovat fyziologické podmínky, které tyto faktory sigma regulují. K tomu bylo třeba vyvinout metodiku, která zcela jednoznačně přiřadí faktor sigma k jednotlivým promotorům příslušných genů. Součástí vývoje této metodiky byla konstrukce *in vivo* dvouplazmidového systému, který by doplňoval metodicky zcela odlišný *in vitro* transkripční systém při spolehlivé analýze těchto promotorů.

V rámci řešení projektu byly použity dílčí *in vivo* techniky (stanovení promotorových aktivit pomocí zeleného fluorescenčního proteinu Gfp, nadexprese genů faktorů sigma) a *in vitro* transkripční systém vyvinutý v Laboratoři molekulární genetiky bakterií MBÚ AV ČR, v. v. i. (Holátko *et al.*, 2012).

4.1. Konstrukce dvouplazmidového systému

Dříve vytvořený a popsáný dvouplazmidový systém pro *E. coli* (Rezuchová a Kormanec, 2001), kterým lze určit závislost aktivity promotoru na konkrétním faktoru sigma, posloužil jako model pro vývoj analogické metody pro *C. glutamicum*. Je založen na přítomnosti dvou typů vektorů, a to expresního a *promoter-probe*, v téže buňce. V expresním vektoru je klonován gen kódující zvolený faktor sigma a v *promoter-probe* vektoru je před reportérovým genem vložen studovaný promotor. Po indukci nadprodukce faktoru sigma z expresního vektoru vzniká holoenzym RNA polymerázy nesoucí příslušný faktor sigma a zahajující intenzivní transkripci ze studovaného promotoru za produkce snadno detekovatelného fluorescenčního produktu (Gfp).

4.1.1. Výběr expresního a *promoter-probe* vektoru

Produkce každého proteinu je individuální a závislá na použitém expresním vektoru. Pro nadprodukcí proteinu je u expresního vektoru rozhodující síla a regulovatelnost indukovaného promotoru, počet kopií plazmidu, použitý induktor a účinnost transportu induktoru do buňky.

V Laboratoři molekulární genetiky bakterií MBÚ se již dlouho úspěšně pracuje s *promoter-probe* vektorem pEPR1, a proto byl i vybrán pro konstrukci dvouplazmidového systému. Tento vektor nese reportérový gen *gfpuv* kódující zelený

fluorescenční protein Gfp, takže naměřená intenzita fluorescence je úměrná úrovni transkripce studovaného promotoru.

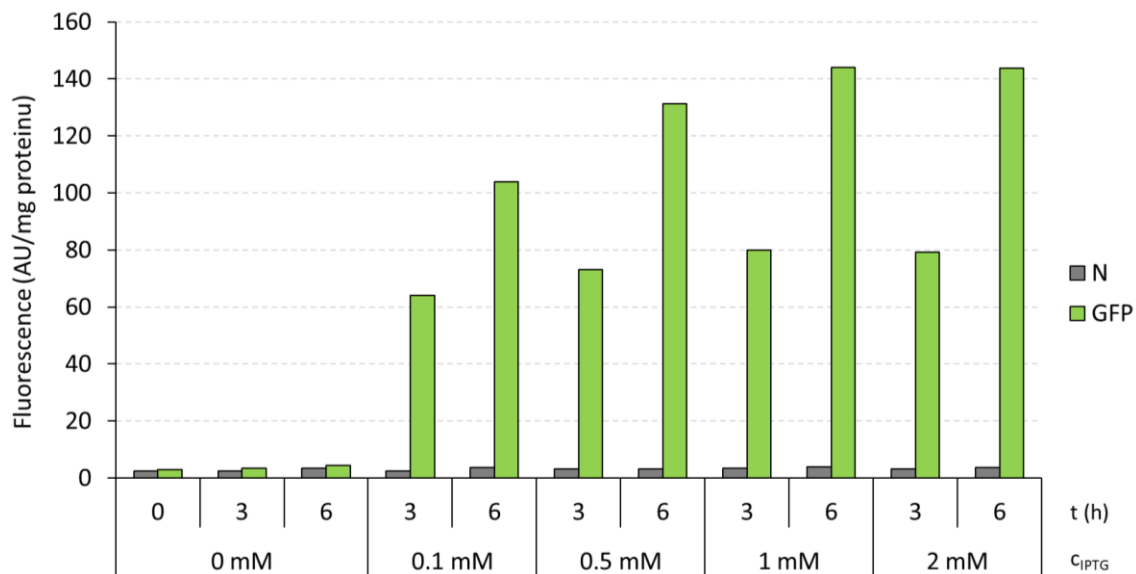
Co se týče volby expresního vektoru pro nadprodukcí konkrétního faktoru σ , během vypracování této dizertační práce bylo v naší laboratoři testováno několik expresních vektorů, a to pCLTON1 (Dvořáková, 2017), pEC-XT99A (tato práce), pEKEx3 (Dvořáková, 2017) a pVWEx2, přičemž poslední z nich byl ihned vyřazen kvůli opakovanému neúspěšnému klonování v něm (Dostálová, nepublikováno). U ostatních vektorů již byla zjišťována jejich míra maximální exprese reportérového genu *gfpuv* za indukčních podmínek, neboť výsledná intenzita fluorescence měla určit sílu expresního vektoru, bazální exprese bez přidání induktoru (*leaky expression*) a homogenita populace buněk z hlediska exprese klonovaného genu. Na základě těchto kritérií se jevil jako nejvhodnější vektor pEC-XT99A, jelikož u něj docházelo k indukci v 90 % populace buněk (Dvořáková, 2017) a v podstatě nevykazoval *leaky* expresi.

4.1.1.1. Klonování genu *gfpuv* v expresním vektoru pEC-XT99A

Strukturální gen *gfpuv* byl amplifikován pomocí PCR, kde jako templátová DNA byl zvolen *promoter-probe* vektor pEPR1, který tento gen obsahuje. Byly navrženy oligonukleotidy GFPEXF1 a GFPEXR1 pro amplifikaci fragmentu o velikosti 848 nt, který byl následně klonován v expresním vektoru pEC-XT99A (rekombinantní konstrukt byl připraven v *E. coli*) a ověřeným konstruktem byl transformován kmen *C. glutamicum* WT.

4.1.1.2. Optimalizace podmínek exprese v buňkách *C. glutamicum*

Před použitím vybraného expresního vektoru pEC-XT99A v dvouplazmidovém systému bylo třeba nejprve zjistit vhodnou koncentraci induktoru pro expresi genů kódujících faktory sigma. Indukce byla optimalizována s použitím kmene *C. glutamicum* WT nesoucího modelový konstrukt pEC-XT99A/*gfp* (Obr. 12).



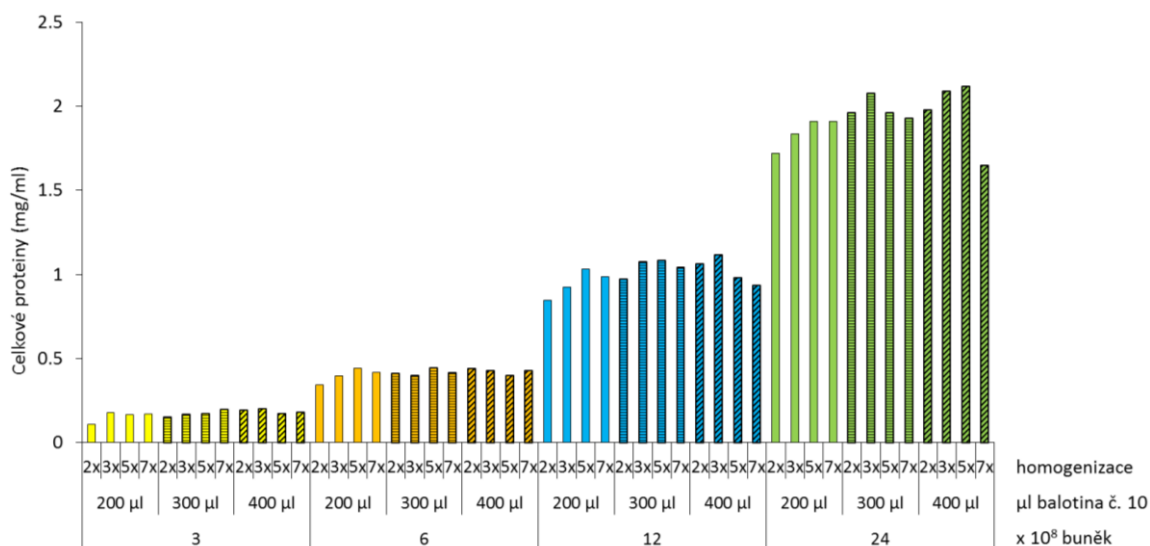
Obrázek 12. Míra exprese genu *gfp* z vektoru pEC-XT99A za různých koncentrací induktoru IPTG. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu. Odběry probíhaly v časech 0 (před přidáním induktoru), 3 a 6 h od přidání induktoru. Koncentrace IPTG jsou uvedeny na spodním okraji obrázku. AU=arbitrární jednotka.

Z obrázku 12 je patrné, že bazální hodnota fluorescence systému bez klonovaného genu *gfp* (kmen *C. glutamicum* pEC-XT99A) je velmi nízká. Hodnoty naměřené intenzity fluorescence s použitím buněk *C. glutamicum* nesoucích rekombinantní plazmid pEC-XT99A/*gfp* ukazují, že tento vektor opravdu nevykazuje *leaky* expresi, a je tedy vhodný k indukované nadprodukci příslušných faktorů sigma v dvouplazmidovém systému. Jako optimální byla zvolena koncentrace IPTG 1 mM, protože její další zvýšení již nezesilovalo expresi.

Ze začátku byla veškerá intenzita fluorescence měřena v celých buňkách, ale měření vykazovala malou citlivost a špatnou reprodukovatelnost. Proto jsme se rozhodli měřit intenzitu fluorescence v bezbuněčném extraktu.

4.1.1.3. Optimalizace podmínek homogenizace buněk *C. glutamicum*

U kmene *C. glutamicum* WT nesoucího konstrukt pEC-XT99A/*gfp* byla optimalizována koncentrace buněk, objem kuliček balotiny č. 10 a počet opakování cyklů homogenizace (dezintegrace buněk s použitím balotinových kuliček) (Obr. 13) měřením výtěžku celkových proteinů.



Obrázek 13. Optimalizace koncentrace buněk, objemu kuliček Balotina a počet opakování cyklů homogenizace. Sloupce určují koncentraci izolovaných celkových proteinů v mg/ml. Testovaný počet buněk 3×10^8 je znázorněn žlutou barvou, 6×10^8 oranžově, 12×10^8 modře a 24×10^8 zeleně. Další údaje: 200 µl, 300 µl a 400 µl (objem kuliček balotina č. 10), 2x, 3x, 5x a 7x (počet opakování cyklů homogenizace).

Z naměřených hodnot celkových proteinů se jako nejlepší počet buněk jeví koncentrace buněk 24×10^8 . Z použitého množství kuliček balotiny č. 10 byl zvolen objem 200 µl, vzhledem k tomu, že jeho zvýšením nedocházelo k významnému vzrůstu výtěžku proteinů. Počet tří cyklů homogenizace byl vybrán jako časově nejméně náročný, ale přitom dostatečně efektivní.

4.1.1.4. Klonování genů faktorů sigma v expresním vektoru

pEC-XT99A

Do podvojného vektoru pEC-XT99A byly pomocí PCR a technik rekombinantní DNA (viz Materiál a metody, 3.2.8.-3.2.10.) vkládány PCR amplikony nesoucí strukturální geny faktorů sigma o velikostech 1646 bp (*sigA*), 1136 bp (*sigB*), 634 bp (*sigC*), 622 bp (*sigD*), 737 bp (*sigE*), 681 bp (*sigH*) či 777 bp (*sigM*) za použití kombinací oligonukleotidů (SIGAPECF a SIGAPECR; SIGBPECF a SIGBPECR; SIGCPECF a SIGCPECF; SIGDPECF a SIGDPECF; EXSIGETCF1 a EXSIGETCF1; EXSIGETCF1 a EXSIGETCF1; EXSIGETCF1 a EXSIGETCF1; EXSIGETCF1 a EXSIGETCF1; EXSIGETCF1 a EXSIGETCF1). Konstrukty byly selektovány v *E. coli* a po ověření nukleotidové sekvence transformací vneseny do *C. glutamicum* WT a do delečního kmene *C. glutamicum* $\Delta sigH$.

4.1.1.5. Klonování promotorů v *promoter-probe* vektoru pEPR1

PCR amplikony studovaných promotorů byly klonovány ve stabilním *promoter-probe* vektoru pEPR1, který se naší laboratoří již dlouho úspěšně používá. Ověřené selektované konstrukty v *E. coli* byly transformací vneseny do *C. glutamicum* WT či do delečního kmene *C. glutamicum* $\Delta sigH$, které již nesly expresní vektor pEC-XT99A/*sig*,*X*".

4.1.2. Testování promotorů rozpoznávaných různými faktory sigma

Pro ověření spolehlivosti dvouplazmidového systému pro přiřazení faktorů sigma konkrétním promotorům různých tříd byly vybrány již popsané promotory rozpoznávané jednotlivými faktory sigma *C. glutamicum* (Tab. 9).

Tabulka 9. Seznam modelových promotorů jednotlivých tříd.

Faktor sigma	Promotor	Citace
σ^A	P2 <i>sigA</i>	Halgašová <i>et al.</i> , 2001
σ^B	P <i>fba</i>	Ehira <i>et al.</i> , 2008
σ^C	P <i>cg2556</i>	Toyoda a Inui, 2016a
σ^D	P <i>cm1</i>	Taniguchi, ústní sdělení; Toyoda a Inui, 2018
σ^E	P <i>sigB</i>	Park <i>et al.</i> , 2008
σ^H	P <i>rshA</i>	Busche <i>et al.</i> , 2012
σ^M	P <i>trxB1</i>	Nakunst <i>et al.</i> , 2007

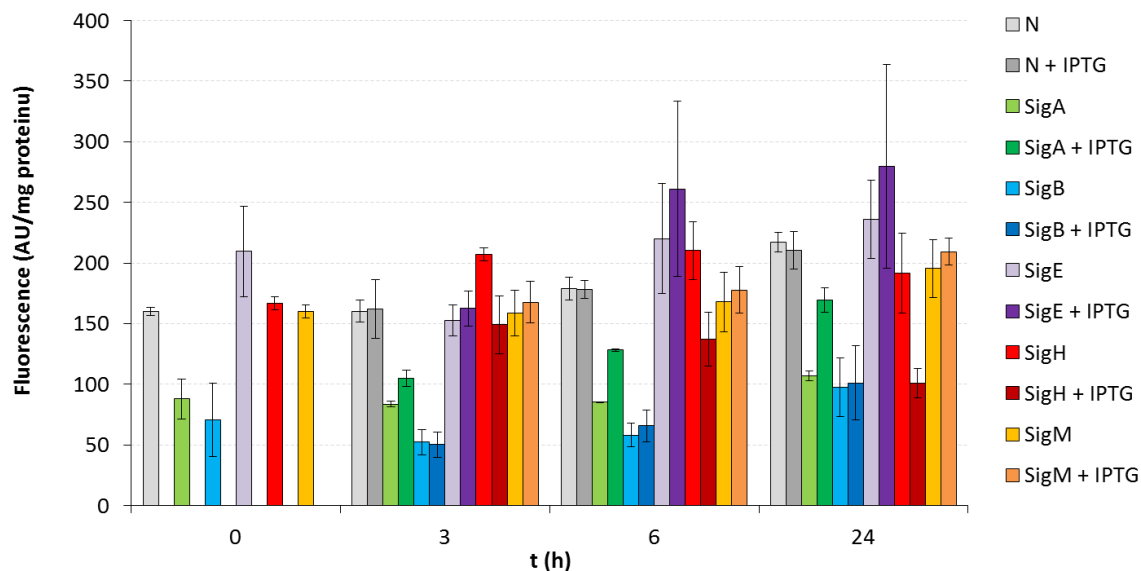
4.1.2.1. Testování σ^A -dependentního promotoru P2*sigA*

4.1.2.1.1. Měření aktivity promotoru P2*sigA* v dvouplazmidovém systému

Fragment P2*sigA* (265 nt) nesoucí SigA-dependentní promotor genu kódujícího hlavní faktor sigma σ^A (Halgašová *et al.*, 2001) byl připraven pomocí PCR s použitím oligonukleotidů PSIGAF2 a PSIGAR. Po naklonování v *promoter-probe* vektoru pEPR1 a vnesení transformací do kmene *C. glutamicum* WT nesoucího na expresním vektoru gen faktoru sigma (*sigA*, *sigB*, *sigE*, *sigH* nebo *sigM*) byla změřena jeho aktivita. Faktory sigma σ^C a σ^D nebyly použity z důvodu jejich vysoké specifity a zcela odlišné konvenční sekvence.

Aktivita promotoru P2*sigA* byla měřena za standardních podmínek (30 °C) s počátkem kultivace OD₆₀₀ = 0,5. Kultivace pokračovala do OD₆₀₀ = 1, kdy proběhl odběr buněk označený jako 0 (před indukcí), po němž byla kultura rozdělena. První polovina sloužila jako kontrola bez indukce a do druhé byl přidán 1 mM roztok IPTG.

Další odběry probíhaly 3, 6 a 24 hodin po přidání IPTG. Vzorky byly zpracovány, jak je uvedeno v kapitole „Stanovení aktivity promotorů fluorimetricky“. Jako kontrola měření posloužil prázdný vektor pEC-XT99A.



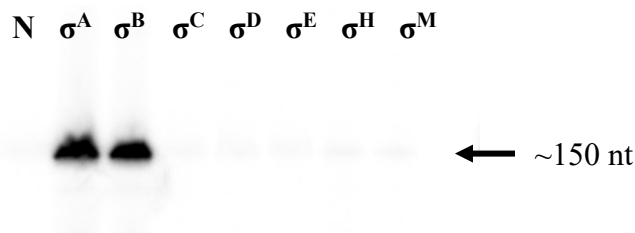
Obrázek 14. Aktivita promotoru $P2sigA$ v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě promotoru. Vpravo jsou uvedeny geny kódující faktory sigma nesené jednotlivými konstrukty ve vektoru pEC-XT99A. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Výsledné měření aktivity promotoru $P2sigA$ (Obr. 14) ukazuje prokazatelně zvýšenou aktivitu $P2sigA$ za nadprodukce faktoru σ^A , což je v souladu s předpokladem. Naměřené hodnoty za nadprodukce ostatních faktorů sigma nebyly signifikantně zvýšené oproti kulturám bez induktoru. Vysoká hodnota kultury s prázdným vektorem pEC-XT99A (kontrola) i všech ostatních kultur s konstrukty pEC-XT99A/*sig*,*X*“ je pravděpodobně způsobena aktivitou faktoru σ^A , který je produktem chromozomového genu *sigA*. Další komentář je součástí Diskuze.

4.1.2.1.2. *In vitro* transkripční analýza promotoru $P2sigA$

Fragment nesoucí promotor $P2sigA$ o velikosti 123 nt byl amplifikován za použití oligonukleotidů PSIGAP770F a PSIGAP770R a klonován ve vektoru pRLG770 pro analýzu transkripce *in vitro*. Tento konstrukt posloužil jako templátová DNA pro přípravu PCR fragmentu do transkripční reakce *in vitro*.

Do reakční směsi obsahující jádro RNA polymerázy byl alternativně přidán faktor σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H nebo σ^M a jako kontrola byla použita reakční směs bez přidaného faktoru sigma.



Obrázek 15. *In vitro* transkripční analýza promotoru P2sigA. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje ~150 nt specifický transkript.

Na obrázku s výsledkem *in vitro* transkripční reakce (Obr. 15) jsou vidět dva silné signály ~150 nt produktů *in vitro* transkripce s faktory σ^A a σ^B . U ostatních faktorů sigma nebyl zaznamenán žádný produkt.

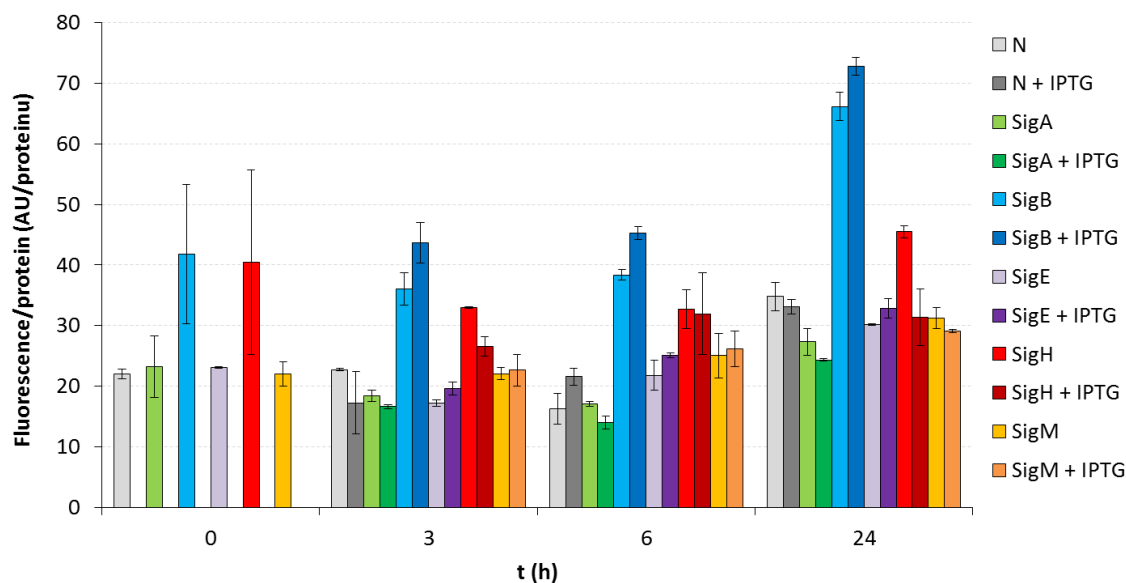
Výsledky technik *in vivo* a *in vitro* potvrdily, že promotor P2sigA je σ^A -dependentní, což je v souladu s předpokladem. Metoda *in vitro* transkripce ukázala, že tento promotor může být za specifických podmínek pravděpodobně aktivní i s faktorem σ^B (např. ve stacionární fázi či během stresu).

4.1.2.2. Testování σ^B -dependentního promotoru P**fba**

4.1.2.2.1. Měření aktivity promotoru P**fba** v dvouplazmidovém systému

Jako zástupce σ^B -dependentních promotorů byl vybrán promotor genu *fba* kódujícího fruktózo-1,6-bifosfátaldolázu (Ehira *et al.*, 2008).

Klony *C. glutamicum* WT nesoucí dvouplazmidový systém s naklonovaným fragmentem promotoru P**fba** (70 nt) byly použity pro měření promotorové aktivity za standardních fyziologických podmínek a indukované nadprodukce testovaných faktorů sigma. Klonování, příprava dvouplazmidových kmenů a měření aktivity promotoru bylo provedeno analogicky jako u předchozího promotoru P2sigA.

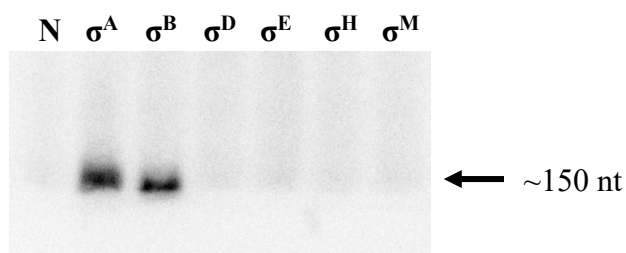


Obrázek 16. Aktivita promotoru *Pfba* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Vpravo jsou uvedeny geny kódující faktory sigma nesené jednotlivými konstrukty ve vektoru pEC-XT99A. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z výsledku měření (Obr. 16) je patrná aktivita promotoru *Pfba* za nadprodukce faktoru σ^B , což se shoduje s publikovanými výsledky (Ehira *et al.*, 2008). Aktivita promotoru se slabě zvyšuje také za nadprodukce faktoru σ^E , zatímco za nadprodukce ostatních faktorů sigma nikoli. Vysoká aktivita promotoru za přítomnosti faktoru σ^B i bez indukce je patrně způsobena aktivitou faktoru σ^B , který je produktem chromozomového genu *sigB*. Snížená aktivita *Pfba* při nadprodukci faktoru σ^H (3 h a 24 h) je dána pravděpodobně kompeticí faktorů σ^H a σ^B o RNA polymerázu.

4.1.2.2.2. *In vitro* transkripční analýza promotoru *Pfba*

Analogicky jako u promotoru *P2sigA* byl templát s promotorem *Pfba* (65 nt) použit pro *in vitro* transkripční systém.



Obrázek 17. *In vitro* transkripční analýza promotoru *Pfba*. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje ~150 nt specifický transkript.

Na obrázku testu promotoru *Pfba* *in vitro* transkripce (Obr. 17) jsou vidět dva silné signály ~150 nt produktů *in vitro* s faktory σ^A a σ^B . U ostatních faktorů sigma nebyl zaznamenán žádný produkt.

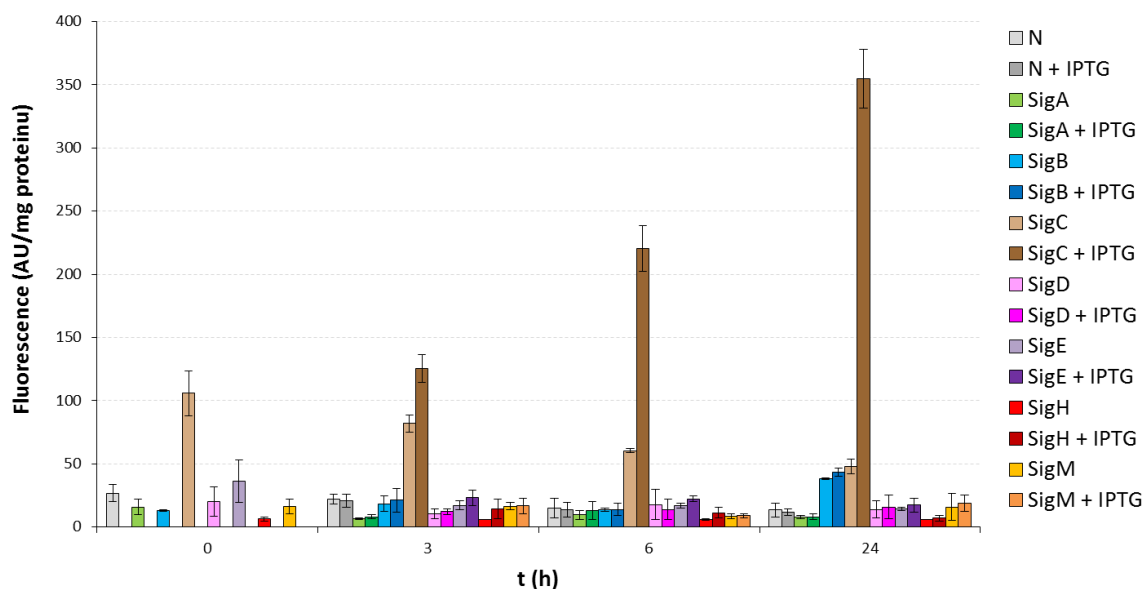
Výsledky metod *in vivo* a *in vitro* potvrdily, že promotor *Pfba* je σ^B -dependentní. Technika *in vitro* transkripce naznačila, že tento σ^B -dependentní promotor může být za určitých podmínek aktivní i s faktorem σ^A .

4.1.2.3. Testování σ^C -dependentního promotoru *Pcg2556*

4.1.2.3.1. Měření aktivity promotoru *Pcg2556* v dvouplazmidovém systému

Jako zástupce σ^C -dependentních promotorů byl vybrán promotor genu *cg2556* kódujícího blíže necharakterizovaný membránový protein regulovaný železem (Toyoda a Inui, 2016a).

Klony *C. glutamicum* WT nesoucí dvouplazmidový systém s naklonovaným fragmentem promotoru *Pcg2556* (217 nt) byly použity pro měření promotorové aktivity za standardních fyziologických podmínek. Klonování a měření aktivity promotoru dvouplazmidovým systémem bylo provedeno analogicky jako u promotoru *P2sigA* (viz Výsledky, 4.1.2.1.1.).

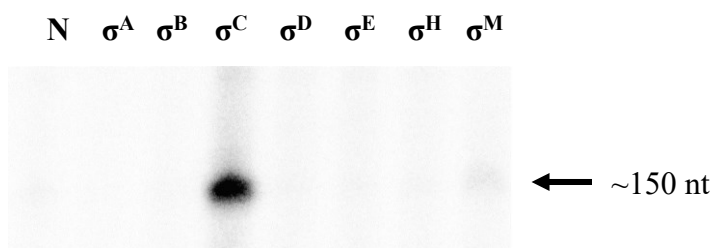


Obrázek 18. Aktivita promotoru *Pcg2556* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Vpravo jsou uvedeny geny kódující faktory sigma nesené jednotlivými konstrukty ve vektoru pEC-XT99A. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Výsledný graf (Obr. 18) ukazuje silnou aktivitu promotoru *Pcg2556* za nadprodukce faktoru σ^C , což je v souladu se stanovením *Pcg2556* jako σ^C -dependentního promotoru jinou metodou (Toyoda a Inui, 2016a). Aktivita promotoru s ostatními faktory sigma je nepatrná.

4.1.2.3.2. *In vitro* transkripční analýza promotoru *Pcg2556*

Aktivita promotoru *Pcg2556* neseného fragmentem o velikosti 75 nt byla testována *in vitro* transkripcí analogicky jako u promotoru *P2sigA* (viz Výsledky, 4.1.2.1.2.).



Obrázek 19. *In vitro* transkripční analýza promotoru *Pcg2556*. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje ~150 nt specifický transkript.

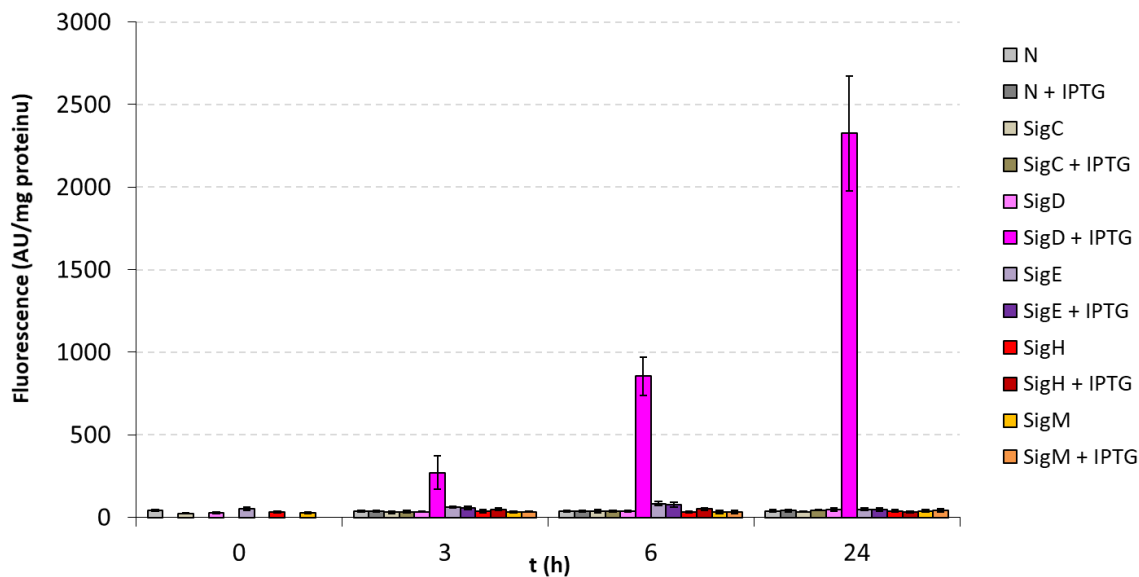
Z výsledku *in vitro* transkripce (Obr. 19) je vidět pouze signál specifického produktu vzniklého s faktorem σ^C . Výsledky metod *in vivo* a *in vitro* se tedy výborně shodují a potvrzují předpoklad, že promotor genu *cg2556* je σ^C -dependentní.

4.1.2.4. Testování σ^D -dependentního promotoru *Pcmt1*

4.1.2.4.1. Měření aktivity promotoru *Pcmt1* v dvouplazmidovém systému

Za zástupce σ^D -dependentních promotorů byl vybrán promotor genu *cmt1* kódujícího trehalózakoronomykolyltransferázu (Taniguchi *et al.*, 2017b; Toyoda a Inui, 2018).

Klony *C. glutamicum* WT nesoucí dvouplazmidový systém s klonovaným promotorem *Pcmt1* (65 nt) byly použity pro měření promotorové aktivity za standardních fyziologických podmínek. Klonování a měření aktivity promotoru bylo provedeno analogicky jakou u promotoru *P2sigA* (viz Výsledky, 4.1.2.1.1.). Faktory σ^A a σ^B nebyly použity, jelikož se podle sekvenčních motivů promotoru předpokládala jeho aktivita pouze se stresovými faktory sigma (σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M).

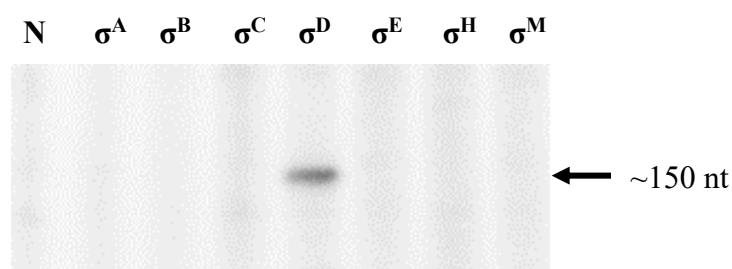


Obrázek 20. Aktivita promotoru *Pcmt1* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je reportérem aktivity testovaného promotoru. Vpravo jsou uvedeny geny kódující faktory sigma nesené jednotlivými konstrukty ve vektoru pEC-XT99A. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z výsledného grafu (Obr. 20) je patrná silná aktivita promotoru *Pcmt1* v kmeni s nadprodukcí faktoru σ^D , což se shoduje s publikovanými výsledky (Taniguchi *et al.*, 2017b; Toyoda a Inui, 2018). Aktivita s ostatními faktory sigma je nepatrná.

4.1.2.4.2. *In vitro* transkripční analýza promotoru *Pcmt1*

Analýza promotoru *Pcmt1* (62 nt) byla provedena analogicky v systému *in vitro* transkripce jako v předchozích případech.



Obrázek 21. *In vitro* transkripční analýza promotoru *Pcmt1*. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje ~150 nt specifický transkript.

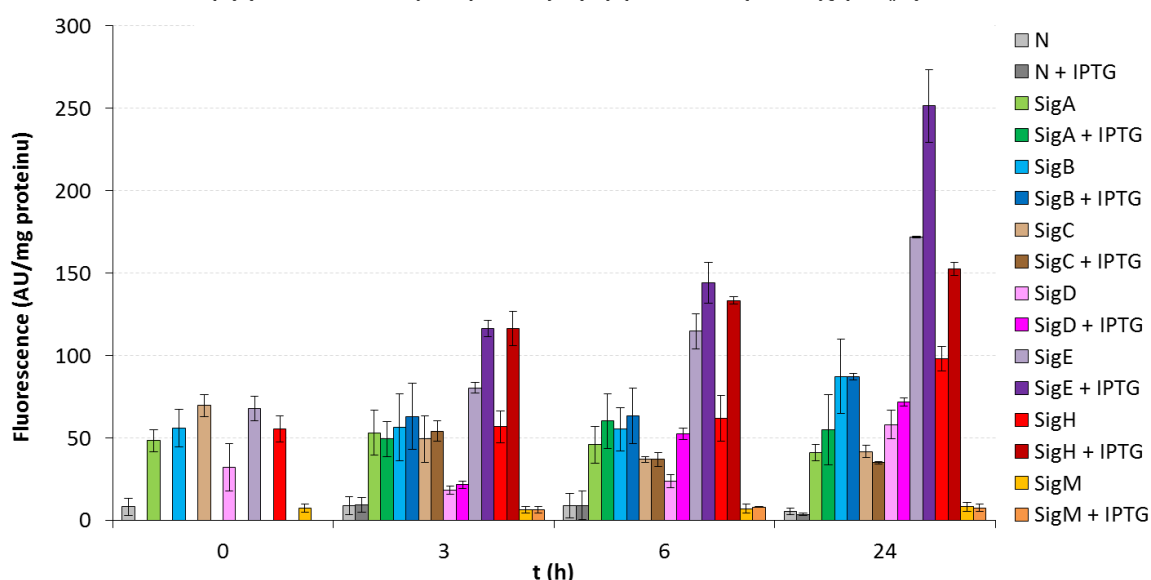
Na výsledném obrázku *in vitro* transkripce (Obr. 21) je vidět specifický transkript pouze v reakci s faktorem σ^D . Výsledky *in vivo* a *in vitro* se tedy opět dokonale shodují a jasně prokazují, že promotor genu *cmt1* je striktně σ^D -dependentní.

4.1.2.5. Testování σ^E -dependentního promotoru *PsigB*

4.1.2.5.1. Měření aktivity promotoru *PsigB* v dvouplazmidovém systému

Jako σ^E -dependentní promotor byl vybrán promotor genu *sigB* kódujícího faktor σ^B patřící do skupiny 2 (σ^A -like) (Park *et al.*, 2008).

Klony *C. glutamicum* $\Delta sigH$ nesoucí dvouplazmidový systém s klonovaným promotorem *PsigB* (378 nt) byly použity pro měření promotorové aktivity za stejných podmínek jako v předchozích případech. Deleční kmen byl vybrán z důvodu silné afinity faktoru σ^H k RNA polymeráze, což by mohlo blokovat vazbu faktoru σ^E . Podle našich poznatků spolu tyto faktory sigma silně kompetují i na úrovni vazby k promotoru (Pátek a Nešvera, 2013; Šilar *et al.*, 2016).

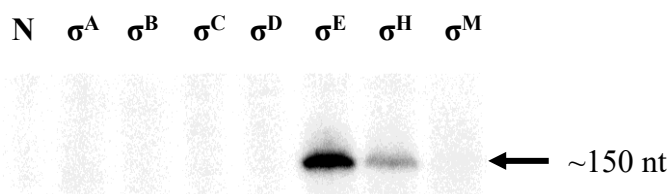


Obrázek 22. Aktivita promotoru *PsigB* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Vpravo jsou uvedeny geny kódující faktory sigma nesené konstrukty ve vektoru pEC-XT99A. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Výsledek (Obr. 22) ukázal prokazatelnou aktivitu promotoru *PsigB* za nadprodukce faktorů σ^E a σ^H . Promotor genu *sigB* je tedy rozeznáván nejen faktorem σ^H , jak bylo publikováno (Ehira *et al.*, 2008), ale i σ^E .

4.1.2.5.2. *In vitro* transkripční analýza promotoru *PsigB*

Analýza promotoru *PsigB* (75 nt) byla provedena analogicky v systému *in vitro* transkripce, jako v předchozích případech.



Obrázek 23. *In vitro* transkripční analýza promotoru *PsigB*. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje ~150 nt specifický transkript.

Výsledek *in vitro* transkripce (Obr. 23) ukázal dva signály specifických transkriptů s faktory σ^E a σ^H , avšak signál specifického transkriptu se σ^E je viditelně silnější než specifický transkript se σ^H .

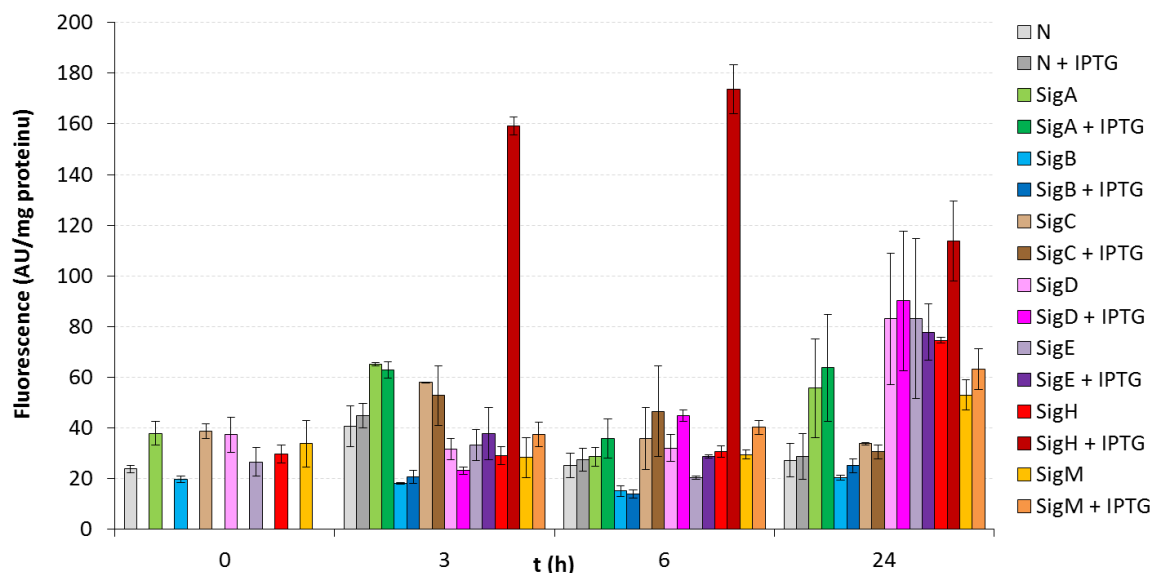
Výsledky *in vivo* a *in vitro* potvrdily σ^H -dependentnost promotoru *PsigB*. Prokázala se však také aktivita s faktorem σ^E , která byla *in vivo* na stejné úrovni jako s faktorem σ^H , ale až 5x silnější *in vitro*, takže tento promotor je σ^E/σ^H -promiskuitní, byť primárně σ^E -dependentní.

4.1.2.6. Testování σ^H -dependentního promotoru *PrshA*

4.1.2.6.1. Měření aktivity promotoru *PrshA* v dvouplazmidovém systému

Zástupcem σ^H -dependentních promotorů byl vybrán promotor genu *rshA* kódujícího faktor anti- σ^H (Busche *et al.*, 2012).

Klony kmene *C. glutamicum* $\Delta sigH$ nesoucí dvouplazmidový systém s klonovaným promotorem *PrshA* (278 nt) byly použity pro měření promotorové aktivity za stejných podmínek jako v předchozích případech. Deleční kmen byl vybrán z důvodu silné afinity faktoru σ^H k RNA polymeráze, což by mohlo blokovat vazbu faktoru σ^E . Podle našich poznatků spolu tyto faktory sigma silně kompetují i na úrovni vazby k promotoru (Pátek a Nešvera, 2013; Šilar *et al.*, 2016).

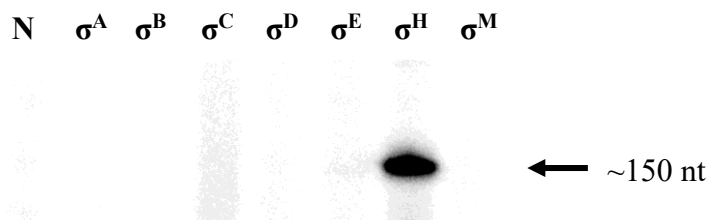


Obrázek 24. Aktivita promotoru *PrshA* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Vpravo jsou uvedeny geny kódující faktory sigma nesené konstrukty ve vektoru pEC-XT99A. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Aktivita promotoru *PrshA* byla výrazně zvýšena za nadprodukce faktoru σ^H (Obr. 24), zatímco aktivita s ostatními faktory sigma není patrná. To se shoduje s dosud publikovanými výsledky (Toyoda *et al.*, 2015).

4.1.2.6.2. *In vitro* transkripční analýza promotoru *PrshA*

Analýza promotoru *PrshA* (60 nt) byla provedena analogicky v systému *in vitro* transkripce jako v předchozích případech.



Obrázek 25. *In vitro* transkripční analýza promotoru *PrshA*. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje ~150 nt specifický transkript.

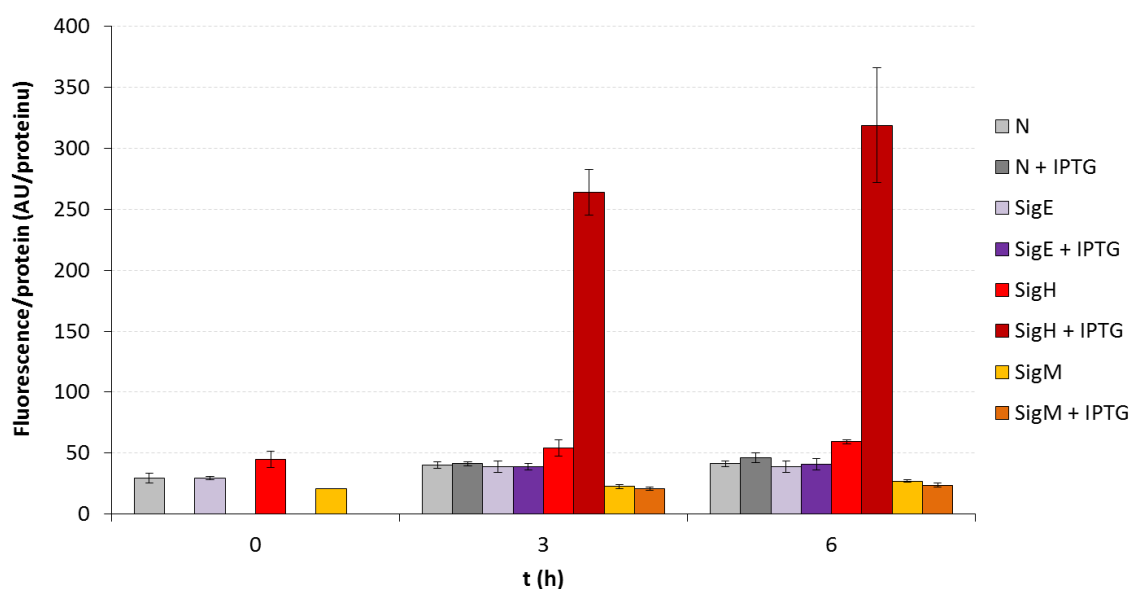
Na obrázku 25 je vidět silný signál specifického transkriptu v reakční směsi s faktorem σ^H , což je ve shodě s výsledkem *in vivo*. Metodami *in vivo* a *in vitro* bylo tedy potvrzeno striktní rozpoznání promotoru genu *rshA* faktorem σ^H .

4.1.2.7. Testování předpokládaného σ^M -dependentního promotoru *PtrxB1*

4.1.2.7.1. Měření aktivity promotoru *PtrxB1* v dvouplazmidovém systému

Promotor genu *trxBI* kódujícího disulfidoxidoreduktázu byl ve studii Nakunst *et al.* (2007) stanoven jako σ^M -dependentní, a byl zde proto testován jako zástupce této třídy promotorů.

Klony kmene *C. glutamicum* $\Delta sigH$ nesoucí dvouplazmidový systém s klonovaným promotorem *PtrxBI* (336 nt) byly použity pro měření promotorové aktivity za stejných podmínek jako v předchozích případech. Deleční kmen $\Delta sigH$ byl vybrán z důvodu silné afinity faktoru σ^H k RNA polymeráze, což by mohlo blokovat vazbu faktoru σ^E a σ^M . Faktory σ^A , σ^B , σ^C a σ^D nebyly v experimentu použity, protože jejich konvenční sekvence se liší.

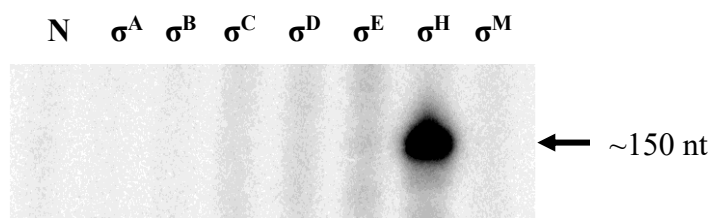


Obrázek 26. Aktivita promotoru *PtrxBI* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Vpravo jsou uvedeny geny kódující faktory sigma nesené konstrukty ve vektoru pEC-XT99A. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z výsledného grafu (Obr. 26) můžeme vidět zvýšenou aktivitu promotoru *PtrxBI* za nadexprese faktoru σ^H , zatímco aktivita s faktory σ^E ani σ^M je srovnatelná s kontrolou nebo nižší. Tento výsledek je v nesouladu se studií Nakunst *et al.* (2007), ale potvrzuje výsledek publikovaný v práci Busche *et al.* (2012).

4.1.2.7.2. *In vitro* transkripční analýza promotoru *PtxB1*

Analýza promotoru *PtxB1* (60 nt) byla provedena analogicky v systému *in vitro* transkripce jako v předchozích případech.



Obrázek 27. *In vitro* transkripční analýza promotoru *PtxB1*. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje ~150 nt specifický transkript.

Na obrázku *in vitro* transkripce (Obr. 27) je vidět jediný silný signál specifického transkriptu reakční směsi s faktorem σ^H . Tento výsledek je zcela ve shodě s výsledkem *in vivo*.

Výsledky jak *in vivo*, tak *in vitro* se shodují v tom, že *PtxB1* je σ^H -dependentní, jak popsali Busche *et al.* (2012), avšak je to v rozporu s publikací Nakunst *et al.* (2007). Jelikož další σ^M -dependentní promotory zatím nebyly popsány (publikovány pouze 4 promotory v práci Nakunst *et al.* (2007), která však byla zpochybněna), nebylo možné funkčnost našich *in vivo* a *in vitro* detekčních systémů ověřit s jiným známým σ^M -dependentním promotorem.

Z výsledků vyplývá, že námi vyvinutý *in vivo* dvouplazmidový systém je vhodnou experimentální metodou pro přiřazení faktoru sigma k promotoru. Kombinací výsledků *in vivo* a *in vitro* analýz lze navíc dosáhnout jednoznačnějšího přiřazení faktoru sigma k promotoru, neboť jsou tak kompenzovány nevýhody samostatných analýz.

4.2. σ^H/σ^E -promiskuitní promotory

Skupina genů, jejichž exprese je ovládána určitým faktorem sigma je označována jako σ -regulon (též sigmulon). Jejich promotory rozeznávané příslušným holoenzymem RNAP+ σ tvoří třídu promotorů. Situace je ale složitější, když tentýž promotor spouští transkripci při alternativní účasti dvou nebo více faktorů sigma. V takovém případě patří příslušný gen do dvou a více regulonů a dochází tedy k překryvu regulonů. Jeho promotor označují v této práci jako promiskuitní.

První zmínka o existenci překryvu regulonů faktorů sigma byla popsána u faktorů σ^X/σ^W *B. subtilis* (Qiu a Helmann, 2001), později u faktorů $\sigma^E/\sigma^H/\sigma^L$ *M. tuberculosis*

(Dainese *et al.*, 2006), σ^{70}/σ^{32} a σ^{70}/σ^{38} *E. coli* (Wade *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2009) a σ^X/σ^M *B. subtilis* (Luo a Helmann, 2009). Předpoklad, že se jedná o obecnější jev u bakterií a že překryv regulonů se nachází i u *C. glutamicum*, potvrzuje i nalezení překryvu rozpoznávání promotorů genů *dnaK* (Pátek *et al.*, 2013), *clgR* a *dnaJ2* (Šilar *et al.*, 2016) faktory σ^E a σ^H . Detailnější analýze genů a promotorů řízených faktory σ^H a σ^E jsme se věnovali ve spolupráci s laboratoří na Univerzitě v Bielefeldu (J. Kalinowski a T. Busche). Nejprve bylo s použitím techniky DNA-čipů (*microarray*) nalezeno 83 σ^H -dependentních genů (Busche *et al.*, 2012). T. Busche pak sekvenoval RNA kmeny *C. glutamicum* $\Delta rshA$ a *C. glutamicum* $\Delta cseA$ (Busche, 2013). Na základě těchto experimentů bylo identifikováno 60 σ^H -dependentních genů (z toho 37 již známých), 3 σ^E -dependentní geny a 14 genů potenciálně transkribovaných za účasti σ^E nebo σ^H (Busche, 2013). Tak byly definovány stimulatory faktorů σ^E a σ^H , tedy skupiny genů, jejichž exprese je přímo nebo nepřímo řízena těmito faktory sigma. Rozhodli jsme se skutečné σ -regulony spolehlivě definovat analýzou příslušných promotorů s použitím metod *in vivo* a *in vitro* vyvinutých v naší laboratoři.

Ze stimulonů, které popsal Busche (2013), byly vybrány promotory genů zástupující všechny tři skupiny (σ^H -, σ^E - a σ^H/σ^E -dependentní) a dále dva promotory (*dnaK* a *clgR*; Pátek *et al.*, 2013, Šilar *et al.*, 2016) již dříve nalezené jako potenciálně promiskuitní (Tab. 10). Všechny tyto promotory byly analyzovány *in vivo* a *in vitro*.

Tabulka 10. Seznam vybraných promotorů na základě sekvenování RNA.

Gen	Promotorová sekvence ^a	σ ^b
<i>clpP1</i>	AGGCGGTTTCAT <u>GGA</u> AATACGCGGGTAGTCCGGTGAC <u>ATT</u> GAACCAA <u>A</u>	σ^H
<i>mca</i>	CGTTGGGTGTTT <u>GGA</u> ATGTTTCG--AAGCGCCTGATGC <u>GTT</u> GGATGGAGAG <u>G</u>	σ^H
<i>uvrD3</i>	TAACCGCTATCT <u>GGA</u> ATGATTG--ATAGCTCCCAAGT <u>GTT</u> GTTATCTATT <u>C</u>	σ^H
<i>mshC</i>	TTTTTGGTTTGT <u>GGA</u> ATAGGTG--CACTGGCGGCTT <u>GTT</u> GAAGTTTCAG <u>G</u>	σ^H
<i>sufR</i>	GGATTGGACACG <u>GGA</u> ATGGAAT-TAGGGAACACTTGT <u>GTT</u> GTCTAAAGGT <u>G</u>	σ^H
<i>trxB</i>	AAAGCAACTGAT <u>GGA</u> AGTTTTT--CAAAGTGTCTGAC <u>GTT</u> GAAAACGGT <u>G</u>	σ^H
<i>amtR</i>	GCCGCCTGCGGT <u>GGA</u> AACCTTAT-GAGGGTCTTCCTT <u>C</u> <u>GTT</u> GGACATGGT <u>G</u>	σ^E ^c
<i>cg1121</i>	TTCTCACGTGG <u>GGA</u> ACTATAC--TGATCCTTGATGC <u>GTT</u> AACTTGATT	σ^E
<i>cg3309</i>	CCTCCTCCCGT <u>GGA</u> ACTTTCC--TCTAACTAAGTGC <u>GTT</u> AAGGAAGGTA	σ^E
<i>cg0378</i>	TCCATTTACGAT <u>GGA</u> ACATTTT--TGAAGAATACCT <u>C</u> <u>GTT</u> GAATCTAGTG	σ^H/σ^E
<i>clgR</i>	CCAGGAAAACCG <u>GGA</u> ACAAATT--TTAGGGAAAGGGAG <u>T</u> GAACCTAAC <u>C</u>	σ^H/σ^E ^c
<i>sigB</i>	TAAAAGCGCTT <u>GGA</u> ACTTTTT--GTGGAAGCAGTCC <u>GTT</u> GAACCTCTT <u>G</u>	σ^H/σ^E
<i>dnaJ2</i>	ATGGACTACTCG <u>GGA</u> CAATTT-CTAAGGTGTCCGCC <u>GTT</u> GCTAAGTAT <u>G</u>	σ^H/σ^E ^c
<i>dnaK</i>	TTGAGTCTAGTT <u>GGA</u> CAACTT--TGTGGCATTTACC <u>GTT</u> GCTATATA <u>A</u>	σ^H/σ^E ^c
<i>cg3344</i>	TTACTTGATGCG <u>GGA</u> ACAAATT--TGAAGGTTTTTCA <u>GTT</u> GCTATAGGTA	σ^H/σ^E

^a Promotorové oblasti -35 a -10 a známé transkripční starty jsou označeny tučně a podtrženy.

Mezery byly přidány pro zarovnání klíčových promotorových oblastí.

^b Faktory sigma předběžně přiřazené podle výsledků sekvenování RNA (Busche, 2013).

^c Faktory sigma přiřazené již v práci Ehira *et al.*, 2009; Pátek *et al.*, 2013 a Šilar *et al.*, 2016.

4.2.1. Analýza aktivit promotorů

Z vybraných genů bylo metodami *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripční analýza) jednoznačně prokázáno 6 genů jako striktně σ^H -dependentních. Jako příklad zde uvádím výsledky získané těmito metodami s genem (promotorem) *sufR* (transkripční represor *suf* operonu). Výsledky analýzy dalších 5 genů, a to *trxB* (thioredoxinreduktáza), *clpP1* (podjednotka ATP-dependentní proteázy), *uvrD3* (RNA-helikáza nebo DNA I-helikáza), *mca* (předpokládaná mykotiolová S-konjugáčnická amidáza) a *mshC* (předpokládaná cystein-tRNA-syntetáza), byly také jednoznačné a velmi podobné.

Sekvenování RNA naznačovalo, že 3 geny jsou výhradně σ^E -dependentní: *cg1121* (permeáza), *cg3309* (předpokládaný sekreční protein) a *amtR* (transkripční represor metabolismu dusíku). Ve všech 3 případech analýzy *in vitro* i *in vivo* prokázaly, že promotory těchto genů jsou funkční s oběma faktory sigma. Proto byly tyto geny zařazeny do skupiny σ^H/σ^E -dependentních genů, kam patřily i všechny ostatní testované geny. Příslušné promotory tedy označujeme jako σ^H/σ^E -promiskuitní. V kapitolách 4.2.1.1. a 4.2.1.2. je popsán postup analýzy a vybrané typické výsledky.

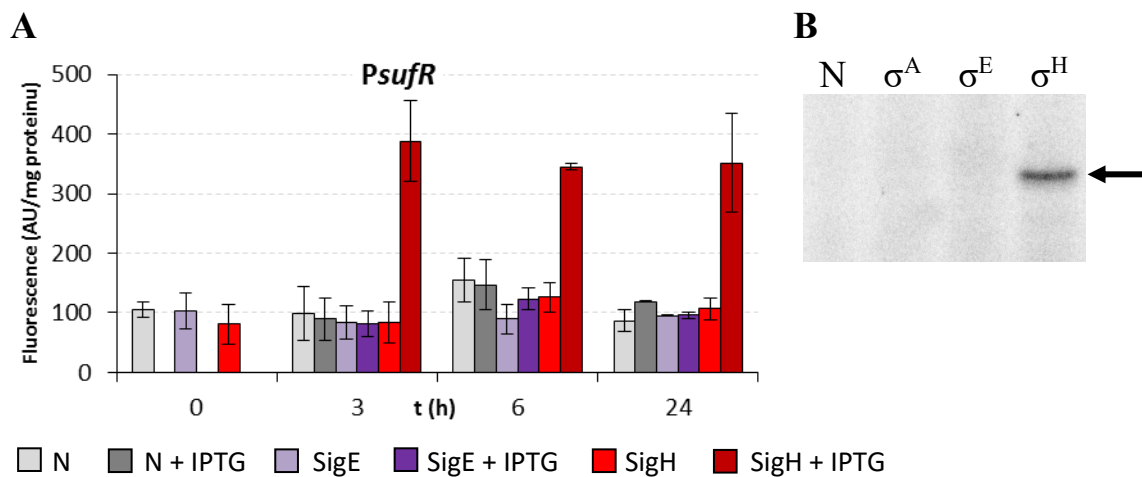
4.2.1.1. Konstrukce vektorů s promotory

Konstrukty promotorů genů *sufR*, *cg0378*, *cg1121*, *cg3309* a *cg3344* v promotor-test vektoru pEPR1 a ve vektoru pRLG770 pro *in vitro* transkripci byly připraveny pomocí PCR s použitím kombinací oligonukleotidů SUFRF a SUFRR; SUFRP770F a SUFRP770R; cg0378F a cg0378R; P0378770F a P0378770R; CG1121PEPR1F a CG1121PEPR1R; CG1121P770F a CG1121P770R; P3309F a PCG3309R; CG3309P770F a CG3309P770R; cg3344F a cg3344R; P3344770F a P3344770R. Analogické konstrukty promotorů genů *clgR* a *dnaK* byly připraveny v dřívějších projektech (Holátko *et al.*, 2012; Šilar *et al.*, 2016). Konstrukty ve vektoru pEPR1 byly vneseny transformací do kmene *C. glutamicum* nesoucího v expresním vektoru pEC-XT99A gen *sigE*, *sigH* nebo *sigM*. V takto vytvořených dvouplazmidových kmenech byla změřena aktivita promotorů. Faktory σ^A , σ^B , σ^C a σ^D nebyly použity z důvodu jejich vysoké specifity a odlišné konvenční sekvence. S faktorem σ^M se neprokázala žádná aktivita. Konstrukty pRLG770 posloužily jako templátová DNA pro přípravu PCR fragmentu do transkripční reakce *in vitro*.

4.2.1.2. *In vivo* a *in vitro* analýza promotorů

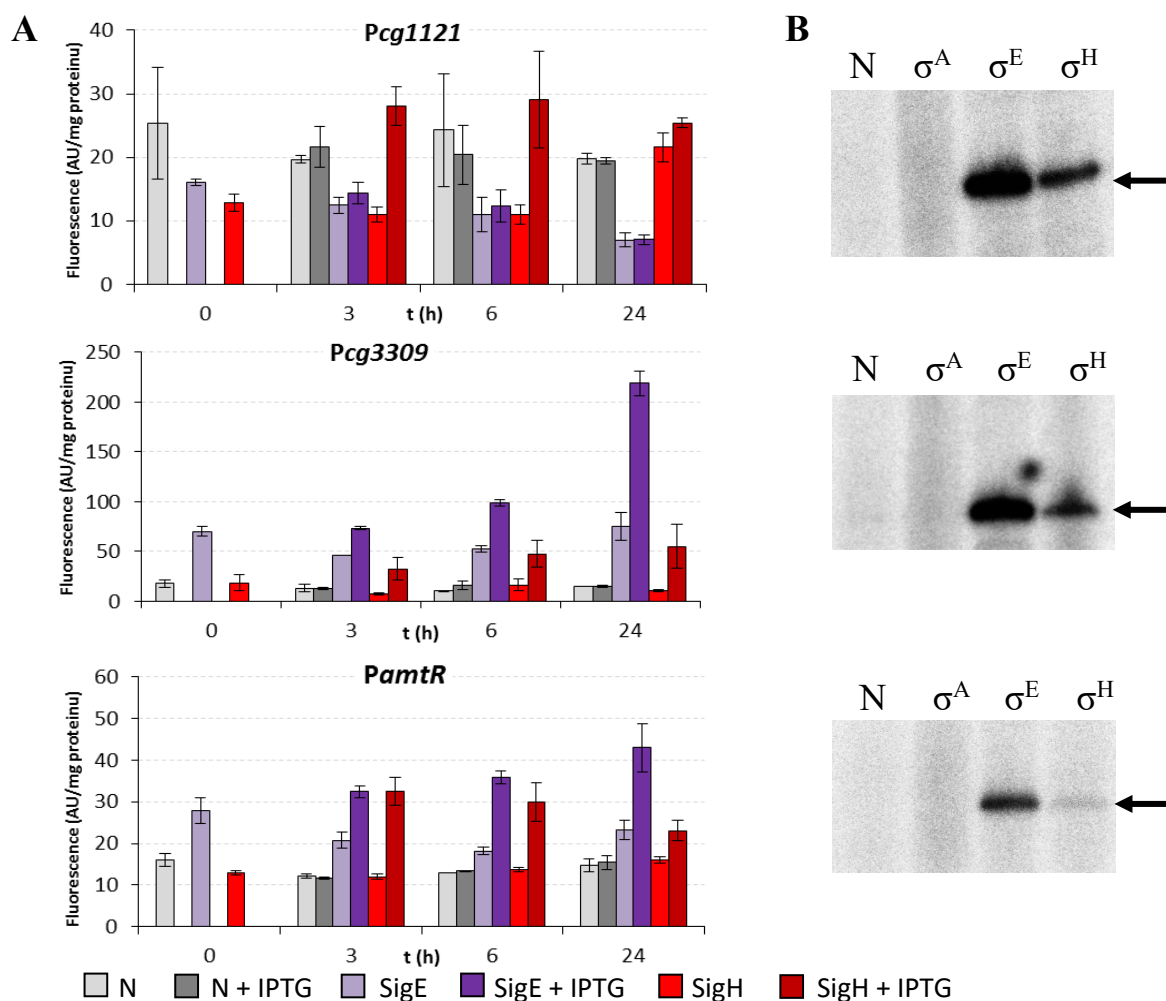
Aktivita vybraných promotorů byla měřena za standardních podmínek (30 °C) s počátkem kultivace $OD_{600} = 0,5$. Kultivace pokračovala do $OD_{600} = 1$, kdy proběhl odběr buněk označený jako 0 (před indukcí), po němž byla kultura rozdělena. První polovina sloužila jako kontrola bez indukce a do druhé byl přidán roztok IPTG (fin. konc. 1 mM). Další odběry probíhaly 3, 6 a 24 hodin po přidání IPTG. Vzorky byly zpracovány, jak je uvedeno v kapitole „Stanovení aktivity promotorů fluorimetricky“. Jako kontrola měření posloužil prázdný vektor pEC-XT99A. Do *in vitro* transkripční reakční směsi obsahující jádro RNA polymerázy byl alternativně přidán faktor σ^A , σ^E nebo σ^H a jako kontrola byla použita reakční směs bez přidaného faktoru sigma.

Jako první zde zmiňuji aktivitu promotoru genu *sufR* (Obr. 28A), který zde zastupuje všechny prokázané σ^H -dependentní promotory. Jeho aktivita se zvýšila pouze za nadprodukce σ^H , a to až 2,5x jak proti aktivitě bez nadprodukce σ^H , tak i proti aktivitě za nadprodukce ostatních faktorů sigma. Výsledek *in vitro* transkripční analýzy (Obr. 28B) ukazuje silný signál také pouze v reakční směsi se σ^H . Výsledky metod *in vivo* a *in vitro* jsou tedy zcela ve shodě, čímž prokazují funkčnost promotoru *PsufR* pouze s faktorem σ^H . Podobného výsledku (tj. závislosti funkce promotorů výhradně na σ^H) bylo dosaženo analýzami (*in vivo* i *in vitro*) promotorů genů *mca*, *uvrD3*, *mshC*, *clpP1* a *trxB* (bez dokumentace).



Obrázek 28. A) Aktivita σ^H -dependentního promotoru *PsufR* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Ve spodní části obrázku jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka. Výsledky jsou průměry tří nezávislých měření, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou. **B) *In vitro* transkripční analýza.** Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje specifický transkript (~150 nt).

Aktivita potenciálního výhradně σ^E -dependentního promotoru genu *cg3309* (podle výsledků sekvenování RNA) se v dvouplazmidovém systému zvýšila se σ^E téměř dvojnásobně se zvyšující se tendencí (Obr. 29A). S faktorem σ^H se aktivita promotoru také zvýšila téměř 2x, ale oproti aktivitě se σ^E byla ve 3. a 6. h poloviční a ve 24. h až třetinová. Na obrázku *in vitro* transkripční analýzy (Obr. 29B) je vidět silný signál se σ^E a přibližně 4,5x slabší signál se σ^H . Metody *in vivo* a *in vitro* tedy prokázaly, že tento promotor není výhradně σ^E -dependentní, ale patří mezi σ^H/σ^E -promiskuitní promotory.



Obrázek 29. A) Aktivita předpokládaných σ^E -dependentních promotorů (Busche, 2013) v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Ve spodní části obrázku jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka. B) *In vitro* transkripční analýza těchto genů. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje specifický transkript (~150 nt).

Aktivita dalšího potenciálního výhradně σ^E -dependentního promotoru *Pcg1121* (Obr. 29A) byla také jednoznačně zvýšena i za nadprodukce σ^H . Aktivita za nadprodukce σ^E byla zvýšena jen velmi slabě. Dochází zde ale k jevu, kdy jsou hodnoty aktivit za nadprodukce σ^E a σ^H na stejné či nižší úrovni aktivit kontroly bez faktoru sigma. Tento stav může být způsoben kompeticí faktorů sigma či dalšími důvody popsány v Diskuzi. Na obrázku č. 29B je zřejmý silný signál *in vitro* reakce se σ^E a 3,5x slabší signál reakční

směsi se σ^H (vyhodnoceno programem QuantityOne). Metodou *in vitro* byla prokázána σ^H/σ^E promiskuita promotoru *Pcg1121*, i když tento výsledek metoda *in vivo* nepotvrdila.

Aktivita posledního potenciálního výhradně σ^E -dependentního promotoru genu *amtR* se zvyšuje za nadprodukce σ^E s mírně se zvyšující tendencí, ale zároveň také za nadprodukce σ^H s klesající tendencí (Obr. 29A). *In vitro* transkripční analýza prokázala regulaci tohoto promotoru faktorem σ^E a 3x slaběji σ^H (Obr. 29B). Tyto výsledky řadí i tento promotor mezi σ^H/σ^E -promiskuitní.

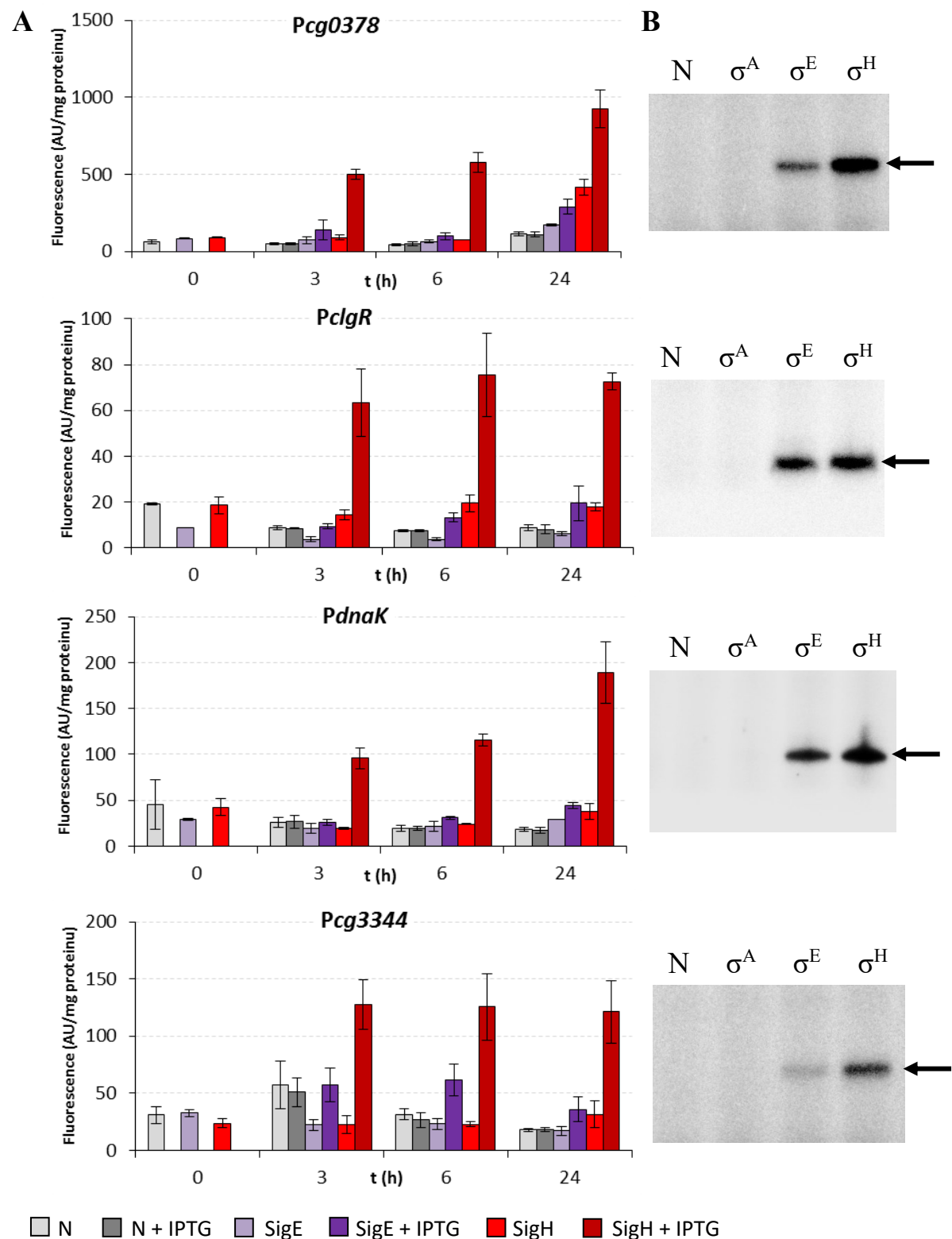
U všech dalších testovaných promotorů bylo prokázáno, že jsou σ^H/σ^E -promiskuitní. Aktivita potenciálního σ^H/σ^E -promiskuitního promotoru *Pcg0378* (Obr. 30A) se výrazně zvýšila za nadprodukce σ^H a přibližně třikrát méně za nadprodukce σ^E . Výsledek *in vitro* transkripční analýzy (Obr. 30B) ukazuje silný signál v reakční směsi se σ^H a přibližně 2,5x slabší signál v reakční směsi se σ^E . Výsledky metod *in vivo* a *in vitro* jsou zcela ve shodě, čímž prokazují u promotoru *Pcg0378* zjevnou σ^H/σ^E promiskuitu.

Aktivita následujícího σ^H/σ^E -promiskuitního promotoru genu *clgR* (Obr. 30A) se podstatně zvýšila za nadprodukce σ^H . Nadprodukce σ^E rovněž vedla ke zvýšení aktivity promotoru *PclgR*, ale její indukovaná úroveň dosáhla jen cca čtvrtinové hodnoty oproti hodnotě promotorů indukovaných σ^H . Výsledek však jasně prokazuje σ^H/σ^E promiskuitu tohoto promotoru. Na obrázku č. 30B jsou vidět silné signály reakčních směsí jak se σ^E tak i σ^H , přičemž oba signály jsou přibližně stejně intenzivní. Obě použité metody došly u promotoru *PclgR* ke shodnému výsledku, a to k promiskuitní regulaci faktory σ^E a σ^H .

Aktivita dalšího σ^H/σ^E -promiskuitního promotoru *PdnaK* je silně zvýšena po nadprodukci faktoru σ^H a slabě i faktoru σ^E , přičemž transkripce faktory σ^E a σ^H v čase mírně stoupají. Tento promotor je tedy hlavně regulován faktorem σ^H a přibližně 3x méně faktorem σ^E . Metodou *in vitro* transkripční analýzy (Obr. 30B) byla prokázána regulace promotoru *PdnaK* faktory σ^H i σ^E , přičemž faktorem σ^H je 2x silnější než se σ^E . Výsledky obou metod jsou opět zcela ve shodě a potvrzují, že tento promotor je σ^H/σ^E -promiskuitní.

Aktivita posledního zde dokumentovaného σ^H/σ^E -promiskuitního promotoru *Pcg3344* byla zvýšena za nadprodukce faktorů σ^E i σ^H (Obr. 30A), i když se σ^H je přibližně 3x silnější než se σ^E . Naměřené hodnoty tak jasně prokazují σ^H/σ^E promiskuitu u tohoto promotoru. *In vitro* transkripční analýza promotoru *Pcg3344* (Obr. 30B) ukazuje silný signál *in vitro* transkripce s faktorem σ^H a slabý signál v reakční směsi s faktorem σ^E , přičemž rozdíl mezi regulací faktorem σ^H a faktorem σ^E je více než dvojnásobný.

Metody *in vivo* a *in vitro* tedy i v tomto případě shodně prokázaly, že promotor *Pcg3344* je silněji ovládán σ^H a méně σ^E .



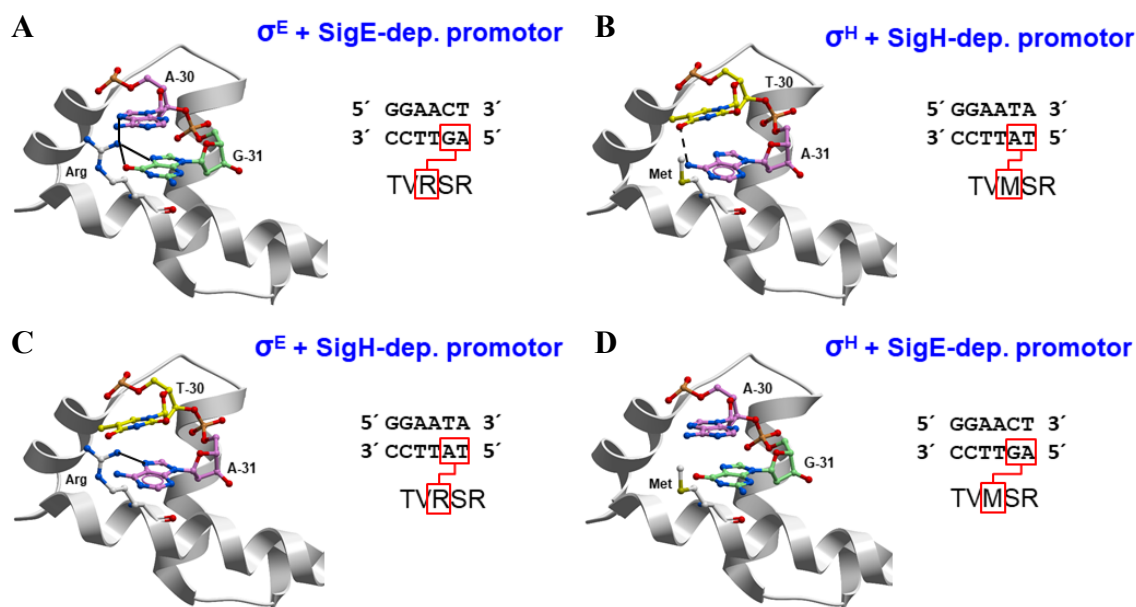
Obrázek 30. A) Aktivita σ^H/σ^E -promiskuitních promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Ve spodní části obrázku jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka. **B)** *In vitro* transkripční analýza těchto genů. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje specifický transkript (~150 nt).

Statistická analýza promotorových sekvencí zkoumaných genů (Tab. 10) ukazuje, že se sekvence σ^E - a σ^H/σ^E -dependentních promotorů (GGAAC-N₁₆₋₁₉-GTT) liší od konvenční sekvence σ^H -dependentních promotorů (g/tGGAA_t-N₁₆₋₁₉-t/cGTT_{gaa}) v pozici -31, kde mají σ^E -dependentní promotory cytosin. Lze tedy předpokládat, že nukleotidem v této pozici se liší konvenční sekvence σ^H - a σ^E -dependentních promotorů.

4.2.2. Homologní modelování

Ke zjištění, proč může docházet k překryvu promotorové specifity faktorů σ^E a σ^H a které nukleotidy promotoru a aminokyseliny faktoru σ jsou pro vazbu rozhodující, bylo použito počítačové modelování (Ivan Barvík, Fyzikální ústav MFF UK) vazby faktoru σ^E a σ^H na rozšířenou promotorovou oblast -35 σ^H - a σ^H/σ^E -dependentních promotorů. Toto homologní modelování bylo provedeno na základě známé struktury faktoru σ^E z *E. coli* (Lane a Darst, 2006).

Bylo zjištěno, že klíčovou aminokyselinou, která rozpoznává nukleotid na pozici -31, je arginin R185 faktoru σ^E a methionin M170 faktoru σ^H .



Obrázek 31. Rozpoznání nukleotidů v promotorových pozicích -31 a -30 faktory σ^E a σ^H . Světle modře jsou naznačeny interakce mezi nukleotidem promotoru v oblasti -35 a aminokyselinovým postranním řetězcem faktoru sigma. Protein faktoru sigma je znázorněn šedě, interagující aminokyselinové zbytky a nukleotidy na pozici -31 a -30 promotoru (nekódující vlákno) barevně (I. Barvík, Fyzikální ústav MFF UK).

Postranní řetězec argininu R185 faktoru σ^E se dostává do kontaktu s dinukleotidem GA v nekódujícím vlákne v pozici -31 a -30 σ^E -dependentního promotoru a tvoří tak tři stabilizující vodíkové vazby (Obr. 31A). Při vazbě faktoru σ^E na

σ^H -dependentní promotor se arginin R185 dostává do kontaktu s dinukleotidem AT (-31 a -30 nekódujícího vlákna), kde vzniká destabilizující interakce s metylovou skupinou thyminu (Obr. 31C), protože hydrofobní metylové skupiny thyminu v bezprostřední blízkosti hydrofilního postranního řetězce argininu brání jeho kontaktu s molekulami vody, což je energeticky nevýhodné. Slabá interakce R185 v σ^E s AT σ^H -dependentního promotoru může tak vzniknout pouze díky vodíkovému můstku mezi dusíkem argininu a dusíkem v -31A (Obr. 31C).

Postranní řetězec methioninu M170 v σ^H s bázemi nukleových kyselin tvoří vodíkové vazby. V případě interakce faktoru σ^H se σ^H -dependentním promotorem dochází ke stabilizující interakci při kontaktu hydrofobních metylových skupin postranního řetězce M170 a thyminu na pozici -30 (Obr. 31B). Při vazbě faktoru σ^H na σ^E -dependentní promotor v pozicích -31 a -30 se methionin dostává do kontaktu s dinukleotidem GA. Tyto molekuly ale nemohou tvořit stabilizující vodíkové vazby, naopak terminální metylová skupina methioninu brání molekulám vody v přístupu k bázím GA, což v konečném důsledku komplex destabilizuje (Obr. 31D).

Během posledních měsíců byly zveřejněny struktury otevřeného komplexu RNAP+promotor (RP_o), které ukazují na významnou úlohu nukleotidů promotoru v pozicích -29 až -27. Jako model posloužil komplex RP_o *E. coli* (Fang *et al.*, 2019) obsahující σ^E a DNA duplex (-35 GGAAC TTTT -27), který zcela odpovídá komplexu σ^E s konvenční sekvencí σ^E -dependentního promotoru *C. glutamicum*. DNA duplex tohoto σ^E modelu téměř odpovídá σ^H/σ^E -dependentnímu promotoru genu *cg3309*. Dalším modelem se stal komplex RP_o *M. tuberculosis* (Li *et al.*, 2019) obsahující σ^H a DNA duplex (-35 GGAACA -30), který odpovídá komplexu σ^H s konvenční sekvencí σ^H -dependentního promotoru *C. glutamicum*. DNA duplex tohoto σ^H modelu je podobný σ^H -dependentnímu promotoru genu *trxBI*.

4.2.3. Ověření *in silico* modelů metodou *in vivo*

Na základě výsledků homologního modelování byly navrženy mutace v σ^E a σ^H : klíčový methionin M170 ve faktoru σ^H byl zaměněn za arginin a naopak, R185 ve faktoru σ^E byl zaměněn za methionin (Obr. 32).

σ^H	MVVYADVEDLAYKEIAEIMDVPLGTV M SRLHRGRKQ
$\sigma^{H\text{ mut}}$	MVVYADVEDLAYKEIAEIMDVPLGTV R SRLHRGRKQ
σ^E	VAVILCDVVGMSVDEIAETLGVKMGTV R SRIHRGRSQ
$\sigma^{E\text{ mut}}$	VAVILCDVVGMSVDEIAETLGVKMGTV M SRIHRGRSQ

Obrázek 32. Uspořádání aminokyselinových sekvencí faktorů σ^H , $\sigma^{H\text{ mut}}$, σ^E a $\sigma^{E\text{ mut}}$, které interagují s pozicemi -31 a -30 promotorů. Aminokyselina interagující s těmito pozicemi je tučně. Záměny aminokyselin jsou zvýrazněny žlutě.

Podle dosavadních výsledků (Busche, 2013) byla konvenční sekvence σ^H -dependentních promotorů určena jako -35 GGAA^{T/G} a -10 GTT, zatímco u σ^H/σ^E -dependentních promotorů se nejčastěji vyskytovala sekvence -35 GGAAC a -10 GTT. Tento rozdíl jediného nukleotidu lze s využitím statistického vyhodnocení v oblasti -35 rozšířit na konvenční sekvence GGAA^{T/G}aaaa pro σ^H a GGAACtttt pro σ^E . Proto byly pro mutagenезi vybrány promotory *P_{trxB1}* (σ^H) a *P_{cg3309}* (σ^E), které se v oblasti -35 těmito sekvencím nejvíce blíží (Obr. 33).

Předběžné výsledky mutagenезe u promotoru *P_{1sigA}* naznačovaly, že klíčový rozdíl v konvenční sekvenci je na pozici -31, kde je vždy u promotorů rozpoznávaných faktorem σ^E přítomna báze cytosin (bez dokumentace). Faktor σ^H umožňoval transkripci alespoň do určité míry z promotoru, kde byl na pozici -31 kterýkoliv nukleotid, tedy GGAA**N**, i když nejvyšší aktivitu vykazovaly promotory s nukleotidem na pozici -31 T nebo G. Protože mutagenезe s použitím mutace jen v pozici -31 nebyla zcela přesvědčivá, provedli jsme na základě statistického odvození konvenční sekvence pro σ^E (GGAACtttt) mutagenезi 4-5 nukleotidů. Mutace v σ^H -dependentním promotoru genu *trxB1* a σ^E -dependentním promotoru genu *cg3309* byly navrženy tak, že byla navzájem vyměněna promotorová oblast -31 až -27 (Obr. 33) v očekávání, že se změní jejich rozpoznání faktorem sigma ze σ^H na σ^E (*P_{trxB1}mut*) a opačně (*P_{cg3309}mut*). Na této práci se částečně podílela studentka Anna Rita Coelho (Portugalsko), která byla v naší laboratoři na studijním pobytu.

	-35 -31 -27
<i>P_{trxB1}</i>	GGAA TA ACT
<i>P_{trxB1}mut</i>	GGAA CTTTC
<i>P_{cg3309}</i>	GGAA CTTTC
<i>P_{cg3309}mut</i>	GGAA TA ACT

Obrázek 33. Promotorové oblasti vybraných genů.

Promotorová oblast -31 až -27 je zvýrazněna tučně. Mutované nukleotidy jsou zvýrazněny žlutě.

4.2.3.1. Konstrukce vektorů s mutovanými faktory sigma

Konstrukty pEC-XT99A/*sigH*mut (M170→R) a pEC-XT99A/*sigE*mut (R185→M) nesoucí mutace ve faktorech sigma byly připraveny s použitím soupravy Q5[®] Site-Directed Mutagenesis umožňující cílenou mutagenezi (New England Biolabs) podle návodu dodaného výrobcem za použití kombinací oligonukleotidů (SIGHmutM-RF a SIGHmutM-RRa; SIGEmutR-MF a SIGEmutR-MR). Plazmidové konstrukty byly selektovány v *E. coli* a po ověření jejich nukleotidové sekvence byly transformací vneseny do *C. glutamicum* WT.

4.2.3.2. Konstrukce vektorů s mutovanými promotory

Konstrukty promotorů genů *trxB1* (336 nt), *cg3309* (275 nt) a mutovaných promotorů genů *trxB1* (80 nt) a *cg3309* (80 nt) byly připraveny pomocí PCR s použitím kombinací oligonukleotidů TRXB1F a TRXB1R; P3309F a PCG3309R; PTRXB1MUTEF a PTRXB1MUTER či PCG3309MUTHF a PCG3309MUTHR. Po naklonování fragmentů s promotory v *promoter-probe* vektoru pEPR1 a vnesením do kmene *C. glutamicum* nesoucího na expresním vektoru gen faktoru sigma *sigA*, *sigE*, *sigEmut*, *sigH* nebo *sigHmut* byla změřena jejich aktivita.

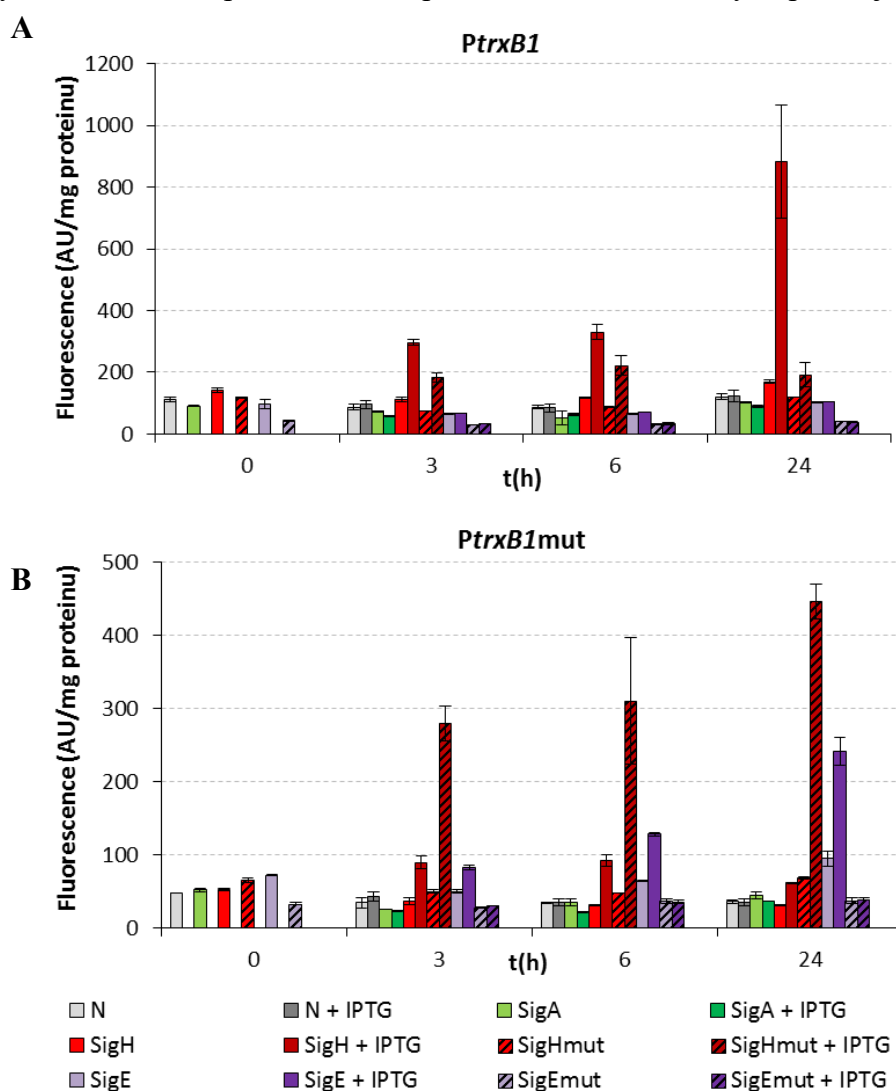
4.2.3.3. In vivo analýza dvouplazmidových systémů

Aktivita vybraných promotorů byla měřena za standardních podmínek kultivace buněk *C. glutamicum* (30 °C) s počátečním OD₆₀₀ = 0,5. Kultivace pokračovala do OD₆₀₀ = 1, kdy proběhl odběr buněk označený jako 0 (před indukcí), po němž byla kultura rozdělena. První polovina sloužila jako kontrola bez indukce a do druhé byl přidán induktor IPTG (fin. konc. 1 mM). Další odběry probíhaly 3, 6 a 24 hodin po přidání IPTG. Vzorky byly standardně zpracovány. Jako kontrola měření posloužil prázdný vektor pEC-XT99A.

Zástupce σ^H -dependentních promotorů *PtrxB1* (Obr. 34A) vykazoval vysokou aktivitu se σ^H a nulovou aktivitu se σ^E , zatímco s faktorem σ^{Hmut} došlo pouze k nižší aktivitě, i když ve 24. h dosti podstatné (4x slabší aktivita než s faktorem σ^H). Mutace aminokyseliny, která interaguje s oblastí -31 tedy není zcela rozhodující a faktor σ^{Hmut} stále do určité míry rozpoznává σ^H -dependentní promotor. Aktivita s faktorem σ^{Emut} , který měl být v klíčové aminokyselině identický se σ^H , nebyla zaznamenána, což znamená, že

mutace pouze této aminokyseliny interagující s oblastí -31 není schopna rozpoznávat promotor *PtrxB1*.

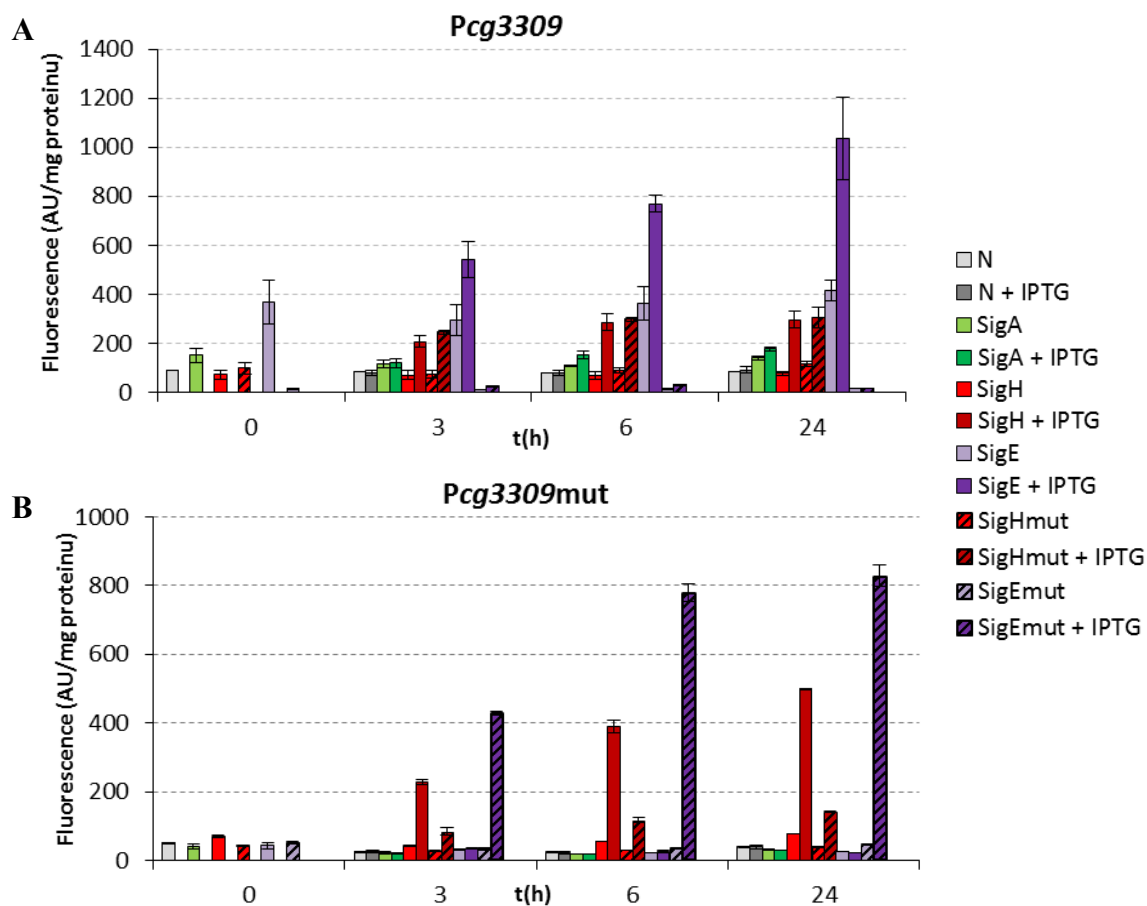
Aktivita mutovaného promotoru *PtrxB1* (Obr. 34B), u něhož se po mutaci v promotorové oblasti -31 až -27 předpokládalo, že bude spíše rozpoznán faktorem σ^E oproti původní σ^H , byla se standardní σ^H stále v určité míře zachována. Mutace oblasti -31 až -27 promotoru *PtrxB1* tedy úplně nepotlačila jeho rozpoznání faktorem σ^H . Aktivita promotoru *PtrxB1mut* se σ^{Hmut} se zvýšila 2,5x až 5x v závislosti na odběru vzorku (3. - 24. h) oproti aktivitě se standardní σ^H , což je v souladu s předpokladem. Mutace v tomto promotoru, která změnila jeho rozpoznání ze σ^H na σ^E , byla skutečně rozpoznána σ^E , jelikož s ním poskytla vysokou aktivitu. Naopak u *PtrxB1mut* s σ^{Emut} nebyla zaznamenána žádná aktivita. Výsledky mutace promotorové oblasti a faktoru sigma, které měly vést ke změně specifického rozpoznání ze σ^H na σ^E , tedy odpovídají předpokladu.



Obrázek 34. Aktivita promotoru *PtrxB1* a *PtrxB1mut* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících standardní a mutované faktory σ^E a σ^H . Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Dole jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka.

Promotor genu *pcg3309*, který zastupuje převážně σ^E -dependentní promotory, byl aktivní jak se σ^E , tak i podstatně slaběji se σ^H (Obr. 35A). Jeho aktivita se σ^{Hmut} se vůči standardnímu σ^H nezměnila, zatímco se σ^{Emut} aktivita prakticky vymizela. Mutace aminokyseliny interagující s oblastí -31 (M170→R) neměla tedy v případě promotoru *Pcg3309* na aktivitu se σ^H téměř žádný vliv, zatímco mutace R185→M funkčnost σ^E zcela odstranila.

Aktivita mutovaného promotoru *Pcg3309* se σ^H se výrazně zvýšila oproti aktivitě přirozeného promotoru (Obr. 35B), což koreluje s aktivitou přirozeného *Pcg3309* se σ^E (Obr. 35A). Naopak aktivita se σ^E zcela vymizela. Záměnou nukleotidů v pozicích -31 až -27 se tak převážně σ^E -dependentní promotor *Pcg3309* změnil na výhradně σ^H -dependentní. Zcela podle předpokladů aktivita *Pcg3309mut* + σ^{Emut} (Obr. 35B) byla téměř stejně vysoká jako aktivita přirozeného promotoru a faktoru sigma, tedy *Pcg3309* + σ^E (Obr. 35A, např. v 6. hodině).



Obrázek 35. Aktivita promotoru *Pcg3309* a *Pcg3309mut* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Dole jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka.

Na závěr studia σ^H/σ^E -promiskuitních promotorů lze konstatovat, že geny určené sekvenováním transkriptomu (Busche, 2013) jako σ^H - a σ^H/σ^E -dependentní byly metodami *in vivo* a *in vitro* potvrzeny, zatímco geny určené jako výhradně σ^E -dependentní (*amtR*, *cg1121* a *cg3309*) byly podle citlivějších analýz s využitím dvouplazmidového systému σ^H/σ^E -dependentní. Mutační analýza provedená na základě homologního modelování v podstatě potvrdila navrženou hypotézu o interakcích faktorů σ^H a σ^E s nukleotidy -31 a -30 σ^E - a σ^H -dependentních promotorů.

4.3. σ^D/σ^H -promiskuitní promotory

Zatímco u σ^H - a σ^E -dependentních promotorů byla již na začátku analýzy zřejmá jejich výrazná podobnost, u σ^D -dependentních promotorů jsme věděli, že jejich konvenční sekvence (Taniguchi *et al.*, 2017b a Toyoda a Inui, 2018) se liší od všech ostatních, a jelikož geny jimi řízené mají velmi specifické funkce, tak jsme ani zpočátku neočekávali překryv rozpoznání s jiným faktorem sigma. Naše detailní analýza σ^D -dependentních promotorů opět vycházela z výsledků sekvenování transkriptomů získaných na Univerzitě v Bielefeldu. Srovnáním exprese genů 3 typů kmenů *C. glutamicum*, a to divokého, nadexprimujícího *sigD* a delečního $\Delta sigD$ bylo pomocí sekvenování RNA identifikováno 29 potenciálních SigD-dependentních genů (Taniguchi *et al.*, 2017b). Z tohoto souboru jsme vybrali 11 genů, jejichž promotory vykazovaly výrazně konzervované klíčové oblasti (-35: GTAAC^{G/A}; -10: GAT; Tab. 11). Vybrané geny se účastní syntézy korynemykologických kyselin (*fadD2*, *cmt1*, *cmt2*, *cmt3*), uspořádání peptidoglykanu (*lppS*), inhibice aktivity faktoru σ^D (*rsdA*), energetického metabolismu (*lpd*) či mají hypotetickou funkci (*cg0420*, *cg0607*, *cg1056*, *cg2047*). Regulon faktoru σ^D se tedy účastní převážně odpovědi na povrchový stres, vyvolaný např. působením lysozymu (Toyoda a Inui, 2018) Promotorové oblasti těchto genů byly testovány metodami *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripční systém). Promotory genů *cg0420*, *cmt3* a *cg1056* byly těmito metodami prokázány jako skutečně výhradně σ^D -dependentní (bez dokumentace). U ostatních analýzy ukazovaly na slabou aktivitu také se σ^H .

Tabulka 11. Sekvence promotorů vybraných σ^D -dependentních genů.

Gen	Promotorová sekvence ^a
<i>cmt1</i>	GTAAAGCGCCTG <u>TTAACG</u> TAATAG-CTTGAAATATA <u>GAT</u> GTAAATTAAA
<i>cg0420</i>	TCTGAGCAGTTA <u>GAAACG</u> GTATGT-CGGTAGTAACC <u>GAT</u> ACGATTTATTG
<i>lpd</i>	TTCGGCAGAGTG <u>CTAACG</u> GTTAGG-CACTATTTTCC <u>GTT</u> AGTTCTTTTG
<i>cg0607</i>	GCGCGTTAATAA <u>GGAACA</u> ATATCG-GTGTGATTTCGC <u>GAT</u> ATATTAATCA
<i>rsdA</i>	TCAGCGATGGAA <u>GTAACA</u> GAGTTA-GGGAACCTTCTC <u>GAT</u> CTACTGAGTG
<i>cmt3</i>	TGGGGGAGGTT <u>GTTACA</u> AAACCATACGTCTGTGAA <u>GAT</u> ATGACG <u>AGTG</u>
<i>cg1056</i>	TTGACGACGCA <u>GTAACG</u> CAATCGGGGATTGTGGTC <u>GAT</u> TCTTTAAGCA
<i>cg2047</i>	TTTTTTAGTGAC <u>GTAACA</u> TCAAAG-AAGTATTCACT <u>GAT</u> GTAAAGTAGTG
<i>lppS</i>	GGCATTCTGGAC <u>GTAACG</u> CTCCGG-CATCTACAAGG <u>GAT</u> GATCAAAATA
<i>fadD2</i>	TAGTTTGCAAAA <u>GTAATA</u> AAATGT-TCATCTTTGTC <u>GAT</u> GGTCACAATA
<i>cmt2</i>	TGTCACAACCTTG <u>GTAACG</u> TGTGGG-CGGAAAAACAA <u>GAT</u> AGGCATCGAG

^a Sekvence promotorových oblastí -35 a -10 jsou spolu s transkripčním startem označeny tučně a podtrženy. Mezery byly přidány pro zarovnání klíčových elementů -35 a -10.

4.3.1. Konstrukce vektorů s promotory

Fragmenty s promotory genů *lpd*, *cg0607*, *rsdA*, *cg2047*, *lppS*, *fadD2* a *cmt2* byly připraveny pomocí PCR s použitím kombinací oligonukleotidů PCG0441UPF a PCG0441UPR; PCG0441UP770F a PCG0441UP770R; PCG0607F a PCG0607R; PCG0607P770F a PCG0607P770R; P1ADPEPRF a P1ADPEPRR; P1AD770F a P1AD770R; Pcg2047F a PCG2047R; PCG2047P770F a PCG2047P770R; PLPPSPEPRF a PLPPSPEPRR; PLPPS770F a PLPPS770R; PFADD2PEPRF a PFADD2PEPRR; PFADD2770F a PFADD2770R; PCMT2PEPRF a PCMT2PEPRR; PCMT2770F a PCMT2770R. Konstrukty ve vektoru pEPR1 byly vneseny transformací do kmene *C. glutamicum* nesoucího v expresním vektoru pEC-XT99A gen *sigD*, *sigE*, *sigH* nebo *sigM*. V takto vytvořených dvoupouzmidových kmenech byla změřena aktivita promotorů. Faktory σ^A , σ^B a σ^C nebyly použity z důvodu jejich vysoké specifity a zcela odlišné konvenční sekvence. S faktory σ^M a σ^E se neprokázala žádná aktivita. Konstrukty pRLG770 posloužily jako templátová DNA pro přípravu PCR fragmentu do transkripční reakce *in vitro*.

4.3.2. *In vivo* a *in vitro* analýza promotorů

Postup klonování a měření byl analogický postupu v kapitole 4.2.1.2. Aby byla zřejmá aktivita promotorů po indukci exprese *sigH*, která je výrazně nižší než se σ^D , jsou

v pravé části Obr. 36 a Obr. 37 pouze hodnoty se σ^H a kontrola (prázdný vektor pEC-XT99A).

Aktivita promotoru *PrsdA* (Obr. 36A) stanovená pomocí *in vivo* metody dvouplazmidového systému v čase stoupá za nadprodukce σ^D , ale také slabě za nadprodukce σ^H , takže promotor *PrsdA* je prokazatelně σ^D/σ^H -promiskuitní.

Pomocí techniky *in vivo* se aktivita promotoru genu *cg2047* (Obr. 36B) zvyšuje zdánlivě pouze za nadprodukce σ^D , ale po eliminaci těchto vysokých hodnot je zřejmé, že se zvyšuje se i ve 3. a 6. hodině za nadprodukce σ^H , byť mnohem slaběji než se σ^D . Lze tedy považovat promotor genu *cg2047* za σ^D/σ^H -promiskuitní.

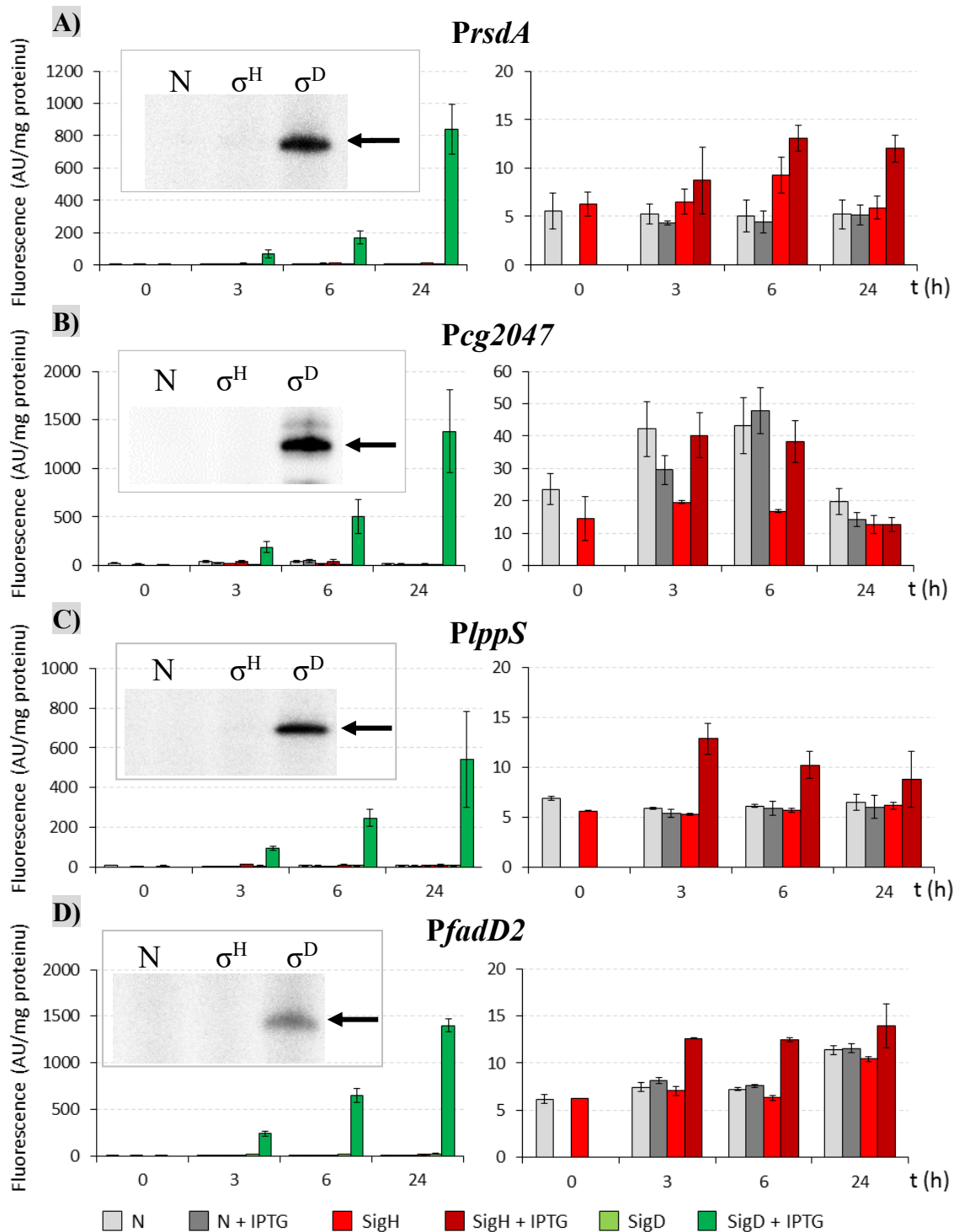
Aktivita promotoru genu *lppS* stoupá za nadprodukce σ^D a výrazně slaběji také se σ^H (Obr. 36C). Aktivita tohoto promotoru za nadprodukce σ^H v čase klesá, zatímco se σ^D stoupá. Přestože je aktivita se σ^H mnohem slabší než se σ^D , lze považovat promotor genu *lppS* rovněž za σ^D/σ^H -promiskuitní.

Aktivita promotoru genu *fadD2* *in vivo* se zvýšila za nadprodukce σ^D a velmi slabě i se σ^H (Obr. 36D), byť ve 24. hodině je již téměř nulová. I tento promotor tedy můžeme zařadit mezi σ^D/σ^H -promiskuitní.

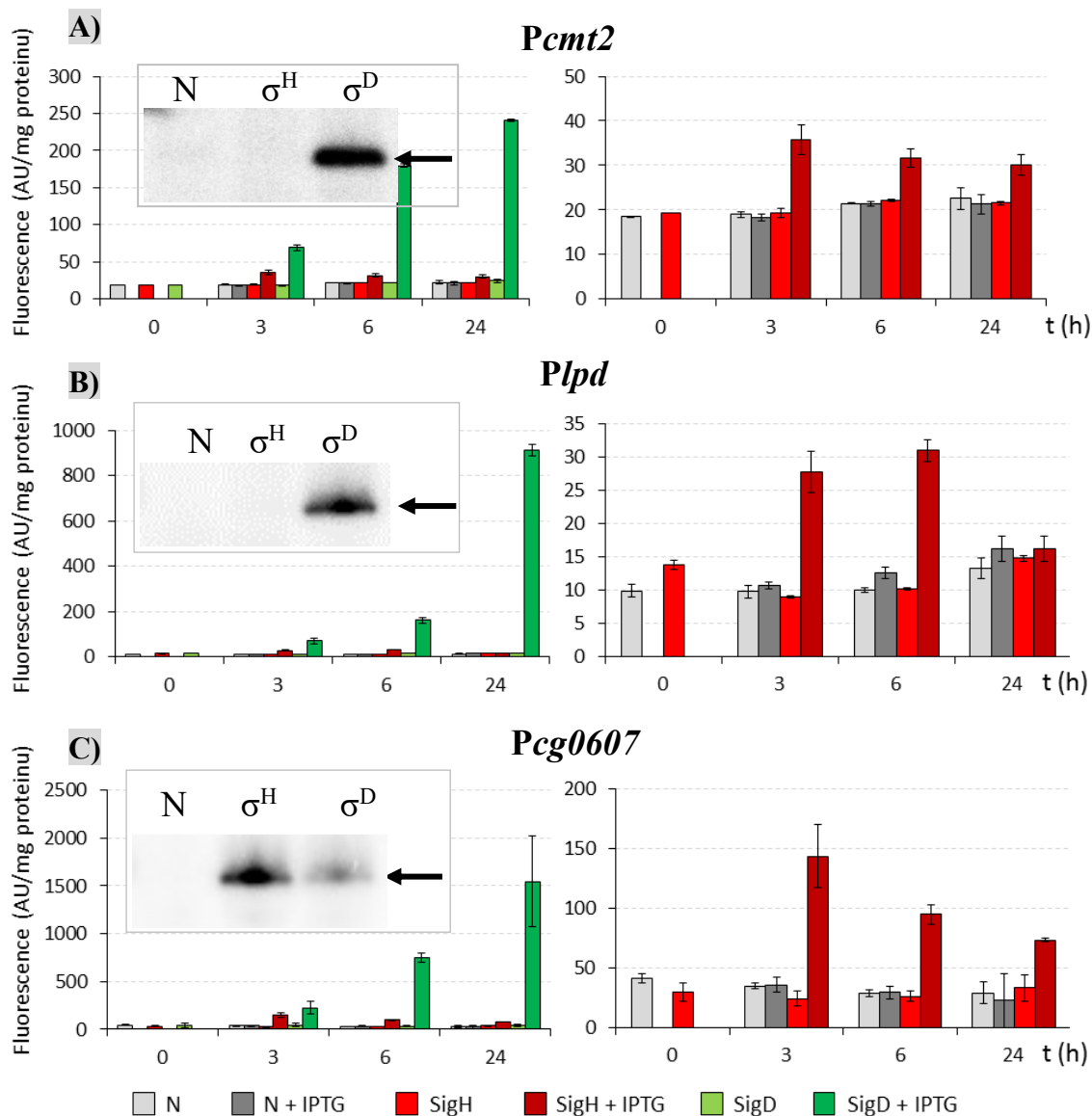
U promotoru genu *cmt2* (Obr. 37A) je vidět silná aktivita za nadprodukce σ^D a slabě i se σ^H , kdy rozdíl mezi aktivitami za nadprodukce σ^H a σ^D se v průběhu času zvětšuje (od 2x ve 3. h po 9x ve 24. h). Z výsledků *in vivo* lze považovat *Pcmt2* za σ^D/σ^H -promiskuitní.

Aktivita promotoru genu *lpd* (Obr. 37B) se silně zvyšuje za nadprodukce σ^D a slaběji za nadprodukce σ^H . V porovnání s hodnotou aktivity naměřenou se σ^D je však aktivita se σ^H násobně nižší a ve 24. hodině po indukci již v podstatě neměřitelná. I tak je promotor *Plpd* je σ^D/σ^H -promiskuitní.

Posledním vybraným promotorem byl promotor genu *cg0607*, jehož aktivita se prokazatelně zvyšuje za nadprodukce faktoru σ^D a slaběji za nadprodukce faktoru σ^H (Obr. 37C). Aktivita promotoru za nadprodukce σ^D a σ^H je ve 3. hodině po indukci téměř na stejné úrovni, ale v 6. hodině již σ^D převažuje přibližně 8x a v 24. hodině až 10x. Tento promotor je tedy prokazatelně σ^D/σ^H -promiskuitní.



Obrázek 36. Aktivita σ^D/σ^H -promiskuitních promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma σ^D , σ^H (vlevo) a σ^H (vpravo). Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Ve spodní části obrázku jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka. *In vitro* transkripční analýza (v boxu). Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje specifický transkript (~150 nt).



Obrázek 37. Aktivita σ^D/σ^H -promiskuitních promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory σ^D , σ^H (vlevo) a σ^H (vpravo). Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě testovaného promotoru. Ve spodní části obrázku jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka. ***In vitro* transkripční analýza (v boxu).** Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje specifický transkript (~150 nt).

U promotorů genů *cg2047*, *fadD2*, *cmt2* a *lpd* byl *in vitro* transkripční analýzou zaznamenán silný signál pouze se σ^D , zatímco u promotorů genů *lppS* a *rsdA* je na hranici viditelnosti i signál se σ^H (Obr. 36 a 37). Silný signál se σ^H byl zaznamenán s promotorem genu *cg0607*, který byl dokonce 2x silnější než se σ^D (Obr. 37C).

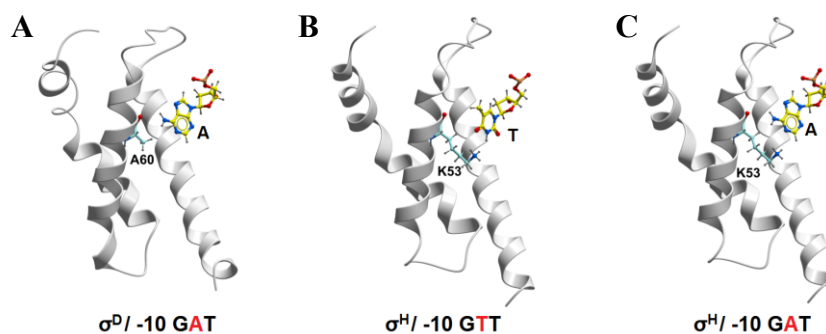
Rozdílné výsledky mezi *in vivo* a *in vitro* experimenty jsou pravděpodobně způsobeny tím, že metoda *in vitro* transkripce je méně citlivá než *in vivo* dvouplazmidový systém, který je schopný tyto slabé interakce zachytit.

4.3.3. Homologní modelování

Pro identifikování klíčové aminokyseliny, která je zodpovědná za rozpoznání odlišných nukleotidů (G nebo T) na druhé pozici konvenčních sekvencí oblasti -35 σ^H -dependentních (GGAA a GTT) a σ^D -dependentních (GTAAC a GAT) promotorů, a pro porozumění, proč je faktor σ^H za určitých podmínek schopen zahájit transkripci ze σ^D -dependentních promotorů, bylo použito počítačové modelování (I. Barvík, Fyzikální ústav MFF UK).

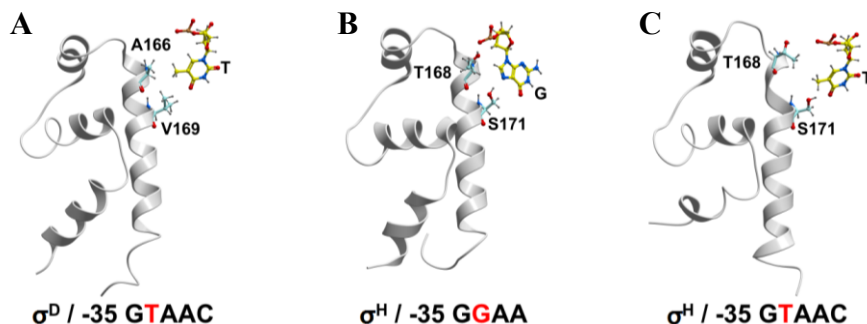
Jako první byly modelovány ty domény, které rozpoznávají σ^H - a σ^D -dependentní promotorové oblasti -10 a -35 (Obr. 38 a 39). Jako templát posloužila struktura krystalu proteinu σ^E *E. coli* navázaného na promotorovou oblast DNA (Lane a Darst, 2006; Campagne *et al.*, 2014), jelikož promotorová oblast rozpoznávaná tímto faktorem sigma je blízká konvenční sekvenci rozpoznávané faktorem σ^H v *C. glutamicum*. Pro ověření stability a věrohodnosti těchto modelů byla uvažována přítomnost molekul vody na povrchu proteinu a byla provedena 50-ns molekulárně-dynamická (MD) simulace.

Pro promotorovou oblast -10 nebyla dosud krystalová struktura komplexu RNAP s navázaným alternativním faktorem sigma a ani kompletní transkripční bublina DNA k dispozici. Klíčovým nukleotidem oblasti -10 je druhá pozice konvenční sekvence, která je v blízkém kontaktu s povrchem podjednotky σ v našem homologním modelu založeném na krystalové struktuře 4LUP faktoru σ^E *E. coli* (Obr. 38). Jako klíčová pro rozpoznání druhé pozice oblasti -10 se zdá být přítomnost alaninu A60 faktoru σ^D a lysinu K53 faktoru σ^H . Alanin A60 s krátkým postranním řetězcem tvoří prostor pro větší adenin na druhé pozici oblasti -10 σ^D -dependentních promotorů (Obr. 38A). Naopak lysin K53 s delším postranním řetězcem zaplňuje volný prostor vytvořený menším thyminem, který se nachází na druhé pozici oblasti -10 σ^H -dependentních promotorů (Obr. 38B).



Obrázek 38. Rozpoznání nukleotidu na druhé pozici konvenční sekvence oblasti -10 (uhlík žlutě; kyslík červeně; dusík modře; vodík bíle) aminokyselinami A60 faktoru σ^D a K53 faktoru σ^H (světle modře, uhlík). A) Vazba faktoru σ^D na σ^D -dependentní promotor. B) Vazba faktoru σ^H na σ^H -dependentní promotor. C) Vazba faktoru σ^H na σ^D -dependentní promotor. A = adenin, T = thymin.

Ukázalo se, že pro rozpoznání σ^D -dependentní oblasti -35 faktorem σ^D jsou rozhodující hydrofobní interakce metylové skupiny thyminu na druhé pozici konvenční sekvence -35 σ^D -dependentních promotorů s postranními řetězci valinu V169 a alaninu A166 faktoru σ^D (Obr. 39A). Nejdůležitější oblastí pro rozpoznání σ^H -dependentní oblasti -35 faktorem σ^H je vodíkový můstek s postranním řetězcem serinu S171, který se váže na druhou pozici konvenční sekvence σ^H -dependentních promotorů, přičemž vodíková vazba mezi hydroxylovou skupinou threoninu T168 a fosfátovou skupinou cukrofosfátové páteře DNA je další stabilizační interakcí (Obr. 39B).



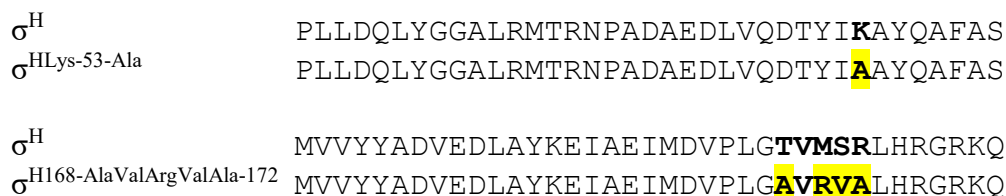
Obrázek 39. Rozpoznání nukleotidu na druhé pozici konvenční sekvence oblasti -35 (žlutě, uhlík) aminokyselinami A166 a V169 faktoru σ^D a aminokyselinami T168 a S171 faktoru σ^H (světle modře, uhlík). A) Vazba faktoru σ^D na σ^D -dependentní promotor. B) Vazba faktoru σ^H na σ^H -dependentní promotor. C) Vazba faktoru σ^H na σ^D -dependentní promotor. T = thymin. G = guanin.

Tyto modely (Obr. 38 a 39) následně posloužily k vysvětlení hypotézy, proč je faktor σ^H schopen rozpoznat σ^D -dependentní promotory.

Delší postranní řetězec lysinu K53 faktoru σ^H musí interagovat s větším adeninem na druhé pozici konvenční sekvence oblasti -10 σ^D -dependentních promotorů namísto kratšího postranního řetězce alaninu A60 faktoru σ^D , pokud vezmeme v úvahu možnost rozpoznání σ^D -dependentní promotorové oblasti -10 faktorem σ^H . Tato interakce je možná, protože postranní řetězec lysinu K53 je vysoce flexibilní, a proto pravděpodobně nebrání větší molekule adeninu (Obr. 38C). Na základě těchto poznatků byly navrženy mutanty faktoru σ^H (Obr. 40), a to tak, že se mutoval lysin K53 (σ^H) na alanin A53 (σ^D), který je pravděpodobně zodpovědný za rozpoznání druhé pozice promotorové oblasti -10.

Dále bylo zjištěno, že threonin T168 a serin S171 faktoru σ^H interaguje s thyminem na druhé pozici konvenční sekvence oblasti -35 σ^D -dependentních promotorů (Obr. 39C). To je umožněno tím, že postranní řetězec threoninu T168 je schopen rotace, takže jeho metylová skupina může být vázána hydrofobní interakcí s metylovou skupinou thyminu. Další interakci, a to vodíkový můstek, pak vytváří hydroxylová skupina postranního řetězce serinu S171 s atomem kyslíku thyminu. Proto další navrženou mutací byla záměna 168-ThrValMetSerArg-172 na 168-AlaValArgValAla-172, která je

pravděpodobně zodpovědná za rozpoznání druhé pozice promotorové oblasti -35. Tyto mutace se dále studovaly *in vivo*. Další možné mutace (mutace faktoru σ^D a další σ^H modifikace) jsou součástí navazujícího projektu a diplomové práce J. Blumensteina (2019).



Obrázek 40. Uspořádání aminokyselinových sekvencí faktorů σ^H , $\sigma^{\text{HLys-53-Ala}}$ a $\sigma^{\text{H168-AlaValArgValAla-172}}$. Oblasti vybrané pro mutaci jsou zvýrazněny tučně. Mutace aminokyselin jsou zvýrazněny žlutě.

4.3.4. Ověření *in silico* modelů metodou *in vivo*

4.3.4.1. Konstrukce plazmidů nesoucích mutovaný faktor σ^H

Konstrukty mutovaného faktoru σ^H pEC-XT99A/*sigHLys-53-Ala* a pEC-XT99A/*sigH168-AlaValArgValAla-172* (Obr. 40) byly připraveny soupravou Q5[®] Site-Directed Mutagenesis umožňující cílenou mutagenezi (New England Biolabs). Byly použity kombinace oligonukleotidů SIGHmutK-AF a SIGHmutK-AR; SIGHmutTMSR-ARVAF a SIGHmutTMSR-ARVAR. Ověřené konstrukty byly vneseny do *C. glutamicum* nesoucí *promoter-probe* vektor pEPR1 se σ^D -dependentními promotory genů *cg0607*, *cmt2*, *rsdA* nebo *lppS*.

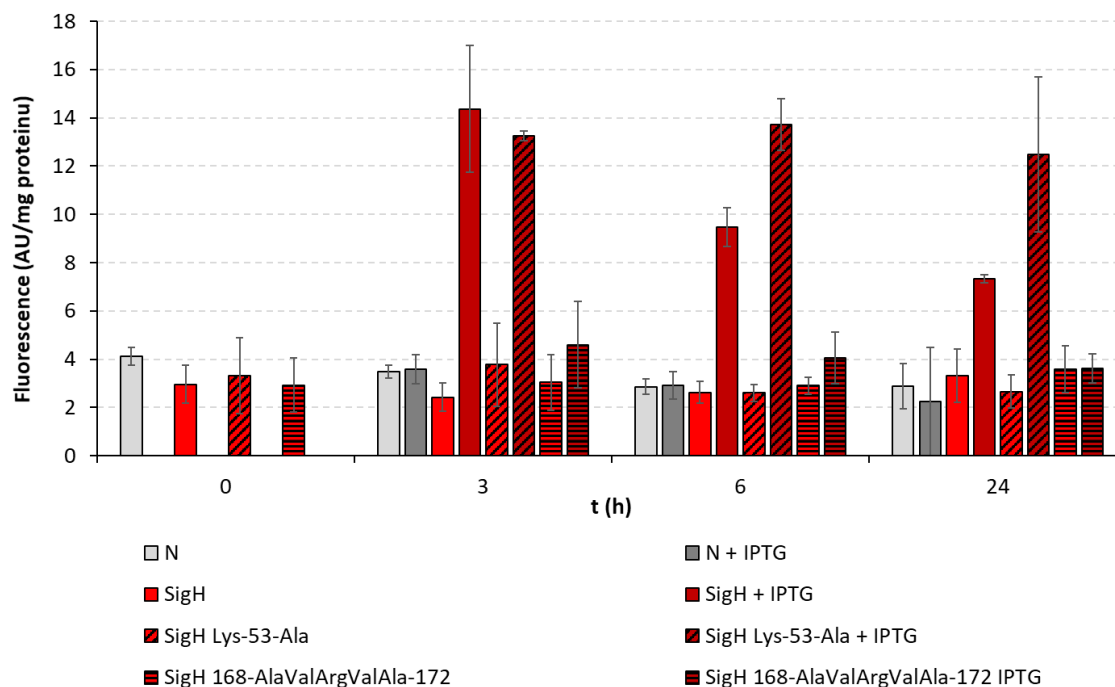
Předpokládali jsme, že nadprodukce $\sigma^{\text{HLys-53-Ala}}$ a $\sigma^{\text{H168-AlaValArgValAla-172}}$ zajistí vyšší aktivitu těchto vybraných promotorů než přirozený faktor σ^H . Tato domněnka byla ovšem zčásti potvrzena pouze v případě promotoru genu *cg0607*.

4.3.4.2. *In vivo* analýza dvouplazmidových systémů

4.3.4.2.1. Měření aktivity promotoru *Pcg0607*

Aktivita promotoru *Pcg0607* byla měřena za standardních podmínek kultivace buněk *C. glutamicum* (30 °C) s počátkem kultivace při OD₆₀₀ = 0,5. Kultivace pokračovala do OD₆₀₀ = 1, kdy proběhl odběr buněk označený jako 0 (před indukci), po němž byla kultura rozdělena. První polovina sloužila jako kontrola bez indukce a do druhé byl přidán induktor (IPTG). Další odběry probíhaly 3, 6 a 24 hodin po přidání

IPTG. Vzorky byly pak standardně zpracovány. Jako kontrola měření posloužil prázdný vektor pEC-XT99A.



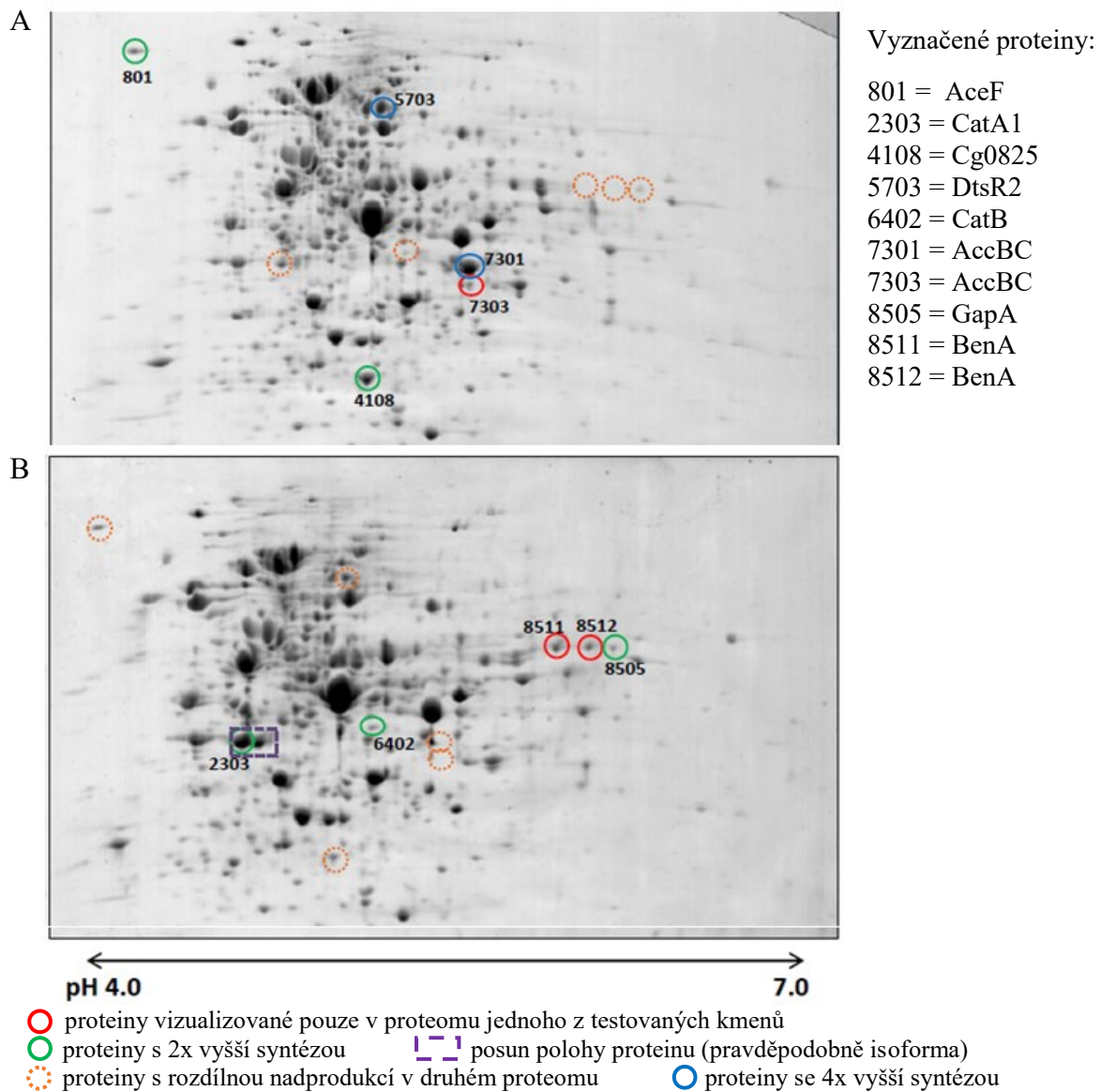
Obrázek 41. Aktivita promotoru *Pcg0607* v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě promotoru. Ve spodní části jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka.

Promotorová aktivita genu *cg0607* (Obr. 41) se za nadprodukce mutovaného faktoru $\sigma^{\text{HLys-53-Ala}}$ v 6. a 24. h zvýšila přibližně 1,5-1,7krát oproti nativní σ^{H} , avšak ve 3. h se aktivita promotoru po nadprodukcí σ^{H} či $\sigma^{\text{HLys-53-Ala}}$ prakticky nelišila. Naopak za nadprodukce mutovaného faktoru $\sigma^{\text{H168-AlaValArgValAla-172}}$ byla aktivita tohoto promotoru téměř nulová, tj. odpovídala bazální hodnotě fluorescence systému bez klonovaného genu kódujícího faktor sigma, a tedy mutace promotorové oblasti -35 faktoru σ^{H} byla nefunkční.

U některých σ^{D} -dependentních promotorů byla prokázána slabá aktivita také se σ^{H} , přestože se konvenční sekvence σ^{H} - a σ^{D} -dependentních promotorů velmi liší. Pomocí homologního modelování byla navržena hypotéza, proč se může i přes odlišnosti vázat σ^{H} na σ^{D} -dependentní promotor a opačně.

4.4. σ^H/σ^M -promiskuitní promotory

Geny a promotory řízené faktorem σ^M v *C. glutamicum* byly dosud popsány v jediné publikaci (Nakunst *et al.*, 2007). Konvenční sekvence těchto čtyř předpokládaných σ^M -dependentních promotorů byla téměř totožná se sekvencí σ^H -dependentních promotorů (-35 GGAAT, -10 GTTG). Tyto výsledky nebyly nikdy jinou studií potvrzeny a popsané promotory byly v dalších publikacích (Ehira *et al.*, 2009; Busche *et al.*, 2012) určeny jako σ^H -dependentní. Naše data získaná na základě detailních analýz *in vivo* a *in vitro* také naznačovala, že všechny promotory původně popsané jako σ^M -dependentní (Nakunst *et al.*, 2007) jsou rozeznávány pouze faktorem σ^H . Pro nalezení skutečně σ^M -dependentních promotorů jsme proto zvolili k tomuto účelu dosud nepoužitou metodu, a to analýzu proteomu. Dvourozměrná elektroforéza zobrazila proteomy divokého kmene *C. glutamicum* a kmene *C. glutamicum*, který nadexprimoval gen *sigM*. Jejich porovnáním byly objeveny proteiny ovlivněné nadexpresí genu *sigM*, a to CatA1 (katechol-1,2-dioxygenáza), CatB (chloromukonátcykloizomeráza), BenA (benzoát-1,2-dioxygenáza) a GapA (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) (Obr. 42, Tab. 12). Tyto proteiny byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie, MALDI (Ing. Petr Halada, Ph.D.; MBÚ). Rozhodli jsme se zkoumat promotory příslušných genů, abychom zjistili, zda jsou řízeny faktorem σ^M .

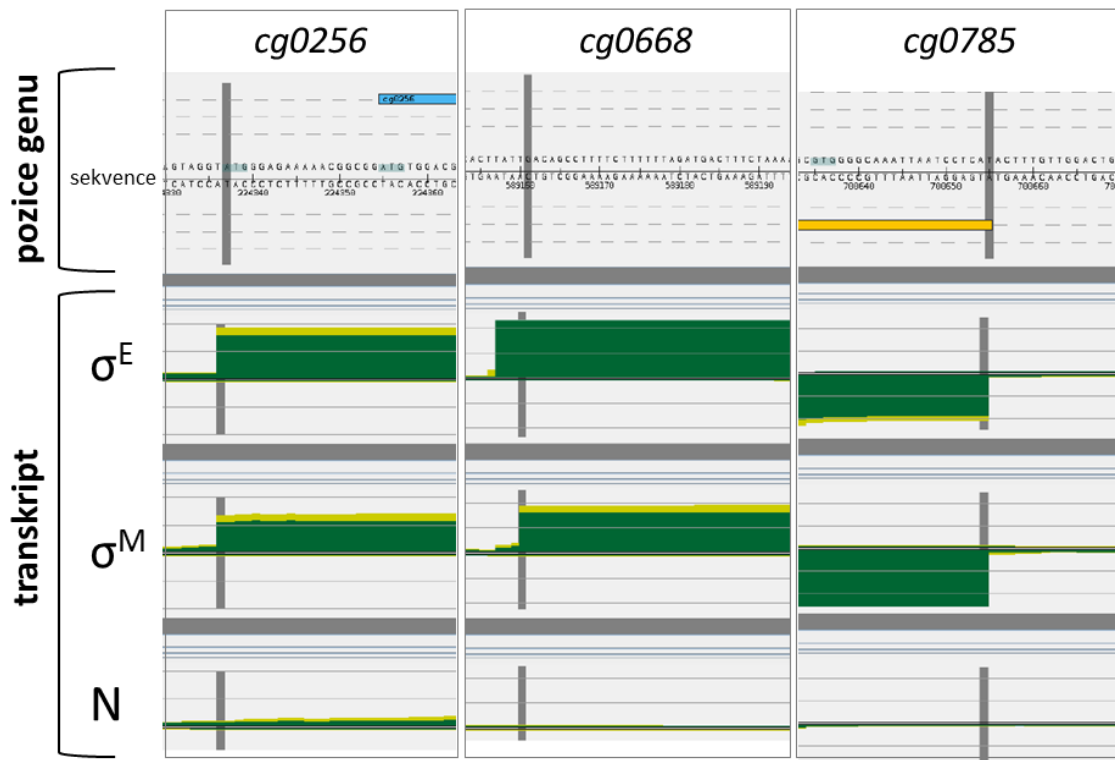


Obrázek 42. Dvourozměrná elektroforéza proteinů *C. glutamicum* WT (A) a *C. glutamicum* s nadexpresí genu *sigM* (B). Ve spodní části obrázku znázorněný gradient pH a legenda. Barveno koloidní coomassie blue. 1. rozměr IPG strip pH 4-7 lineární, 21 hodin fokusace, Multiphor II a 2. rozměr 12 % SDS-PAGE gel (RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D., MBÚ).

Jako další potenciálně σ^M -dependentní promotory byly vybrány promotory genů *sigM* z blízké příbuzných kmenů *Corynebacterium callunae* a *Corynebacterium deserti* (Tab. 12), u kterých byl předpoklad autoregulace genu *sigM*, jak je u bakterií časté, přestože u *C. glutamicum* tato autoregulace nebyla prokázána.

Kolegové z univerzity v Bielefeldu (Dr. Tobias Busche a Prof. Jörn Kalinowski) nedlouho poté identifikovali další potenciálně σ^M -dependentní promotory genů *cg0256* (konzervovaný hypotetický protein), *cg0668* (DNA segregační ATPáza rodiny FtsK/SpoIIIE) a *cg0785* (hypotetický protein) (Tab. 12) metodou ROSE (RNA sekvenování *in vitro* transkriptů; protokol metody nebyl dosud publikován) (Obr. 43). Jejich výsledky naznačovaly, že tyto geny jsou přepisovány za účasti faktoru σ^M , ale také

překvapivě faktoru σ^E . Oblasti -35 (GGGAACC) a -10 (GTCNAA) se u těchto 3 promotorů zcela shodovaly.



Obrázek 43. Výsledek analýzy sekvenování *in vitro* transkriptů (Tobias Busche, Bielefeld). V horní části obrázku je znázorněna pozice genu na sekvenci genomu (modře a oranžově). Transkripty jsou zobrazeny na horním nebo spodním vlákně DNA podle orientace genu. Šedý sloupec je společný pro oblast pozice genu a transkriptů a označuje bázi na sekvenci shodnou s počátkem transkriptu. Zelené sloupce zobrazují transkripty vzniklé z *in vitro* transkripce s příslušným faktorem (σ^E , σ^M) nebo bez faktoru sigma (N).

Tato nově definovaná konvenční sekvence byla použita k prohledání genomu *C. glutamicum*, kde byly nalezeny další dva potenciálně σ^M -dependentní geny (Tab. 12) *cg2322* (konzervovaný hypotetický protein) a *cg2534* (domnělý sekreční protein), u nichž byl potvrzen transkript metodou sekvenování RNA, kterou jsme použili pro jiný projekt u kmene *C. glutamicum*.

Promotory potenciálních σ^M -dependentních genů nalezené těmito různými přístupy (Tab. 12) byly testovány metodami *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripce) pro určení faktoru sigma řídícího jejich transkripci.

Během měření aktivit potenciálně σ^M -dependentních promotorů dvouplazmidovým systémem byl zjištěn neočekávaný jev: hodnoty specifické fluorescence byly přibližně stejně vysoké bez indukce i s indukcí (přídavek IPTG). Proto jsou pro přehlednost v grafech zobrazeny jen hodnoty extraktů získaných z indukovaných

buněk v porovnání s kontrolou, kterou byly extrakty buněk s prázdným vektorem (pEC-XT99A). Zároveň byl pro tento systém vybrán deleční kmen *C. glutamicum* $\Delta sigH$, a to z důvodu silné afinity faktoru σ^H k RNA polymeráze, což by mohlo blokovat vazbu dalších sledovaných faktorů σ^E a σ^M .

Tabulka 12. Promotorové sekvence vybraných potenciálně σ^M -dependentních genů.

Gen	Sekvence promotoru ^a
<i>Pcg0256</i>	GTTTTGCACCAACA <u>GGGAACC</u> TGG-AGCGCAGTTTCGGG <u>GTCTAA</u> GTAGGTA
<i>Pcg0668</i>	AATTTTCACATTCAA <u>GGGAACC</u> TTT-TGGCCGTTTTTCCAG <u>GTCAAA</u> CACTTAT
<i>Pcg0785</i>	AATTTGGGCTTGGA <u>GGGAACC</u> AAA-CGGCCACTTTTCCA <u>GTCCAA</u> CAAAGTA
<i>Pcg2322</i>	ATTTTCTAAAACCTC <u>GGGAACC</u> TTT-AGCCAACCTTTCAAG <u>GTCCAA</u> CCCTTTT
<i>Pcg2534</i>	TAATTTGAATTTTA <u>GGGAACC</u> TAC-CCCGAACTTTTGCA <u>GTCTAA</u> CGCTTAT
<i>PcatA1</i>	GAAGTGGGATTATGT <u>GGAAA</u> AATT--TATACTTCTAAAG <u>GTT</u> CCCTTATTGT
<i>PbenA</i>	CCCAGCAAACCCTA <u>GGAA</u> TTCCC--CTAATGTGATTCA <u>CTT</u> CATTGATCGG
<i>PsigM</i> <i>C. callunae</i>	CCAGCTGCCTTGTTT <u>GAAAA</u> AACGAGGCAGCTGGTTTTT <u>GTT</u> AATTCAGGTG
<i>PsigM</i> <i>C. deserti</i>	CACACATTCAGAAGA <u>GGAA</u> CTGAC-AGTTATGCTCTGTG <u>GTT</u> AGACCCCTGT

^a Promotorové oblasti -35 a -10 jsou označeny tučně a podtrženy. Mezery byly přidány pro zarovnání promotorových oblastí.

4.4.1. Konstrukce vektorů s promotory

Konstrukty promotorů genů *cg0256*, *cg0668*, *cg0785*, *cg2322*, *cg2534*, *catA1*, *benA*, *sigM* *C. callunae* a *sigM* *C. deserti* byly připraveny pomocí PCR s použitím kombinací oligonukleotidů PCG0256PEPRF a PCG0256PEPRR; PCG0256P770F a PCG0256P770R; PCG0668PEPRFN a PCG0668PEPRRN; PCG0668P770FN a PCG0668P770RN; PCG0785PEPRF a PCG0785PEPRR; PCG0785P770F a PCG0785P770R; PCG2322PEPRF a PCG2322PEPRR; PCG2322P770F a PCG2322P770R; PCG2534PEPRF a PCG2534PEPRR; PCG2534P770F a PCG2534P770R; PCATA1NEWF a PCATA1NEWR; PCATA1770F a PCATA1770R; PBENANEWF a PBENANEWR; PBENA770F a PBENA770R; PSIGMCCF a PSIGMCCR; PSIGMCC770F a PSIGMCC770R; PSIGMCD770F a PSIGMCD770R. Po naklonování v *promoter-probe* vektoru pEPR1 a vnesení transformací do kmene *C. glutamicum* $\Delta sigH$ nesoucího na expresním vektoru gen faktoru sigma *sigH*, *sigE* nebo *sigM* byla změřena jejich aktivita. Faktory σ^A , σ^B a σ^C nebyly použity z důvodu jejich vysoké specifity a zcela odlišné konvenční sekvence.

Konstrukty pRLG770 posloužily jako templátová DNA pro přípravu PCR fragmentu do transkripční reakce *in vitro*.

4.4.2. *In vivo* a *in vitro* analýza promotorů

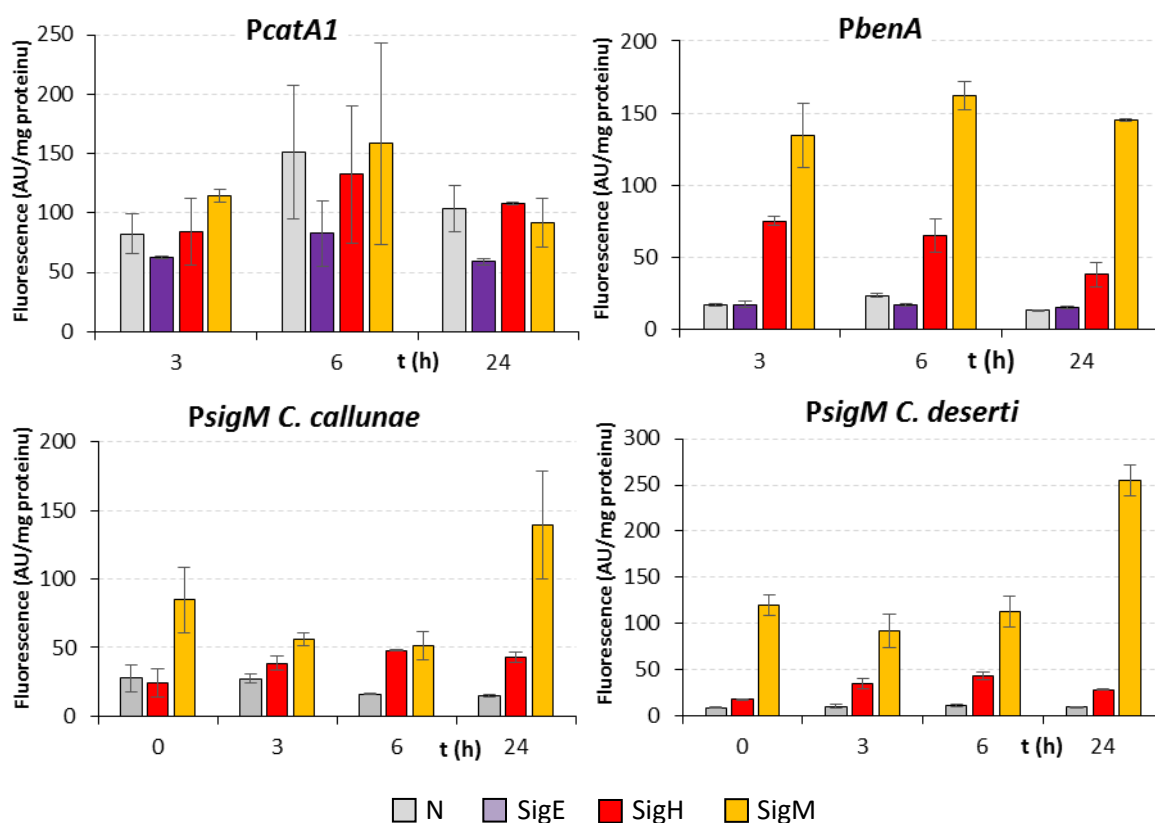
Aktivita potenciálně σ^M -dependentních promotorů byla měřena za standardních podmínek (30 °C) s počátkem kultivace $OD_{600} = 0,5$. Kultivace pokračovala do $OD_{600} = 1$, kdy proběhl odběr buněk označený jako 0 (před indukcí), po němž byla kultura rozdělena. První polovina sloužila jako kontrola bez indukce a do druhé byl přidán roztok IPTG (fin. konc. 1 mM). Další odběry probíhaly 3, 6 a 24 hodin po přidání IPTG. Vzorky byly zpracovány, jak je uvedeno v kapitole „Stanovení aktivity promotorů fluorometricky“. Jako kontrola měření posloužil prázdný vektor pEC-XT99A. Pro měření *in vitro* transkripce byl do reakční směsi obsahující jádro RNA polymerázy alternativně přidán faktor σ^A , σ^E , σ^H nebo σ^M a jako kontrola byla použita reakční směs bez přidaného faktoru sigma.

Jako první byla měřena aktivita promotoru *PcatA1* v dvouplazmidovém systému (Obr. 44), kde je patrná nečekaně vysoká aktivita u kmene s prázdným vektorem, kterou se nepodařilo objasnit. U ostatních měření totiž aktivita v buňkách s prázdným vektorem nepřekročila 50 AU/mg proteinu. Z vynesných hodnot tak nelze jasně říci, zda dochází ke zvýšené aktivitě promotoru *PcatA1* za nadprodukce σ^E , σ^H či σ^M . Pokud by se však porovnávaly hodnoty aktivit vůči běžně naměřené hodnotě prázdného vektoru, prokázala by se zvýšená aktivita promotoru za nadprodukce faktoru σ^M , σ^H a slabě i σ^E . Po *in vitro* transkripci nebyl zaznamenán signál specifického transkriptu ani v jedné reakční směsi. Jelikož však geny *catA1* a *benA* sdílejí společnou mezigenovou oblast, je zřejmě nutná přítomnost nějakého aktivátoru transkripce, který v reakční směsi nebyl přítomen. Metody *in vivo* a *in vitro* nedokázaly jednoznačně přiřadit regulující faktor sigma k promotoru *PcatA1*, ale metoda dvouplazmidového systému ukázala možnou regulaci tohoto promotoru faktory σ^H a σ^M .

Dalším vybraným potenciálním σ^M -dependentním promotorem byl promotor genu *benA*, u něhož se *in vivo* prokázala zvýšená aktivita (Obr. 44) za nadprodukce σ^M a σ^H . Aktivita se σ^H v průběhu kultivace klesá. Transkripce *in vitro* neposkytla signál specifického transkriptu ani v jedné reakční směsi. To může být opět způsobeno nepřítomností aktivátoru transkripce. Metoda *in vivo* prokázala regulaci promotoru *PbenA* faktorem σ^M a slaběji i σ^H , což naznačuje, že se jedná o promiskuitní σ^H/σ^M promotor.

V dvouplazmidovém systému byla zaznamenána zvýšená aktivita promotoru *PsigM* z kmene *C. callunae* za nadprodukce σ^M a σ^H (Obr. 44). Aktivita promotoru se σ^H je průměrně 3x nižší než se σ^M . Při testech transkripce *in vitro* nebyl zaznamenán signál specifického transkriptu ani v jedné reakční směsi. Gen *sigM* z kmene *C. callunae* je tedy pravděpodobně regulován σ^M a σ^H , i když tento výsledek nebyl potvrzen *in vitro* transkripcí.

Promotor *PsigM* z kmene *C. deserti* (Obr. 44) vykazuje podobné vlastnosti jako *PsigM* z *C. callunae*. Jeho aktivita se zvýšila za nadprodukce σ^M a slaběji za nadprodukce σ^H . S faktorem σ^H v čase spíše klesá a se σ^M stoupá. *In vitro* transkripce opět neposkytla žádný signál specifického transkriptu ani v jedné reakční směsi. Promotor *PsigM* z kmene *C. deserti* je podle metody *in vivo* pravděpodobně regulován σ^M a σ^H , i když metoda *in vitro* tuto skutečnost nepotvrdila.



Obrázek 44. Aktivita předpokládaných σ^M -dependentních promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu, která je úměrná aktivitě promotoru. Ve spodní části jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka.

Dalšími testovanými promotory byly *Pcg0256*, *Pcg0668* a *Pcg0785* (Tab. 12). Tato trojice promotorů byla navržena na základě výsledků sekvenování *in vitro* transkriptů na partnerském pracovišti (Univerzita Bielefeld). Z grafu měření aktivity promotoru *Pcg0256* (Obr. 45A) vyplývá, že ke zvýšení aktivity docházelo za nadprodukce všech použitých faktorů, tedy σ^E , σ^H a σ^M . Jedná se tedy pravděpodobně o $\sigma^E/\sigma^H/\sigma^M$ promiskuitní promotor. Aktivita promotoru s faktorem σ^E je nejvyšší ve 3. hodině, v 6. hodině klesá až o polovinu a v 24. hodině již aktivita není zaznamenána. Aktivita promotoru se σ^H také klesá v čase, avšak ve 3. a 6. hodině je aktivita vyšší než se σ^M , zatímco v 24. hodině klesá na polovinu aktivity se σ^M . Z výsledku lze odvodit, že faktor σ^H se účastní regulace promotoru *Pcg0256* spíše během exponenciální fáze růstu, zatímco σ^M spouští transkripci z promotoru *Pcg0256* v podstatě nezávisle na růstové fázi.

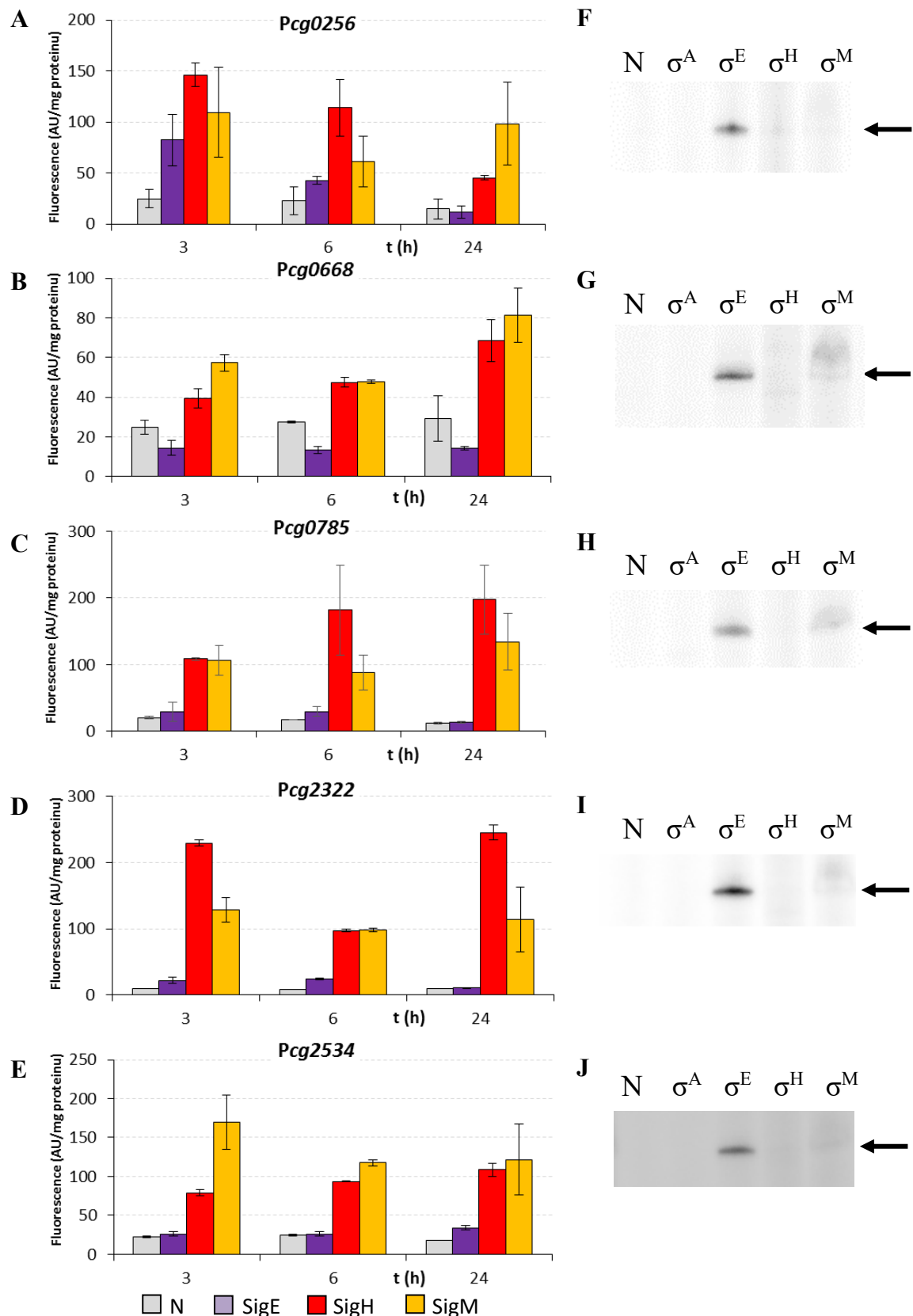
Metodou *in vitro* transkripce (Obr. 45F) byl zaznamenán signál specifického transkriptu v reakční směsi pouze s faktorem sigma σ^E , zatímco s faktory σ^H a σ^M nebyl jednoznačný signál prokázán. Kombinací metod *in vivo* a *in vitro* lze potvrdit regulaci promotoru *Pcg0256* faktorem σ^E , ale nikoli $\sigma^E/\sigma^H/\sigma^M$ promiskuitu promotoru. Regulaci řízenou faktory σ^H a σ^M se tedy podařilo prokázat pouze metodou *in vivo*. Metoda ROSE německých kolegů však již potvrdila aktivaci tohoto promotoru faktory σ^E a σ^M , a lze tedy předpokládat, že přinejmenším faktory σ^E a σ^M mohou spouštět transkripci z tohoto promotoru. Rozeznání jednoho promotoru všemi třemi faktory sigma - σ^E , σ^H a σ^M by však vzhledem k jejich dosud definovaným konvenčním sekvencím nebylo překvapivím: σ^H (-35 GGAA^{T/G}, -10 GTT), σ^E (-35 GGAAC, -10 GTT), σ^M (-35 GGGAAC, -10 GT^{C/T}).

Na obrázku 45B je zřejmá aktivita promotoru *Pcg0668* se σ^H a σ^M při měření *in vivo*. Na rozdíl od předchozích σ^M -dependentních promotorů, aktivita s faktorem σ^H dosahuje téměř stejných hodnot jako se σ^M a neklesá v čase. Aktivita promotoru nebyla se σ^E zaznamenána. Na obrázku 45G je však patrný jasný signál specifického transkriptu *in vitro* s faktorem σ^E , zatímco s faktorem σ^M je vidět jen velmi slabý pás. Nad tím je patrný široký difuzní signál, jehož původ není zřejmý. Tento specifický transkripční „dvojsignál“ se sice vysvětlit nepodařilo, ale šlo nejen o opakovaný, ale snad obecnější jev, neboť difuzní signál v dráze s faktorem σ^M se vyskytl i u *in vitro* transkripce s následujícími promotory. *In vivo* metodou byla tedy prokázána aktivita promotoru *Pcg0668* s faktory σ^H a σ^M , zatímco metodou *in vitro* byla zjištěna aktivita s faktorem σ^E a slabě též s faktorem σ^M . Metodou ROSE, která také zahrnuje *in vitro* transkripci

(Univerzita Bielefeld), byla však rovněž prokázána regulace faktory σ^E a σ^M . Jedná se tak pravděpodobně o promiskuitní promotor σ^H/σ^M nebo σ^E/σ^M či dokonce $\sigma^E/\sigma^H/\sigma^M$.

Velmi podobná je situace s promotory *Pcg0785*, *Pcg2322* a *Pcg2534*. Transkript spouštěný promotorem *Pcg0785* po reakci *in vitro* s RNAP a faktory σ^M a σ^E byl detekován metodou ROSE (tak jako u *Pcg0256* a *Pcg0668*), zatímco *Pcg2322* a *Pcg2534* byly identifikovány v sekvenci genomu *C. glutamicum* podle přítomnosti motivů -35 GGGAACC a -10 GTCNAA, které byly shodně nalezeny u předchozích promotorů detekovaných metodou ROSE. Všechny tři promotory *Pcg0785*, *Pcg2322* a *Pcg2534* byly *in vivo* do různé míry aktivní s faktory σ^M a σ^H (Obr. 45C, D, E), zatímco při transkripci *in vitro* silný signál specifického transkriptu poskytovala pouze reakce RNAP+ σ^E a velmi slabý RNAP+ σ^M (s doprovodným difuzním signálem v oblasti vyšších velikostí RNA). O vysvětlení tohoto rozporu lze spekulovat.

Výsledky s předpokládanými σ^M -dependentními promotory lze shrnout: Všechny objevené potenciální σ^M -dependentní geny byly metodou *in vivo* charakterizovány jako σ^M - a σ^H -dependentní a pouze jeden gen (*cg0256*) také σ^E -dependentní. Metodou *in vitro* transkripce byly tyto geny charakterizovány jako σ^E -dependentní a u všech promotorů byl zaznamenán také slabý až nepatrný signál se σ^M . U promotoru *cg0256* je zřejmý i slabý signál v přítomnosti σ^H (Obr. 45F). V tomto případě jsou tedy metody *in vivo* a *in vitro* v souladu a promotor lze považovat za $\sigma^E/\sigma^H/\sigma^M$ -dependentní. U genů *catA1*, *benA*, *PsigM C. callunae* a *PsigM C. deserti* nebyl *in vitro* zaznamenán žádný signál.



Obrázek 45. A-E) Aktivita σ^H/σ^M -promiskuitních promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genů kódujících faktory sigma. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence. Ve spodní části obrázku jsou uvedeny nadprodukované faktory sigma. AU=arbitrární jednotka. F-J) *In vitro* transkripční analýza těchto genů. Jednotlivé faktory sigma navázané na RNA polymerázu jsou uvedeny v horní části obrázku. Šipka označuje specifický transkript (~150 nt).

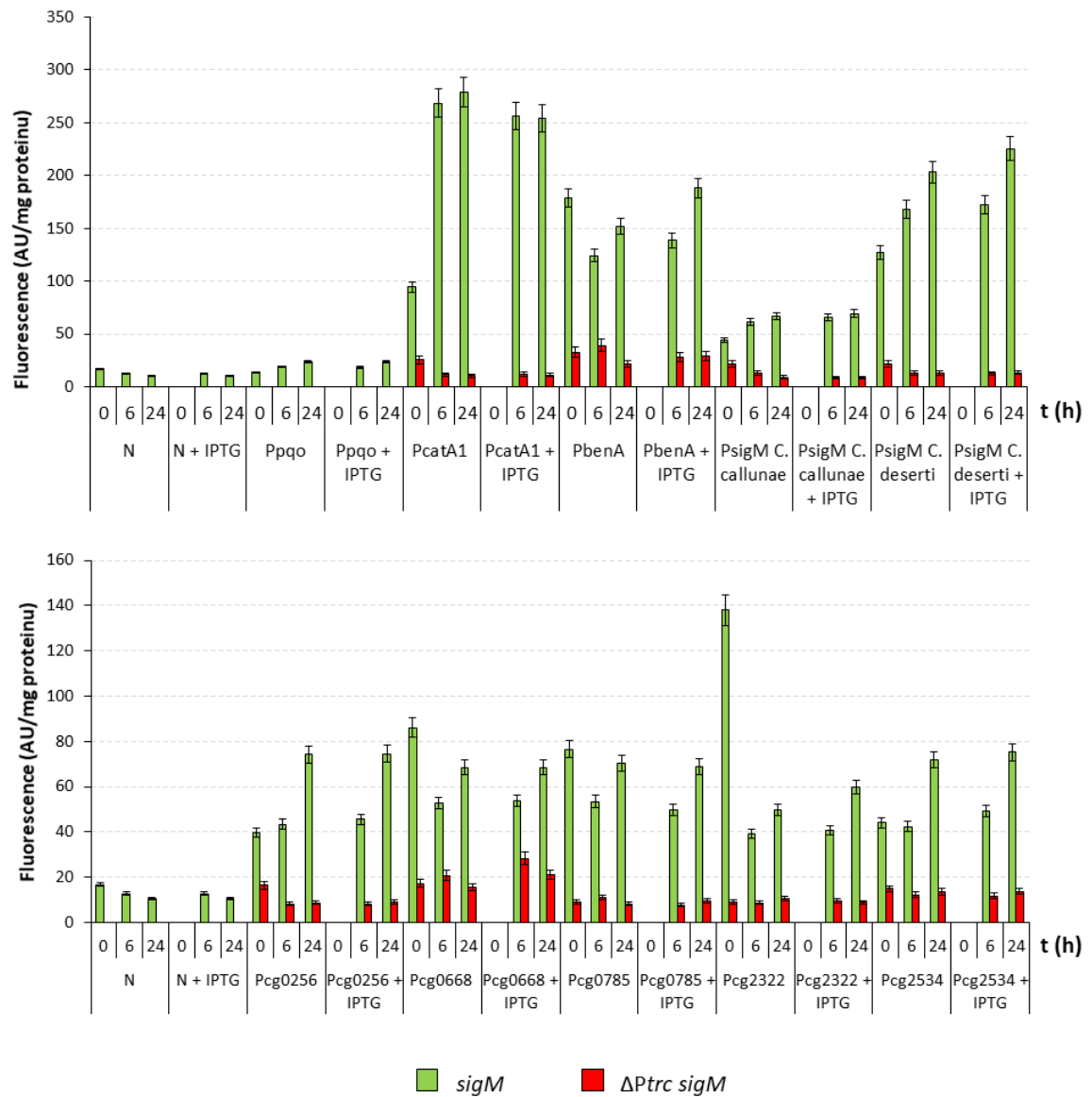
4.4.3. Vliv mutantního konstruktů pEC-XT99A/sigM na σ^M -dependentní promotory

Žádný z potenciálně σ^M -dependentních promotorů nebyl zcela jednoznačně prokázán metodou *in vitro* transkripce (Obr. 45F-J). Výsledky měření *in vivo* byly neobvyklé, protože aktivity promotorů u neindukovaných buněk byly téměř stejně vysoké jako buněk indukovaných. To jsme u ostatních faktorů sigma pozorovali jen výjimečně. Bylo tedy třeba dokázat, zda je tento jev způsoben expresí genu *sigM* z konstruktů pEC-XT99A/sigM nebo jen přítomností vyššího počtu kopií genu *sigM* a případně slabou bazální expresí bez indukce IPTG.

Byl proto navržen a připraven mutantní konstrukt pEC-XT99A/sigM s deletovaným inducibilním promotorem *P_{trc}*, který byl spolu s jednotlivými potenciálními σ^M -dependentními promotory v pEPR1 přenesen transformací do buněk *C. glutamicum*. Aktivita promotorů byla měřena za standardních podmínek (30 °C) s počátkem kultivace $OD_{600} = 0,5$. Odběry z kultur proběhly 6 a 24 h po přidání IPTG, vzorky byly zpracovány, jak je uvedeno v kapitole „Stanovení aktivity promotorů fluorometricky“, a bylo provedeno měření fluorescence (Obr. 46).

Jako kontrola byl použit kmen *C. glutamicum* nesoucí funkční pEC-XT99A/sigM s inducibilním promotorem *P_{trc}* a příslušný potenciální σ^M -dependentní promotor. Pro stanovení bazální hodnoty byl použit kmen *C. glutamicum* se samotným vektorem pEC-XT99A. Jako negativní kontrola, u níž je známo, že není regulována faktorem σ^M , byl použit promotor genu *pqo*.

Porovnání naměřených aktivit potenciálních σ^M -dependentních promotorů za exprese genu *sigM* (spouštěné z promotoru *P_{trc}* ve vektoru pEC-XT99A) a bez exprese genu *sigM* (při delecii *P_{trc}*) (Obr. 46) ukazuje, že aktivity promotorů (*P_{cg0256}*, *P_{cg0668}*, *P_{cg0785}*, *P_{cg2322}*, *P_{cg2534}*, *P_{catA1}*, *P_{benA}*, *P_{sigM C. callunae}* a *P_{sigM C. deserti}*) v neindukovaných buňkách nejsou způsobeny pouhou přítomností genu *sigM* ve vektoru pEC-XT99A, ale pravděpodobně důsledkem bazální exprese (*leaky* exprese) genu *sigM* v dvouplazmidovém systému z *P_{trc}*. Je to také důkaz, že naměřené aktivity promotorů za nadexpresi faktoru σ^M jsou důsledkem jejich funkčnosti s faktorem σ^M .



Obrázek 46. Aktivita potenciálních σ^M -dependentních promotorů ovlivněná přítomností vektoru pEC-XT99A/*sigM*. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence. Zeleně je znázorněn kmen *C. glutamicum* nesoucí nezměněný plazmid pEC-XT99A/*sigM* a červeně kmen *C. glutamicum* nesoucí plazmid pEC-XT99A/*sigM* s deletovaným indukibilním promotorem *P_{trc}*. AU=arbitrární jednotka. N=kontrola, prázdný vektor pEC-XT99A.

5. Diskuze

Transkripční regulační síť řízená faktory sigma byla u některých bakterií popisována jako modulární. U *Pseudomonas aeruginosa* bylo zjištěno, že regulony 25 faktorů sigma (sigmulony) tvoří separované skupiny genů (moduly), které mají jen velmi málo překryvů (Schulz *et al.*, 2015). Předpokládá se, že tyto nezávislé regulony umožňují buňkám této extrémně adaptabilní bakterie snadno se přizpůsobit odlišným životním strategiím (růst jako patogen nebo ve vodě či v půdě metabolizovat přírodní nebo i syntetické organické látky). Funkce regulonů alternativních faktorů sigma jsou u *P. aeruginosa* propojeny působením globálních transkripčních regulátorů, což podle této hypotézy zajišťuje jak účinné přepínání a modulování aktivity jednotlivých regulonů, tak i rychlou evoluci regulačních funkcí (Binder *et al.*, 2016). Postupné odhalování funkcí sigmulonů u *C. glutamicum* naznačuje, že se tyto skupiny genů zčásti překrývají a regulační síť řízená faktory sigma má tedy odlišný charakter, než je tomu u *P. aeruginosa* (Pátek a Nešvera, 2013). Některé geny patří do dvou či více sigmulonů, jelikož jsou transkribovány buď z několika promotorů rozeznávaných různými faktory sigma, nebo jsou transkribovány dvěma či více různými holoenzymy (jádro RNA polymerázy + faktor sigma), které řídí transkripci ze stejného promiskuitního promotoru. Podobné typy regulace byly popsány i u dalších bakterií, např. u *B. subtilis* a u *Klebsiella pneumoniae* (Luo a Helmann, 2009; Seo *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014).

Tento překryv regulonů může být způsoben nižší specifitou dvou a více faktorů sigma, které mohou řídit transkripci genů ze stejného promotoru. V nedávné době byly při transkripční analýze *C. glutamicum* objeveny promotory genů rozpoznávané dvěma stresovými faktory sigma (Šilar *et al.*, 2016), což prokázalo možné překrývání promotorové specifity faktorů sigma prostřednictvím promiskuitních promotorů. Cílem této dizertační práce bylo odhalit dosud neznámé regulony stresových faktorů sigma nebo upřesnit popis některých regulonů. Těžiště práce spočívá v přesném popisu regulonů pomocí lokalizace promotorů příslušných genů, definování konvenční sekvence těchto promotorů a nalezení případných překryvů specifity faktorů sigma při rozeznávání promotorů. Práce se zaměřila na promotory *C. glutamicum* rozpoznávané stresovými faktory σ^D , σ^E , σ^H a σ^M . Vybrané faktory sigma 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 (σ^H a σ^M) stres. Pro účely detailní analýzy promotorů bylo nejprve třeba vyvinout metody, které rychle a spolehlivě přiřadí faktor sigma k jednotlivým promotorům.

Analýzy aktivity promotorů za podmínek stresu nebo při použití kmenů s delecí či nadprodukcí faktoru sigma mohou poskytnout výsledky ovlivněné druhotnými efekty, které jsou způsobené kaskádou faktorů sigma, sítí faktorů sigma a kompeticí o RNA polymerázu. *In vitro* metody, při nichž nemají vliv tyto komplexní jevy, zase postrádají všechny buněčné regulátory (aktivátory a represory), které *in vivo* aktivitu promotorů silně ovlivňují. Kombinací výsledků *in vivo* a *in vitro* lze minimalizovat nedostatky těchto metod, a je proto vhodné se zaměřit na oba typy analýz. Pro použití vhodné metody v buňkách *C. glutamicum* jsme zkonstruovali dvouplazmidový systém podobný tomu, který byl popsán pro *E. coli* (Rezuchová a Kormanec, 2001). Námi zkonstruovaný dvouplazmidový systém je homologní (RNAP a faktory σ jsou proteiny hostitelské buňky, tj. *C. glutamicum*) na rozdíl od již popsaného systému, který je heterologní (faktor sigma pochází ze studovaného organismu, zatímco RNAP poskytuje hostitelská buňka *E. coli*) (Ševčíková *et al.*, 2005). Homologní systém zaručuje přirozenou kombinaci RNAP, faktorů σ a regulačního aparátu hostitelské buňky *C. glutamicum*. Jeho možnou vadou je možnost interference faktoru sigma produkovaného odpovídajícím genem na chromozomu a identického faktoru sigma nadprodukovaného genem na plazmidu. Tomu lze zabránit použitím hostitelského kmene, v němž je příslušný faktor sigma deletován. Výhodou dvouplazmidového systému je experimentální aktivace genů regulovaných příslušným faktorem sigma bez znalosti stresových podmínek, které příslušný faktor sigma aktivují. Nadprodukce faktoru sigma vlastně vyvolává v buňce obdobný fyziologický stav, jaký je způsoben stresem, na který příslušný faktor sigma cílí odpověď buňky. Zástupcem *in vitro* metod se pak stala *in vitro* transkripční analýza (Holátko *et al.*, 2012) vyvinutá v naší laboratoři. Pro ověření vhodnosti těchto metod byly nejprve testovány známé příslušné promotory pro každý specifický faktor sigma. Postupně byla oběma metodami prokázána u promotoru genu *fba* σ^B -dependence, genu *cg2556* σ^C -dependence, genu *cmt1* σ^D -dependence a genu *rshA* σ^H -dependence. U promotoru genu *sigA* se sice prokázala jeho σ^A -dependence, ale vysoké hodnoty aktivit byly naměřeny rovněž u kultury s prázdným vektorem pEC-XT99A i všech ostatních kultur s konstrukty pEC-XT99A/*sig*“X“ (Obr. 14). To je patrně způsobeno expresí chromozomálně lokalizovaného genu *sigA*, jelikož σ^A je hlavní vegetativní faktor sigma a jeho produkce je v průběhu exponenciální fáze růstu vysoká. Snížená aktivita testovaného *PsigA* po nadprodukcí faktoru σ^H je dána pravděpodobně kompeticí faktorů σ^H (vektorová exprese) a σ^A (chromozomální exprese) o RNA polymerázu. Promotor genu *sigB* byl prokázán jako σ^H/σ^E -promiskuitní, jelikož je regulován nejen faktorem σ^H , ale i faktorem

σ^E . Podobný jev byl pozorován u *Mycobacterium tuberculosis* (Fontán *et al.*, 2009). U modelové grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* je gen *sigB* regulován vegetativním faktorem σ^A (Ramaniuk *et al.*, 2017). Tato pozorování jsou v souladu se zjištěnou vysokou podobností faktoru σ^B v *C. glutamicum* a σ^B v *M. tuberculosis* (78,5 % identity) a velmi nízkou úrovní shody s faktorem σ^B *B. subtilis* (25 %). Neočekávané výsledky byly zjištěny v případě testování předpokládaného zástupce σ^M -dependentních promotorů (*PtxB1*; Nakunst *et al.*, 2007), neboť kombinací metod *in vivo* a *in vitro* byl *PtxB1* charakterizován jako σ^H -dependentní a nikoli σ^M -dependentní. To se však shoduje i s dalšími publikovanými výsledky (Busche *et al.*, 2012) popírajícími původní zjištění Nakunst *et al.* (2007).

Jelikož výsledky našich analýz byly ve většině případů v souladu s předchozími poznatky, lze předpokládat, že námi vyvinutý *in vivo* dvouplazmidový systém v kombinaci s *in vitro* transkripcí spolehlivě přiřadí ke každému promotoru odpovídající faktor sigma.

Faktory sigma u *C. glutamicum* byly pojmenovány podle strukturně a funkčně nejbližších faktorů sigma aktinobakterie *M. tuberculosis*, s nimiž vykazují vysoký stupeň podobnosti (Tab. 13). Stejně pojmenované faktory sigma z modelových bakterií *B. subtilis* a *E. coli* mají naproti tomu velmi nízkou podobnost s faktory sigma z aktinobakterií, v mnoha případech patří do jiné skupiny (Tab. 13) a také mají odlišné funkce, např. se účastní sporulace (σ^H a σ^E z *B. subtilis*; Britton *et al.*, 2002; Eichenberger *et al.*, 2003) nebo regulačních mechanismů (σ^M z *B. subtilis* a σ^E z *E. coli*; Dartigalongue *et al.*, 2001; Helmann, 2016).

Tabulka 13. Faktory anti- σ faktorů σ^D , σ^E , σ^H a σ^M vybraných bakterií, jejich podobnost faktorům anti- σ z *C. glutamicum* a zařazení do skupin.

Faktor sigma	<i>M. tuberculosis</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>E. coli</i>		
	Podobnost	Skupina ^a	Anti- σ	Podobnost	Skupina ^a	Anti- σ	Podobnost	Skupina ^a	Anti- σ
σ^D	56 %	4	+ ^b	24 %	3	-	-	-	-
σ^E	71 %	4	+ ^c	23 %	3	-	28 %	4	+ ^f
σ^H	69 %	4	+ ^d	26 %	3	-	29 %	3	-
σ^M	33 %	4	+ ^b	25 %	4	+ ^e	-	-	-

^a Gruber a Gross, 2003; ^bJoshi *et al.*, 2019; ^c Donà *et al.*, 2008; ^d Manganelli *et al.*, 2004; ^e Ogura a Asai, 2016; ^f Klein *et al.*, 2016

σ^H/σ^E -promiskuitní promotory

Skupina genů, jejichž exprese je ovládána určitým faktorem sigma, je označována jako σ -regulon (též sigmulon) a jejich promotory rozeznávané příslušným holoenzymem RNAP+ σ tvoří odpovídající třídu promotorů. Situace je ale složitější, jestliže tentýž promotor spouští transkripci při alternativní účasti dvou nebo více faktorů sigma. V takovém případě patří příslušný gen do dvou a více regulonů a dochází tedy k překryvu regulonů. Promotor rozeznávaný dvěma a více faktory sigma zde označují jako promiskuitní.

Poprvé byla existence překryvu regulonů faktorů sigma popsána u faktorů σ^X/σ^W v *B. subtilis* (Qiu a Helmann, 2001) a později u faktorů $\sigma^E/\sigma^H/\sigma^L$ v *M. tuberculosis* (Dainese *et al.*, 2006), σ^{70}/σ^{32} a σ^{70}/σ^{38} v *E. coli* (Wade *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2009) a σ^X/σ^M v *B. subtilis* (Luo a Helmann, 2009). Předpoklad, že se jedná o obecnější jev u bakterií a že překryv regulonů se nachází i u *C. glutamicum*, potvrzuje i dřívější nalezení překryvu rozpoznávání promotorů genů *dnaK* (Pátek *et al.*, 2013), *clgR* a *dnaJ2* (Šilar *et al.*, 2016) faktory σ^E a σ^H . Na základě techniky DNA-čipů (*microarray*) (Busche *et al.*, 2012) a sekvenování RNA kmenů *C. glutamicum* $\Delta rshA$ a *C. glutamicum* $\Delta cseA$ (Busche, 2013) byly definovány stimulony faktorů σ^H a σ^E čítající přibližně 100 σ^H -dependentních genů, 3 čistě σ^E -dependentní geny a 14 σ^H/σ^E -promiskuitních genů. Delece faktoru anti- σ v kmenech *C. glutamicum* $\Delta rshA$ a *C. glutamicum* $\Delta cseA$ způsobí uvolnění faktoru sigma z vazby s anti- σ a poté mohou být σ^H - či σ^E -dependentní geny exprimovány bez působení stresu.

Regulon σ^H v *C. glutamicum* (100 genů; Busche *et al.*, 2012; Busche, 2013) je přibližně 3x větší než v *M. tuberculosis* (31 genů; Dutta *et al.*, 2010). Je tedy pravděpodobné, že σ^H u *C. glutamicum* má důležitou roli v hierarchii faktorů sigma jako jeden z potenciálních globálních regulátorů (Schröder a Tauch, 2010). Faktor σ^H nejenže řídí transkripci nejméně tři z nich - σ^A (Toyoda *et al.*, 2015), σ^B (Ehira *et al.*, 2009) a σ^M (Nakunst *et al.*, 2007), ale také vykazuje regulační překryvy s transkripčními regulátory *clgR* (Engels *et al.*, 2004), *sufR* (Ehira *et al.*, 2009) a *hspR* (Ehira *et al.*, 2009) či s dalšími faktory sigma (σ^E , σ^D a σ^M ; tato práce). Podobnost sekvence aminokyselin σ^H v *C. glutamicum* je nejvyšší s faktorem σ^H v *M. tuberculosis* (69 %). Faktory σ^H obou těchto bakterií jsou posttranslačně regulovány vlastním faktorem anti- σ (Manganelli *et al.*, 2004; Busche *et al.*, 2012) a řadí se do skupiny 4 rodiny σ^{70} (Gruber a Gross, 2003). Z těchto důvodů je pravděpodobně funkce σ^H v *M. tuberculosis* (odpovědi na tepelný stres, stres vyvolaný kyselým prostředím, oxidativní stres; Dutta *et al.*, 2010; Sachdeva *et*

al., 2010) a působení jeho regulonu (Manganelli *et al.*, 2004) velmi podobné jako u σ^H v *C. glutamicum*.

Faktor σ^E účastní se v *C. glutamicum* odpovědi na tepelný a povrchový stres (Park *et al.*, 2008) a odpovědi na stres vyvolaný kyselinou ferulovou (Chen *et al.*, 2017) se neřadí ke globálním regulátorům (oproti σ^H) a jeho regulon nebyl dosud detailněji popsán. Na rozdíl od *C. glutamicum* je regulon σ^E u *M. tuberculosis* dobře prostudován (23 genů účastnících se translace, kontroly transkripce, biosyntézy mykologických kyselin či odpovědi na oxidativní a tepelný stres; Manganelli *et al.*, 2004; Dutta *et al.*, 2010; Sachdeva *et al.*, 2010). Faktor σ^E z *C. glutamicum* je funkcí a aminokyselinovou sekvencí (71 % identita) nejvíce podobný faktoru σ^E z *M. tuberculosis* (Manganelli *et al.*, 2004; Dutta *et al.*, 2010; Sachdeva *et al.*, 2010). U obou bakterií se σ^E řadí do skupiny 4 rodiny σ^{70} a také jsou oba posttranslačně regulovány vlastními faktory anti- σ (Dona *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). Je zajímavé, že σ^E gramnegativní bakterie *E. coli*, který má nízkou podobnost se σ^E z *C. glutamicum* (aminokyselinová identita 28 %), patří také do skupiny 4 a jeho aktivita je rovněž regulována faktorem anti- σ (Klein *et al.*, 2016).

Ze stimulonů σ^H , σ^E a σ^H/σ^E , které popsal Busche (2013), byly vybrány a analyzovány *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripční analýza) promotory genů zastupující všechny tři skupiny (σ^H -, σ^E - a σ^H/σ^E -dependentní) (Tab. 14).

Tabulka 14. Seznam promotorů vybraných na základě sekvenování RNA.

Gen	Faktor sigma	Tato práce	Funkce
<i>clpP1</i>	σ^H ^a	σ^H	Podjednotka ATP-dependentní proteázy
<i>mca</i>	σ^H ^a	σ^H	Předpokládaná mykotioloová S-konjugační amidáza
<i>uvrD3</i>	σ^H ^a	σ^H	RNA-helikáza nebo DNA I-helikáza
<i>mshC</i>	σ^H ^a	σ^H	Předpokládaná cystein-tRNA-syntetáza
<i>sufR</i>	σ^H ^a	σ^H	Transkripční represor <i>suf</i> operonu
<i>trxB</i>	σ^H ^a	σ^H	Thioredoxinreduktáza
<i>amtR</i>	σ^E ^{a, c}	σ^H/σ^E	Regulátor metabolismu dusíku
<i>cgl121</i>	σ^E ^a X σ^H ^c	σ^H/σ^E	Permeáza
<i>cg3309</i>	σ^E ^a	σ^H/σ^E	Předpokládaný sekreční protein
<i>cg0378</i>	σ^H/σ^E ^a	σ^H/σ^E	Předpokládaný protein asociovaný s fágem
<i>clgR</i>	σ^H/σ^E ^{a, b} X σ^H ^c	σ^H/σ^E	Transkripční regulátor
<i>sigB</i>	σ^H/σ^E ^{a, b}	σ^H/σ^E	Neesenciální faktor sigma podobný primárnímu faktoru sigma
<i>dnaJ2</i>	σ^H/σ^E ^{a, b}	σ^H/σ^E	Chaperon
<i>dnaK</i>	σ^H/σ^E ^{a, b} X σ^H ^{c, d}	σ^H/σ^E	Protein účastnící se odpovědi na tepelný stres
<i>cg3344</i>	σ^H/σ^E ^a X σ^H ^{c, d}	σ^H/σ^E	Nitroreduktáza

^a Faktory sigma předběžně přiřazené promotorům podle výsledků sekvenování RNA (Busche, 2013).

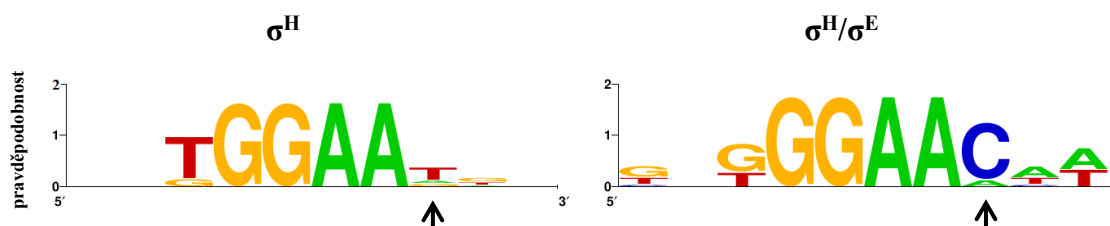
^b Faktory sigma přiřazené v práci Pátek *et al.*, 2013 a Šilar *et al.*, 2016.

^c Faktory sigma přiřazené v práci Ehira *et al.*, 2009.

^d Faktory sigma přiřazené v práci Toyoda *et al.*, 2015.

Vybrané σ^H -dependentní promotory genů *sufR*, *clpP1*, *uvrD3*, *mca*, *trxB* a *mshC* se metodami *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripční analýza) prokázaly jako striktně σ^H -dependentní. U σ^H/σ^E -dependentních promotorů genů *cg0378*, *cg3344*, *clgR*, *dnaJ*, *dnaK* a *sigB* se potvrdila σ^H/σ^E promiskuita a byla zjištěna převládající regulace faktorem σ^H a slaběji faktorem σ^E , a to *in vivo* i *in vitro*. Promotory genů *amtR*, *cg1121* a *cg3309* určené sekvenováním transkriptomu (Busche, 2013) jako striktně σ^E -dependentní byly ale našimi metodami prokázány jako σ^H/σ^E -promiskuitní. Promotor genu *cg1121* byl navíc zvláštní tím, že se u něj projevil odlišný trend regulace v závislosti na použité metodě. Zatímco *in vivo* byl jako ostatní silněji aktivován faktorem σ^H a slaběji σ^E , za podmínek *in vitro* převládala regulace faktorem σ^E .

Statistická analýza promotorových sekvencí zkoumaných genů (Obr. 47) ukazuje, že se sekvence σ^E - a σ^H/σ^E -dependentních promotorů (GGAAC-N₁₆₋₁₉-GTT) liší od konvenční sekvence σ^H -dependentních promotorů (g/tGGAA-t/cGTTgaa) v pozici -31, kde mají σ^E -dependentní promotory cytosin. Lze tedy předpokládat, že nukleotidem v této pozici se liší konvenční sekvence σ^H - a σ^E -dependentních promotorů.



Obrázek 47. Frekvence výskytu jednotlivých nukleotidů v promotorové oblasti -35 σ^H -dependentních a σ^H/σ^E -promiskuitních promotorů. Šipka označuje pozici -31. Sekvence je zobrazena ve směru 5'→3'. WebLogo3 (Crooks *et al.*, 2004).

Konvenční sekvence σ^E - a σ^H -dependentních promotorů u *M. tuberculosis* je velmi podobná té u *C. glutamicum*, ovšem u obou se nachází na pozici -31 cytosin (Tab. 15). U méně sekvenčně podobných faktorů σ^E a σ^H u *B. subtilis* a *E. coli* se konvenční sekvence velmi liší (Tab. 15) a shoda s *C. glutamicum* je jen v pozici -31 faktoru σ^H z *B. subtilis*, kde se nachází A/T, či u faktoru σ^E z *E. coli*, kde je rovněž C.

Tabulka 15. Konvenční sekvence σ^H - a σ^E -dependentních promotorů různých bakterií.

	σ^H	σ^E
<i>C. glutamicum</i>	g/tGGAA-t/cGTTgaa ¹	GGAAC-N ₁₆₋₁₉ -GTT
<i>M. tuberculosis</i>	^G / _C GGAAC-N ₁₇₋₂₂ - ^G / _C GTT ^G / _C ²	GGAAC ^C / _{Ta} -N ₁₅₋₁₆ -cGTT ³
<i>B. subtilis</i>	^A / _G NAGGA ^A / _T ^A / _T ^A / _T -N ₁₁₋₁₂ - ^A / _G NNGAAT ^A / _T ^A / _T ⁴	TCATATT-CATANANT ⁵
<i>E. coli</i>	GGAACCTTGAAA-N ₁₅ -CCCCATNT ⁶	ggAACTt-N ₁₆ -TCnaA ⁷

¹ Busche *et al.*, 2012; ² Manganelli *et al.*, 2004; ³ Song *et al.*, 2008; ⁴ Britton *et al.*, 2002;

⁵ Eichenberger *et al.*, 2003; ⁶ Nonaka *et al.*, 2006; ⁷ Rezuchová *et al.*, 2003

Abychom zjistili, proč může docházet k překryvu promotorové specifity faktorů σ^E , σ^H a které nukleotidy promotoru a aminokyseliny faktoru sigma jsou pro interakci rozhodující, použili jsme homologní modelování (Ivan Barvík, Fyzikální ústav MFF UK) vazby faktorů σ^E a σ^H na rozšířenou promotorovou oblast -35 σ^H -dependentních (GGAA^T/Gaaaa) a σ^H/σ^E -dependentních (GGAACttt) promotorů. Toto homologní modelování bylo provedeno na základě známé struktury faktoru σ^E z *E. coli* (Lane a Darst, 2006). Bylo zjištěno, že klíčovou aminokyselinou, která interaguje s nukleotidem na pozici -31, je arginin R185 faktoru σ^E a methionin M170 faktoru σ^H . Pro ověření této hypotézy byly navrženy mutace klíčových aminokyselin ve faktorech σ^E (R185) a σ^H (M170), a to tak, že methionin ve faktoru σ^H byl zaměněn za arginin a arginin ve faktoru σ^E byl zaměněn za methionin. Byla také provedena mutagenese v promotorové oblasti -31 až -27, protože mutagenese s použitím mutace jen v pozici -31 u promotoru *P1sigA* nebyla zcela přesvědčivá. Mutace byla provedena na základě statistického odvození rozšířené konvenční sekvence oblasti -35 pro σ^E (GGAACttt) a pro σ^H (GGAA^T/Gaaaa). Mutace v σ^H -dependentním promotoru genu *trxBI* a σ^E -dependentním promotoru genu *cg3309* byly navrženy tak, že byla navzájem vyměněna jejich promotorová oblast -31 až -27 v očekávání, že se změní jejich rozpoznání faktorem sigma ze σ^H na σ^E (*PtrxBI*mut) a opačně (*Pcg3309*mut).

Mutační analýza provedená na základě homologního modelování v podstatě potvrdila navrženou hypotézu o interakcích faktorů σ^H a σ^E s nukleotidy -31 a -30 σ^E - a σ^H -dependentních promotorů, avšak mutované faktory sigma nedosahovaly s přirozenými ani s mutovanými promotory stejně vysokých aktivit jako přirozené promotory s přirozenými faktory sigma, z čehož lze usoudit, že se zde uplatňují ještě další vlivy. Malý rozsah struktur RNAP v komplexu se stresovými podjednotkami sigma, které jsou nyní k dispozici, zatím neumožňuje učinit definitivní závěry. Nicméně je zřejmé, že rozpoznávání sekvence DNA elementu -35 může být poměrně dynamický proces (Ivan Barvík, Fyzikální ústav MFF UK). Paralelně probíhá i navazování DNA v oblasti -10 elementu, kde dochází k markantním strukturním změnám, jelikož se zde otevírá transkripční bublina. To nepochybně vyžaduje určitou flexibilitu i v oblasti -35 elementu a pravděpodobně se zde významně uplatňuje interakce mezi podjednotkou sigma, *flap-tip* helixem podjednotky β a nukleotidy v pozicích -29 až -27.

σ^D/σ^H -promiskuitní promotory

Zatímco u σ^H - a σ^E -dependentních promotorů byla již na začátku analýzy zřejmá jejich výrazná vzájemná podobnost, u σ^D -dependentních promotorů jsme neočekávali jakýkoli překryv rozpoznávání s jiným faktorem sigma, neboť jejich konvenční sekvence (GTAAC-N₁₆₋₁₇-CGAT; Taniguchi *et al.*, 2017b; Toyoda a Inui, 2018) se liší od promotorů rozeznávaných ostatními sigma faktory a geny jimi řízené mají velmi specifické funkce.

Na základě analýzy σ^D -dependentních promotorů *M. tuberculosis* dvěma různými skupinami byly navrženy dvě různé konvenční sekvence. Jedna z nich je spíše podobná σ^H -dependentním promotorům *C. glutamicum* (AGAAAG-N₁₆₋₂₀-CGTTA; Calamita *et al.*, 2005), zatímco druhá (GTAACGct-N-N; Raman *et al.*, 2004) je v oblasti -35 totožná se σ^D -dependentními promotory *C. glutamicum*. U σ^D -dependentních promotorů *B. subtilis* (TAAAG-N-GCCGATAT (Serizawa *et al.*, 2004) je se σ^D -dependentními promotory *C. glutamicum* podobnost pouze v oblasti -10 (CGAT).

Transkripce genu pro faktor σ^D v *C. glutamicum* je řízena vegetativním faktorem σ^A a jeho aktivita je posttranslačně regulována faktorem anti- σ (Toyoda a Inui, 2018). Uplatňuje se během odpovědi na limitaci kyslíkem (Ikeda *et al.*, 2009) a při udržení integrity buněčné stěny (Taniguchi *et al.*, 2017b). Faktor σ^D z *M. tuberculosis* se rovněž řadí do skupiny 4 rodiny σ^{70} a je také posttranslačně regulován vlastním faktorem anti- σ (Joshi *et al.*, 2019). Sekvenční podobnost (se σ^D z *C. glutamicum*) je však u faktoru σ^D z *M. tuberculosis* (56 %) nižší než u ostatních ECF faktorů σ . Tomuto nižšímu stupni podobnosti faktoru σ^D z *M. tuberculosis* odpovídá i jeho odlišná funkce: uplatňuje se ve stacionární fázi růstu, při nedostatku živin a stringentní odpovědi (Sachdeva *et al.*, 2010). Regulon faktoru σ^D zahrnuje u *M. tuberculosis* 60 genů, zatímco u *C. glutamicum* pouze 29 genů. U *C. glutamicum* obsahuje geny kódující korynemykolytransferázy udělující rezistenci vůči lysozymu a geny účastníci se syntézy korynemykolylových kyselin. Větší regulon *M. tuberculosis* zahrnuje geny syntézy proteinů během pozdní stacionární fáze, virulence a elongační translační faktory (Calamita *et al.*, 2005).

Naše detailní analýza σ^D -dependentních promotorů opět vycházela z výsledků sekvenování transkriptomu získaných na Univerzitě v Bielefeldu srovnáním exprese genů 3 kmenů *C. glutamicum* (divokého, nadexprimujícího *sigD* a delečního $\Delta sigD$), u nichž bylo pomocí sekvenování RNA identifikováno 29 potenciálních σ^D -dependentních genů (Taniguchi *et al.*, 2017b). Pro analýzu jsme vybrali 10 genů (*cg0420*, *cg0607*, *cg1056*, *cg2047*, *cmt2*, *cmt3*, *fadD2*, *lppS*, *lpd* a *rsdA*), jejichž promotory vykazovaly výrazně

konzervované klíčové oblasti (-35: GTAAC^{G/A}; -10: GAT). Pouze promotory genů *cg0420*, *cg1056* a *cmt3* byly však metodami *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripční systém) prokázány jako výhradně σ^D -dependentní. U zbývajících promotorů (*Pcg0607*, *Pcg2047*, *Pcmt2*, *PfadD2*, *Plpd*, *PlppS* a *PrsdA*) *in vivo* analýzy ukazovaly také na slabou aktivitu se σ^H , což ve své práci nezjistili Toyoda a Inui (2018). Z našich výsledků lze usoudit, že se jedná o σ^D/σ^H -promiskuitní promotory, přestože jsou konvenční sekvence oblastí -35 a -10 σ^D -dependentních (GTAAC a CGAT) (Toyoda a Inui, 2018) a σ^H -dependentních (g/tGGAA a t/cGTTgaa) (Ehira *et al.*, 2009) promotorů odlišné. Ačkoli regulace promotorové oblasti genu *fadD2* faktorem σ^H by mohla být způsobena dalším σ^H -dependentním promotorem, který se nachází v těsné blízkosti σ^D -dependentního promotoru, u ostatních σ^D/σ^H genů to již neplatí, neboť mají jen jeden promotor. *In vitro* transkripční analýzou byla prokázána regulace faktorem σ^H pouze u promotoru genu *cg0607*, přičemž s faktorem σ^H byla aktivita promotoru dokonce silnější než s faktorem σ^D . To je pravděpodobně způsobeno shodou sekvence *Pcg0607* v oblasti -35 (GGAA) s konvenční sekvencí σ^H -dependentních promotorů. Tato oblast -35 je navíc zřejmě určující pro *in vitro* transkripci, neboť ačkoli promotor genu *lpd* obsahuje shodnou sekvenci oblasti -10 (GTT) s konvenční sekvencí σ^H -dependentních promotorů, jeho aktivita s faktorem σ^H byla zvýšena jen *in vivo* během exponenciální fáze růstu, zatímco *in vitro* transkripční analýzou nebyla vůbec prokázána. Podle sekvencí oblastí -35 a -10 lze promotory genů *cg0607* a *lpd* považovat za přirozené σ^D/σ^H -hybridní promotory.

Pro vysvětlení částečně se překrývající specifity σ^D a σ^H při transkripci z promotoru se nabízí hypotéza, že na rozdíl od σ^D je σ^H mírně exprimován během exponenciální fáze růstu (Výsledky 4.3.2, Obr. 36 a 37), čímž je mnohem dříve dostupný v buňce než zcela specifický σ^D . U některých promotorů (*Pcg0607*, *Pcg2047*, *Pcmt2*, *Plpd* a *PlppS*) klesala aktivita promotoru pod vlivem nadexprese *sigH* s přechodem do stacionární fáze růstu. Regulace faktorem σ^H během exponenciální fáze růstu může nejspíše přispívat k optimalizaci transkripce za různých stresových podmínek, a to zvláště při odpovědi na povrchový stres.

Pro identifikaci klíčové aminokyseliny v sekvenci faktoru σ^D , která je zodpovědná za rozpoznání odlišných nukleotidů na druhé pozici konvenční sekvence oblasti -35 (G nebo T) či na druhé pozici konvenční sekvence oblasti -10 (T nebo A) σ^H -dependentních (GGAA a GTT) a σ^D -dependentních (GTAAC a GAT) promotorů, a pro porozumění, proč je σ^H za určitých podmínek schopen zahájit transkripci ze

σ^D -dependentních promotorů, jsme opět použili homologní modelování (I. Barvík, Fyzikální ústav MFF UK). Na základě struktury krystalu proteinu σ^E z *E. coli* navázaného na úsek DNA promotoru (Lane a Darst, 2006; Campagne *et al.*, 2014), který je podobný konvenční sekvenci rozpoznávané faktorem σ^H z *C. glutamicum*, byly modelovány domény rozpoznávající oblasti -10 a -35 σ^H - a σ^D -dependentních promotorů. Jako klíčové pro rozpoznání druhé pozice oblasti -10 byly objeveny aminokyseliny alanin A60 (σ^D) a lysin K53 (σ^H) a pro rozpoznání druhé pozice promotorové oblasti -35 valin V169 s alaninem A166 (σ^D) a serin S171 s threoninem T168 (σ^H).

Na základě *in silico* analýzy byly zkonstruovány mutované faktory $\sigma^{H \text{ Lys-53-Ala}}$ a $\sigma^{H \text{ 168-AlaValArgValAla-172}}$, neboť jsme předpokládali, že nadprodukce $\sigma^{H \text{ Lys-53-Ala}}$ a $\sigma^{H \text{ 168-AlaValArgValAla-172}}$ zajistí vyšší aktivitu těchto vybraných promotorů než přirozený σ^H . Tato domněnka byla ovšem potvrzena pouze v případě promotoru genu *cg0607*. Záměna lysinu K53, který se váže na oblast -10 σ^H -dependentního promotoru, za alanin ($\sigma^{H \text{ Lys-53-Ala}}$) zvýšila aktivitu *Pcg0607*, což je v souladu s předpokladem klíčové role alaninu v této pozici při rozpoznávání oblasti -10 σ^D -dependentních promotorů. Nízká aktivita promotoru *Pcg0607* za nadprodukce faktoru σ^H se záměnou TVMSR za AVRVA ($\sigma^{H \text{ 168-AlaValArgValAla-172}}$), tedy aminokyselin, které jsou patrně zodpovědné za rozpoznání druhé pozice oblasti -35, byla podle *in silico* analýzy pravděpodobně způsobena tím, že zde chyběl arginin (R172), který vytváří s cukrofosfátovou páteří DNA stabilizační solné můstky. Důvodem, proč je schopen σ^H vázat se na σ^D -dependentní promotor, je patrně to, že delší postranní řetězec lysinu K53 faktoru σ^H může interagovat s větším adeninem na druhé pozici konvenční sekvence oblasti -10 σ^D -dependentních promotorů namísto kratšího postranního řetězce alaninu A60 faktoru σ^D . Tato interakce je možná, protože postranní řetězec lysinu K53 je vysoce flexibilní a tato jeho flexibilita umožňuje i přes jeho velikost interakci s větší molekulou adeninu (I. Barvík, Fyzikální ústav MFF UK).

σ^H/σ^M -promiskuitní promotory

Faktor σ^M je nejméně konzervovaným faktorem sigma v bakteriích i u různých rodů *Corynebacterium* a jeho identita na úrovni aminokyselin s jinými faktory σ^M je velmi nízká (*M. tuberculosis* 33 %, *B. subtilis* 25 %), přestože patří do stejné skupiny 4 rodiny σ^{70} . U *M. tuberculosis* a *B. subtilis* byla ale na rozdíl od *C. glutamicum* prokázána inhibice aktivity faktorem anti- σ (Ogura a Asai, 2016; Joshi *et al.*, 2019). Geny a promotory řízené faktorem σ^M v *C. glutamicum* byly dosud popsány pouze v jediné publikaci (Nakunst *et al.*, 2007). Konvenční sekvence předpokládaných

σ^M -dependentních promotorů byla podle Nakust *et al.* (2007) téměř totožná se sekvencí σ^H -dependentních promotorů (-35 GGAAT, -10 GTTG), takže nebylo překvapením, když tyto promotory byly v dalších publikacích (Ehira *et al.*, 2009; Busche *et al.*, 2012) určeny jako σ^H -dependentní. To odpovídalo i našim výsledkům získaným na základě detailních analýz *in vivo* a *in vitro*. Nejasnosti týkající se funkce i samotné existence faktoru σ^M byly navíc posilovány faktem, že transkript genu *sigM* nebyl nikdy sekvenováním RNA detegován (Busche, 2013). Pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI) se nám podařilo alespoň prokázat, že po indukované expresi genu *sigM* klonovaném ve vektoru pEC-XT99A byl protein σ^M v buňce přítomen, což ovšem ještě nezaručuje, že je funkční (Dostálová *et al.*, 2017).

Pro nalezení skutečně σ^M -dependentních promotorů byly zvoleny různé metody (Výsledky 4.4.), kterými byly objeveny geny *benA* (benzoát-1,2-dioxygenáza), *catA1* (katechol-1,2-dioxygenáza), *catB* (chloromukonátcykloizomeráza), *cg0256* (konzervovaný hypotetický protein), *cg0668* (DNA segregální ATPáza rodiny FtsK/SpoIIIE), *cg0785* (hypotetický protein), *cg2322* (konzervovaný hypotetický protein), *cg2534* (domnělý sekreční protein) a *gapA* (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza), u nichž bylo možné předpokládat, že by mohly být σ^M -dependentní.

Metodami *in vivo* a *in vitro* jsme nedokázali k promotorům *PbenA* a *PcatA1* jednoznačně přiřadit faktor sigma, ale metoda dvouplazmidového systému alespoň naznačila možnou regulaci těchto promotorů faktory σ^E , σ^H či σ^M . U obou promotorů totiž nebyl po *in vitro* transkripci zaznamenán signál specifického transkriptu, což může být způsobeno tím, že exprese genů *benA* a *catA1*, které sdílejí společnou mezigenovou oblast (Obr. 48), je zřejmě regulována aktivátorem transkripce, který však v reakční směsi nebyl přítomen.



Obrázek 48. Sekvence mezigenové oblasti divergentních genů *catA1-benA*.

Začátek genu *benA* je znázorněn širokou modrou šipkou a gen *catA1* širokou zelenou šipkou. Vazebná sekvence regulátoru *RipA* genu *catA1* je znázorněna červeným obdélníkem. Šedivým a růžovým obdélníkem jsou znázorněny vazebné sekvence regulátorů *GlxR* a *BenR*, které jsou pravděpodobně společné pro oba geny. Oblasti -35 a -10 promotoru genu *benA* jsou vyznačeny modře. Modrou šipkou je označen transkripční počátek (+1). Promotorové oblasti -35 a -10 genu *catA1* jsou vyznačeny světle (vegetativní promotor) a tmavě (stresový promotor) zeleně. Světlá a tmavě zelená šipka označují příslušný transkripční počátek.

Metodou *in vivo* byla prokázána regulace genů *cg0256*, *cg0668*, *cg0785*, *cg2322* a *cg2534* faktory σ^H i σ^M a u genů *cg0256*, *cg0785* a *cg2322* také faktorem σ^E . Ve stacionární fázi růstu však u genu *cg0256* σ^M aktivitu zcela přebírá. Naopak u genů *cg0668* a *cg2534* je aktivita σ^H a σ^M na stejné úrovni a u genů *cg0785*, *cg2322* je dokonce σ^H aktivnější než σ^M . Regulace těchto genů byla však *in vitro* metodou prokázána jen faktory σ^E a σ^M , i když u σ^M s patrným širokým difuzním signálem. Jedním z možných vysvětlení tohoto neostrého signálu by mohla být slabá rozpustnost σ^M za podmínek reakce *in vitro* transkripce. Jelikož metodami *in vitro* byla potvrzena regulace těchto genů faktory σ^E i σ^M a *in vivo* faktory σ^H i σ^M , jedná se zřejmě o σ^E/σ^M -, σ^H/σ^M - či dokonce $\sigma^E/\sigma^H/\sigma^M$ -promiskuitní promotory.

Dalšími vybranými potenciálně σ^M -dependentními promotory byly promotory genů *sigM* z blízké příbuzných druhů *Corynebacterium callunae* (aminokyselinová shoda 73 %) a *Corynebacterium deserti* (71 %). Přestože u *C. glutamicum* nebyla prokázána

autoregulace genu *sigM*, předpokládali jsme, že tento gen je v kmenech *C. callunae* a *C. deserti* pravděpodobně autoregulován, jelikož byl prokázán σ^M -dependentní promotor genu *sigM* u blízce příbuzné bakterie *M. tuberculosis* (Chauhan *et al.*, 2016). Výsledky *in vivo* prokázaly, že promotory genů *sigM* z kmene *C. callunae* a *C. deserti* jsou regulovány během exponenciální fáze růstu spíše faktorem σ^H než faktorem σ^M . Ve stacionární fázi růstu jsou však silně aktivovány faktorem σ^M a slabě faktorem σ^H . I když metodou *in vitro* transkripce nebyl detekován žádný signál, σ^M se pravděpodobně účastní vlastní regulace, a to hlavně během stacionární fáze růstu.

Na základě našich výsledků byla definována nová konvenční sekvence σ^M -dependentních promotorů (-35: GGGAAACC; -10: GTCNAA), která je velmi podobná konvenční sekvenci σ^M -dependentních promotorů *M. tuberculosis* (GGGAACC-N₁₇-gtccgA; Raman *et al.*, 2006). Jelikož je funkce faktoru σ^M a jeho regulonu u *C. glutamicum* zatím neznámá, může se vycházet z funkce σ^M u *M. tuberculosis*, kde je σ^M regulon velmi malý (10 genů) a jeho geny jsou aktivní během stacionární fáze a odpovědi na tepelný stres (Agarwal *et al.*, 2007).

Žádný z potenciálně σ^M -dependentních promotorů nebyl zcela jednoznačně prokázán s použitím *in vitro* transkripce. Také měření *in vivo* vycházela neobvykle, protože aktivity promotorů v buňkách bez indukce exprese genu *sigM* byly téměř stejně vysoké jako u buněk indukovaných, což jsme u promotorů rozpoznávaných jinými faktory sigma pozorovali jen výjimečně. K prokázání, že je tento jev způsoben bazální expresí genu *sigM* z konstrukt pEC-XT99A/*sigM*, byl připraven mutantní konstrukt pEC-XT99A/*sigM*, v němž byl deletován pouze indukibilní promotor *P_{trc}*. Bez exprese genu *sigM* byla aktivita všech testovaných promotorů na úrovni aktivity v buňce, která obsahovala prázdný vektor pEC-XT99A a vektor s testovaným promotorem. Porovnáním naměřených aktivit potenciálních σ^M -dependentních promotorů za exprese genu *sigM* (spouštěné z promotoru *P_{trc}* ve vektoru pEC-XT99A) a bez exprese plazmidově lokalizovaného genu *sigM* (při delecí *P_{trc}*) bylo tedy prokázáno, že aktivity promotorů (*P_{benA}*, *P_{catA1}*, *P_{cg0256}*, *P_{cg0668}*, *P_{cg0785}*, *P_{cg2322}*, *P_{cg2534}*, *P_{sigM C. callunae}* a *P_{sigM C. deserti}*) v neindukovaných buňkách jsou důsledkem bazální exprese (*leaky* exprese) genu *sigM* v dvouplazmidovém systému z *P_{trc}*. Transkript σ^M doposud nebyl v divokém kmeni *C. glutamicum* detegován (Busche, 2013) zřejmě proto, že k transkripci genu *sigM* dochází pouze za velmi specifických podmínek. S použitím dvouplazmidového systému jsme však jednoznačně prokázali aktivitu faktoru σ^M v buňkách *C. glutamicum*.

Získané výsledky ukazují, že funkce promiskuitních promotorů je u *C. glutamicum* poměrně častou regulační strategií umožňující buňkám vyrovnat se s komplexními environmentálními stresy a nikoli neobvyklou výjimkou. Faktor σ^H v *C. glutamicum* hraje jako jeden z potenciálních globálních regulátorů (Schröder a Tauch, 2010) nejdůležitější roli v hierarchii stresových faktorů sigma pravděpodobně proto, že jeho specifita je nižší než u ostatních faktorů sigma, jak ukazují i naše výsledky. Homologní modelování (I. Barvík, nepublikované výsledky) naznačuje, že tuto univerzálnost faktoru σ^H může způsobovat prolin P165 tohoto proteinu. Ostatní faktory sigma studované v této práci mají v dané pozici aminokyseliny lysin (K) nebo threonin (T) (Obr. 49).

σ^D	GSTPGAVRVA
σ^E	GVKMGTVRSR
σ^H	DVPLGTVMSR
σ^M	GIKVGTVKSR

Obrázek 49. Aminokyselinová sekvence klíčové oblasti studovaných faktorů sigma. Aminokyselinové zbytky v sekvenci oblasti faktorů sigma, které interagují s motivem -35 promotorů a odpovídají P165 u σ^H , jsou zvýrazněny žlutě.

Stejně jako σ^H v *C. glutamicum* mají na odpovídající pozici prolinový zbytek i σ^E v *E. coli* a σ^H v *M. tuberculosis*. Jejich krystalové struktury ukazují, že postranní řetězec prolinu interaguje s deoxyribosou nukleotidu ve druhé pozici -35 elementu (Lane a Darst, 2006; Li *et al.*, 2019). Tato hydrofobní stabilizace je přitom stejná, ať už bude na druhé pozici -35 elementu jakýkoliv deoxyribonukleotid.

Kombinace metod na úrovni genomu (DNA-čipy, sekvenování transkriptomu, proteomika) a metod analýzy jednotlivých genů a promotorů alternativními přístupy *in vivo*, *in vitro* a *in silico* prokázala, že tímto postupem lze dosáhnout jak poznatků rozšiřujících poznání komplexní regulační sítě bakteriální buňky řízené faktory sigma, tak i detailního objasnění regulace jednotlivých genů a promotorů prostřednictvím faktorů sigma.

6. Souhrn

- Byla vyvinuta a optimalizována kombinace metod *in vivo* (dvouplazmidový systém) a *in vitro* (*in vitro* transkripce) pro spolehlivé přiřazení faktorů sigma k příslušným promotorům různých tříd.
- Statistickou analýzou byla definována dosud neznámá konvenční sekvence σ^E - a σ^H/σ^E -dependentních promotorů (GGAAC-N₁₆₋₁₉-GTT).
- Bylo nalezeno 9 σ^H/σ^E -promiskuitních promotorů (*PamtR*, *Pcg0378*, *Pcg1121*, *Pcg3309*, *Pcg3344*, *PclgR*, *PdnaJ*, *PdnaK* a *PsigB*).
- *In silico* modelováním byly určeny a cílenou mutagenezí potvrzeny klíčové aminokyseliny pro specifické rozpoznání σ^H/σ^E -promiskuitních promotorů (arginin R185 faktoru σ^E a methionin M170 faktoru σ^H pro rozpoznání nukleotidové pozice -31).
- Bylo nalezeno 7 σ^D/σ^H -promiskuitních promotorů (*Pcg0607*, *Pcg2047*, *Pcmt2*, *PfadD2*, *Plpd*, *PlppS* a *PrsdA*).
- *In silico* modelováním byly objeveny a cílenou mutagenezí potvrzeny klíčové aminokyseliny pro specifické rozpoznání σ^D/σ^H -promiskuitních promotorů (alanin A60 faktoru σ^D a lysin K53 faktoru σ^H pro rozpoznání druhé nukleotidové pozice oblasti -10 či valin V169 s alaninem A166 faktoru σ^D a serin S171 s threoninem T168 faktoru σ^H pro rozpoznání druhé nukleotidové pozice konvenční promotorové oblasti -35).
- Statistickou analýzou byla poprvé definována konvenční sekvence σ^M -dependentních promotorů (GGGAACC-N₁₇-GTCNAA).
- Bylo objeveno 9 σ^H/σ^M -promiskuitních promotorů (*PbenA*, *PcatA1*, *Pcg0256*, *Pcg0668*, *Pcg0785*, *Pcg2322*, *Pcg2534*, *PsigM C. callunae* a *PsigM C. deserti*).
- Bylo prokázáno, že promiskuitní promotory jsou poměrně častá regulační strategie *C. glutamicum* umožňující vyrovnat se s komplexními environmentálními stresy.
- Bylo zjištěno, že faktor σ^H *C. glutamicum* hraje nejvýznamější roli v regulační síti stresových faktorů sigma díky jeho relativní univerzálnosti.

7. Seznam citované literatury

Agarwal, N., Woolwine, S. C., Tyagi, S., Bishai, W. R. (2007): Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor SigM by assessment of virulence and identification of SigM-dependent genes. *Infect. Immun.* 75, 452-61.

Aida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Takinami, K., Yamada, H. (1986): Biotechnology of amino acid production. *Progress in industrial microbiology*. Kodansha Ltd., Tokyo; Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.

Alba, B. M., Leeds, J. A., Onufryk, C., Lu, C. Z., Gross, C. A. (2002): DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the σ^E -dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* 16, 2156-2168.

Albersmeier, A., Pfeifer-Sancar, K., Rückert, Ch., Kalinowski, J. (2017): Genome-wide determination of transcription start sites reveals new insights into promoter structures in the actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 257, 99-109.

Amster-Choder, O. (2009): Transcriptional regulation. In: Schaechter, M. (2009): Desk encyclopedia of microbiology (second edition). Elsevier, San Diego, 1091-1106.

An, S. J., Yim, S. S., Jeong, K. J. (2013): Development of a secretion system for the production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using the porin B signal peptide. *Protein Expr. Purif.* 89, 251-257.

Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S., Ramphal, R. (1997): A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.* 179, 5574-5581.

Bansal-Mutalik, R., Nikaido, H. (2011): Quantitative lipid composition of cell envelopes of *Corynebacterium glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 15360-15365.

Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J. W., Minchin, S. D. (1997): Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the "extended-10" motif at promoters. *EMBO J.* 16, 4034-40.

Barreiro, C., Nakunst, D., Hüser, A. T., de Paz, H. D., Kalinowski, J., Martín, J. F. (2009): Microarray studies reveal a "differential response" to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiol.* 155, 359-372.

Barrios, H., Valderrama, B., Morett, E. (1999): Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 4305-4313.

Barry, C. E., Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., Yuan, Y. (1998): Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* 37, 143-179.

- Becker, J., Zelder, O., Haefner, S., Schröder, H., Wittmann, C. (2011): From zero to hero: design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab. Eng.* 13, 159-168.
- Binder, S. C., Eckweiler, D., Schulz, S., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Häussler, S., Meyer-Hermann, M. (2016): Functional modules of sigma factor regulons guarantee adaptability and evolvability. *Sci. Rep.* 6, 22212.
- Blumenstein, J. (2019): Hybridní faktory sigma RNA polymerasy *Corynebacterium glutamicum*. Praha, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, *Katedra genetiky a mikrobiologie*.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Drauz, K. (1998): Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals – examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5, 1-11.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Britton, R. A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R., Grossman, A. D. (2002): Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 4881-4890.
- Brockmann-Gretza, O., Kalinowski, J. (2006): Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in presence and absence of the *rel* gene encoding (p)ppGpp synthase. *BMC Genom.* 7, 230.
- Brown, M., Ye, J., Rawson, R., Goldstein, J. (2000): Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell.* 100, 391-398.
- Burr, T., Mitchell, J., Kolb, A., Minchin, S., Busby, S. (2000): DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Res.* 28, 1864-1870.
- Busche, T. (2013): Analyse von Regulationsnetzwerken der *Extracytoplasmic Function* (ECF)-Sigmafaktoren in *Corynebacterium glutamicum*. Bielefeld, Dizertační práce, Der Universität Bielefeld, *Der Fakultät für Biologie*.
- Busche, T., Šilar, R., Pičmanová, M., Pátek, M., Kalinowski, J. (2012): Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genom.* 13, 445.
- Calamita, H., Ko, C., Tyagi, S., Yoshimatsu, T., Morrison, N. E., Bishai, W. R. (2005): The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. *Cell. Microbiol.* 7, 233-244.
- Campagne, S., Allain, F. H. T., Vorholt, J. A. (2015): Extra cytoplasmic function sigma factors, recent structural insights into promoter recognition and regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 30, 71-78.

Campagne, S., Damberger, F. F., Kaczmarczyk, A., Francez-Charlot, A., Allain, F. H.-T., Vorholt, J. A. (2012): Structural basis for sigma factor mimicry in the general stress response of Alphaproteobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, E1405-E1414.

Campagne, S., Marsh, M. E., Capitani, G., Vorholt, J. A., Allain, F. H. (2014): Structural basis for -10 promoter element melting by environmentally induced sigma factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 269-276.

Campbell, E. A., Greenwell, R., Anthony, J. R., Wang, S., Lim, L., Das, K., Sofia, H. J., Donohue, T. J., Darst, S. A. (2007): A conserved structural module regulates transcriptional responses to diverse stress signals in bacteria. *Mol. Cell.* 27, 793-805.

Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M. L., Darst, S. A. (2002): Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell.* 9, 527-539.

Campbell, E. A., Tupy, J. L., Gruber, T. M., Wang, S., Sharp, M. M., Gross, C. A., Darst, S. A. (2003): Crystal structure of *Escherichia coli* σ^E with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol. Cell.* 11, 1067-1078.

Campbell, E. A., Westblade, L. F., Darst, S. A. (2008): Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: A structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 121-127.

Cook, H., Ussery, D. W. (2013): Sigma factors in a thousand *E. coli* genomes. *Environ. Microbiol.* 15, 3121-3129.

Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., Brenner, S. E. (2004): WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188-1190.

Dainese, E., Rodrigue, S., Delogu, G., Provvedi, R., Laflamme, L., Brzezinski, R., Fadda, G., Smith, I., Gaudreau, L., Palù, G., Manganelli, R. (2006): Posttranslational regulation of *Mycobacterium tuberculosis* extracytoplasmic-function sigma factor σ^L and roles in virulence and in global regulation of gene expression. *Infect. Immun.* 74, 2457-2461.

Dartigalongue, C., Missiakas, D., Raina, S. (2001): Characterization of the *Escherichia coli* σ^E regulon. *J. Biol. Chem.* 276, 20866-20875.

Dickschat, J., Wickel, S., Bolten, C., Nawrath, T., Schultz, S., Wittmann, C. (2010): Pyrazine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 687-2695.

Donà, V., Rodrigue, S., Dainese, E., Palù, G., Gaudreau, L., Manganelli, R., Provvedi, R. (2008): Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor σ^E in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 190, 5963-5971.

Dostálová, H., Holátko, J., Busche, T., Rucká, L., Rapoport, A., Halada, P., Nešvera, J., Kalinowski, J., Pátek, M. (2017): Assignment of sigma factors of RNA polymerase to promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express.* 7, 133.

- Dutta, N. K., Mehra, S., Kaushal, D. (2010): A *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor network responds to cell-envelope damage by the promising anti-mycobacterial thioridazine. PLoS One. 5, e10069.
- Dvořáková, P. (2017): Vlastnosti expresních vektorů pro *Corynebacterium glutamicum* a jejich využití při studiu faktorů sigma RNA polymerasy. Praha, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, *Katedra genetiky a mikrobiologie*.
- Ehira, S., Shirai, T., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H. (2008): Group 2 sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation. Appl. Environ. Microbiol. 74, 5146-5152.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H. (2009): Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. J. Bacteriol. 191, 2964-2972.
- Eichenberger, P., Jensen, S. T., Conlon, E. M., van Ooij C., Silvaggi J., Gonzalez-Pastor J. E., Fujita, M., Ben-Yehuda, S., Stragier, P., Liu, J. S., Losick, R. (2003): The σ^E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 327, 945-972.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M., Schaffer, S. (2004): *clpC* and *clpPIP2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor σ^H . Mol. Microbiol. 52, 285-302.
- Fang, C., Li, L., Shen, L., Shi, J., Wang, S., Feng, Y., Zhang, Y. (2019): Structures and mechanism of transcription initiation by bacterial ECF factors. Nucleic Acids Res. 47, 7094-7104.
- Feklistov, A., Darst, S. A. (2011): Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase σ subunit. Cell. 147, 1257-1269.
- Fontán, P. A., Voskuil, M. I., Gomez, M., Tan, D., Pardini, M., Manganelli, R., Fattorini, L., Schoolnik, G. K., Smith, I. (2009): The *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor σ^B is required for full response to cell envelope stress and hypoxia *in vitro*, but it is dispensable for *in vivo* growth. J. Bacteriol. 191, 5628-5633.
- Gebhardt, H., Meniche, X., Tropis, M., Krämer, R., Daffé, M., Morbach, S. (2007): The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacterineae*. Microbiol. 153, 1424-1434.
- Geiduschek, E. P., Kassavetis, G. A. (2010): Transcription of the T4 late genes. Virol. J. 7, 288.
- Gruber, T. M., Gross, C. A. (2003): Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annu. Rev. Microbiol. 57, 441-466.
- Halgašová, N., Bukovska, G., Timko, J., Kormanec, J. (2001): Cloning and transcriptional characterization of two sigma factor genes, *sigA* and *sigB*, from *Brevibacterium flavum*. Curr. Microbiol. 43, 249-254.

- Hanahan, D. (1985): „Techniques for transformation of *E. coli*,“ in *DNA Cloning. A Practical Approach*. 1, 109-135.
- Hecker, M., Pané-Farré, J., Völker, U. (2007): SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 215-236.
- Helmann, J. D. (2002): The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* 46, 47-110.
- Helmann, J. D. (2016): *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* 30, 122-132.
- Hillion, M., Antelmann, H. (2015): Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biol. Chem.* 396, 415-444.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M., Engelhardt, H. (2008): Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 3963-3967.
- Holátko, J., Elišáková, V., Prouza, M., Sobotka, M., Nešvera, J., Pátek, M. (2009): Metabolic engineering of the L-valin biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *J. Biotechnol.* 139, 203-210.
- Holátko, J., Šilar, R., Rabatinová, A., Šanderová, H., Halada, P., Nešvera, J., Krásný, L., Pátek, M. (2012): Construction of *in vitro* transcription system for *Corynebacterium glutamicum* and its use in the recognition of promoters of different classes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 521-529.
- Chaney, M. K., Grande, R., Wigneshweraraj, S. R., Cannon, W., Casaz, P., Gallegos, M.-T., Schumacher, J., Jones, S., Elderkin, S., Dago, A. E., Morett, E., Buck, M. (2001): Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. *Genes Dev.* 15, 2282-2294.
- Chauhan, R., Ravi, J., Datta, P., Chen, T., Schnappinger, D., Bassler, K. E., Balázsi, G., Gennaro, M. L. (2016): Reconstruction and topological characterization of the sigma factor regulatory network of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Commun.* 7, 11062.
- Chen, C., Pan, J., Yang, X., Guo, C., Ding, W., Si, M., Zhang, Y., Shen, X., Wang, Y. (2016): Global transcriptomic analysis of the response of *Corynebacterium glutamicum* to vanillin. *PLoS One.* 11, 1-16.
- Chen, C., Pan, J., Yang, X., Xiao, H., Zhang, Y., Si, M., Shen, X., Wang, Y. (2017): Global transcriptomic analysis of the response of *Corynebacterium glutamicum* to ferulic acid. *Arch. Microbiol.* 119, 325-334.
- Cho, S., Yang, S., Rhie, H. (2012): The gene encoding the alternative thymidylate synthase ThyX is regulated by sigma factor SigB in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol. Lett.* 328, 157-165.

- Cho, B. K., Kim, D., Knight, E. M., Zengler, K., Palsson, B. O. (2014): Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: topology and functional states. *BMC Biol.* 12, 4.
- Choi, W. W., Park, S. D., Lee, S. M., Kim, H. B., Kim, Y., Lee, H. S. (2009): The *whcA* gene plays a negative role in oxidative stress response of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290, 32-38.
- Ikeda, M. (2003): Amino acid production processes. *Adv. Biochem. Eng.* 79, 2-35.
- Ikeda, M., Nakagawa, S. (2003): The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 99-109.
- Ikeda, M., Ohnishi, J., Hayashi, M., Mitsuhashi, S. (2006): A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 610-615.
- Ikeda, M., Baba, M., Tsukamoto, N., Komatsu, T., Mitsuhashi, S., Takeno, S. (2009): Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2806-2808.
- Jakob, K., Satorhelyi, P., Lange, C., Wendisch, V. F., Silakowski, B., Scherer, S., Neuhaus, K. (2007): Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *J. Bacteriol.* 189, 5582-5590.
- Jarlier, V., Nikaido, H. (1990): Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* 172, 1418-1423.
- Jiang, L. Y., Chen, S. G., Zhang, Y. Y., Liu, J. Z. (2013a): Metabolic evolution of *Corynebacterium glutamicum* for increased production of L-ornithine. *BMC Biotechnol.* 13, 47-57.
- Jiang, L. Y., Zhang, Y. Y., Li, Z., Liu, J. Z. (2013b): Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for increasing the production of L-ornithine by increasing NADPH availability. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 1143-1151.
- Jojima, T., Noburyu, R., Sasaki, M., Tajima, T., Suda, M., Yukawa, H., Inui, M. (2015): Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1165-1172.
- Jojima, T., Noburyu, R., Suda, M., Okino, S., Yukawa, H., Inui, M. (2016): Improving process yield in succinic acid production by cell recycling of recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Fermentation.* 2, 5.
- Jordan, S., Hutchings, M. I., Mascher, T. (2008): Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 107-146.
- Jorge, J. M., Leggewie, C., Wendisch, V. F. (2016): A new metabolic route for the production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* from glucose. *Amino Acids.* 48, 2519-2531.

Joshi, A. C., Kaur, P., Nair, R. K., Lele D. S., Nandicoori, V. K., Gopal, B. (2019): Selectivity among anti- σ factors by *Mycobacterium tuberculosis* ClpX influences intracellular levels of extracytoplasmic function σ factors. J. Bacteriol. 201, e00748-18.

Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkowski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., Tauch, A. (2003): The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. J. Biotechnol. 104, 5-25.

Kallscheuer, N., Vogt, M., Bott, M., Marienhagen, J. (2017): Functional expression of plant-derived O-methyltransferase, flavanone 3-hydroxylase, and flavonol synthase in *Corynebacterium glutamicum* for production of pterostilbene, kaempferol, and quercetin. J. Biotechnol. 258, 190-196.

Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T., Furuya, A. (1984): Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. J. Bacteriol. 159, 306-311.

Kawaguchi, H., Yoshihara, K., Hara, K. Y., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A. (2018): Metabolome analysis-based design and engineering of a metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum* to match rates of simultaneous utilization of D-glucose and L-arabinose. Microb. Cell. Fact. 17, 76.

Keilty, S., Rosenberg, M. (1987): Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. J. Biol. Chem. 262, 6389-6395.

Kim, H. T., Baritugo, K. A., Oh, Y. H., Hyun, S. M., Khang, T. U., Kang, K. H., Jung, S. H., Song, B. K., Park, K., Kim, I. K., Lee, M. O., Kam, Y., Hwang, Y. T., Park, S. J., Joo, J. C. (2018): Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the high-level production of cadaverine that can be used for the synthesis of biopolyamide 510. ACS Sustain. Chem. Eng. 6, 5296-5305.

Kim, H. T., Khang, T. U., Baritugo, K. A., Hyun, S. M., Kang, K. H., Jung, S. H., Song, B. K., Park, K., Oh, M. K., Kim, G. B., Kim, H. U., Lee, S. Y., Park, S. J., Joo, J. C. (2019): Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of glutaric acid, a C5 dicarboxylic acid platform chemical. Metab. Eng. 51, 99-109.

Kim, M. J., Yim, S. S., Choi, J. W., Jeong, K. J. (2016): Development of a potential stationary-phase specific gene expression system by engineering of SigB-dependent *cg3141* promoter in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 4473-4483.

Kim, S. Y., Lee, J., Lee, S. Y. (2015): Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. Biotech. Bioeng. 112, 416-421.

Kim, T. H., Park, J. S., Kim, H. J., Kim, Y., Kim, P., Lee, H. S. (2005): The *whcE* gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. Biochem. Biophys. Res. Commun. 337, 757-764.

- Kind, S., Neubauer, S., Becker, J., Yamamoto, M., Volkert, M., von Abendroth, G., Zelder, O., Wittmann, C. (2014): From zero to hero – production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 25, 113-123.
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957): Studies on the amino acid fermentation. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3, 193-205.
- Kirchner, O., Tauch, A. (2003): Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 287-299.
- Klein, G., Stupak, A., Biernacka, D., Wojtkiewicz, P., Lindner, B., Raina, S. (2016): Multiple transcriptional factors regulate transcription of the *rpoE* gene in *Escherichia coli* under different growth conditions and when the lipopolysaccharide biosynthesis is defective. *J. Biol. Chem.* 291, 22999-23019.
- Knoppová, M., Phensajjai, M., Veselý, M., Zemanová, M., Nešvera, J., Pátek, M. (2007): Plasmid vectors for testing *in vivo* promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. *Curr. Microbiol.* 55, 234-239.
- Koo, B.-M., Rhodius, V. A., Campbell, E. A., Gross, C. A. (2009): Dissection of recognition determinants of *Escherichia coli* σ^{32} suggests a composite -10 region with an “extended -10” motif and a core -10 element. *Mol. Microbiol.* 72, 815-829.
- Krubasik, P., Takaichi, S., Maoka, T., Kobayashi, M., Masamoto, K., Sandmann, G. (2001): Detailed biosynthetic pathway to decaprenoxanthin diglucoside in *Corynebacterium glutamicum* and identification of novel intermediates. *Arch. Microbiol.* 176, 217-223.
- Lane, W. J., Darst, S. A. (2006). The structural basis for promoter -35 element recognition by the group IV sigma factors. *PLoS Biol.* 4, e269.
- Larisch, C., Nakunst, D., Hüser, A. T., Tauch, A., Kalinowski, J. (2007): The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Genom.* 8, 4.
- Leibman, M., Hochschild, A. (2007): A σ -core interaction of the RNA polymerase holoenzyme that enhances promoter escape. *EMBO J.* 26,1579-1590.
- Leuchtenberger, W. (1996): Amino acids – technical production and use. In: Rehm, H. J., Pühler, A., Reed, G., Stadler, P. J. W. (Eds.), *Biotechnology*, vol. 6. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, pp. 465-502.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., Drauz, K. (2005): Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 1-8.
- Li, L., Fang, C., Zhuang, N., Wang, T., Zhang, Y. (2019): Structural basis for transcription initiation by bacterial ECF σ factors. *Nat. Commun.* 10, 1153.

- Li, W., Bottrill, A. R., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Paget, M. S., Kleanthous, C. (2003): The role of zinc in the disulphide stress-regulated anti-sigma factor RsrA from *Streptomyces coelicolor*. *J. Mol. Biol.* 333, 461-472.
- Li, Z., Shen, Y. P., Jiang, X. L., Feng, L. S., Liu, J. Z. (2018): Metabolic evolution and a comparative omics analysis of *Corynebacterium glutamicum* for putrescine production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 45, 123-139.
- Luo, Y., Helmann, J. D. (2009): Extracytoplasmic function sigma factors with overlapping promoter specificity regulate sublancin production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191, 4951-4958.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2012): RNA synthesis: Transcription. In: Brock biology of microorganisms (13th edition). Benjamin Cummings, San Francisco, 170-173.
- Maillard, A. P., Girard, E., Ziani, W., Petit-Härtlein, I., Kahn, R., Coves, J. (2014): The crystal structure of the anti- σ factor CnrY in complex with the σ factor CnrH shows a new structural class of anti- σ factors targeting extracytoplasmic function σ factors. *J. Mol. Biol.* 426, 2313-2327.
- Manganelli, R., Provvedi, R., Rodrigue S., Beaucher, J., Gaudreau, L., Smith, I. (2004): Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 186, 895-902.
- Marchand, C. H., Salmeron, C., Bou Raad, R., Ménéche, X., Chami, M., Masi, M., Blanot, D., Daffé, M., Tropis, M., Huc, E., Le Maréchal, P., Decottignies, P., Bayan, N. (2011): Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 194, 587-597.
- Marrakchi, H., Lanéelle, M. A., Daffé, M. (2014): Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* 21, 67-85.
- Mascher, T. (2013): Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 148-155.
- Mekler, V., Kortkhonjia, E., Mukhopadhyay, J., Knight, J., Revyakin, A., Kapanidis, A. N., Niu, W., Ebright, Y. W., Levy, R., Ebright, R. H. (2002): Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell.* 108, 599-614.
- Murakami, K. S., Masuda, S., Darst, S. A. (2002): Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science.* 296, 1280-1284.
- Nakunst, D., Larisch, C., Hüser, A. T., Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J. (2007): The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stressrelated genes. *J. Bacteriol.* 189, 4696-4707.

- Nishimura, T., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H. (2011): Gene expression profiling of *Corynebacterium glutamicum* during anaerobic nitrate respiration: induction of the SOS response for cell survival. *J. Bacteriol.* 193, 1327-1333.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., Rhodius, V. A. (2006): Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ^{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev.* 20, 1776-1789.
- Ogura, M., Asai, K. (2016): Glucose induces ECF sigma factor genes, *sigX* and *sigM*, independent of cognate anti-sigma factors through acetylation of CshA in *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 7, 1918.
- Olvera, L., Mendoza-Vargas, A., Flores, N., Olvera, M., Sigala, J. C., Gosset, G., Morett, E., Bolívar, F. (2009): Transcription analysis of central metabolism genes in *Escherichia coli*. Possible roles of σ^{38} in their expression, as a response to carbon limitation. *PLoS One.* 4, e7466.
- Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T., Furuya, A. (1984): Functional expression of genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* 96, 175-178.
- Österberg, S., del Peso-Santos, T., Shingler, V. (2011): Regulation of alternative sigma factor use. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 37-55.
- Paget, M. (2015): Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules.* 5, 1245-1265.
- Park, S. D., Youn, J. W., Kim, Y. J., Lee, S. M., Kim, Y., Lee, H. S. (2008): *Corynebacterium glutamicum* σ^E is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti- σ factor CseE. *Microbiol.* 154, 915-923.
- Pátek, M. (2005): Regulation of gene expression. In: Eggeling, L., Bott, M. (2005): *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, 86-87.
- Pátek, M., Nešvera, J. (2011): Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 154, 101-113.
- Pátek, M., Nešvera, J. (2013): Promoters and plasmid vectors of *Corynebacterium glutamicum*. In: Yukawa, H., Inui, M. (Eds) *Corynebacterium glutamicum*. Microbiology Monographs, Springer Verlag, pp. 51-88.
- Pawelczyk, J., Kremer, L. (2014): The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis. In: Hatfull, G. F., Jacobs, W. R. (2014): *Molecular genetics of mycobacteria* 2ND Ed. ASM Press, Washington DC, 611-634.
- Pfeifer-Sancar, K., Mentz, A., Rückert, C., Kalinowski, J. (2013): Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *BMC Genom.* 14, 888.
- Portevin, D., De Sousa-D'auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M., Guilhot, C. (2004): A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic

acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 314-319.

Qiu, J., Helmann, J. D. (2001): The -10 region is a key promoter specificity determinant for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function σ factors σ^X and σ^W . J. Bacteriol. 183, 1921-1927.

Radek, A., Tenhaef, N., Müller, M. F., Brüsseler, C., Wiechert, W., Marienhagen, J., Polen, T., Noack, S. (2017): Miniaturized and automated adaptive laboratory evolution: evolving *Corynebacterium glutamicum* towards an improved D-xylose utilization. Biores. Technol. 245, 1377-1385.

Raman, S., Hazra, R., Dascher, C. C., Husson, R. N. (2004): Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence. J. Bacteriol. 186, 6605-6616.

Raman, S., Puyang, X., Cheng, T. Y., Young, D. C., Moody, D. B., Husson R. N. (2006): *Mycobacterium tuberculosis* SigM positively regulates Esx secreted protein and nonribosomal peptide synthetase genes and down regulates virulence-associated surface lipid synthesis. J. Bacteriol. 188, 8460-8468.

Ramaniuk, O., Černý, M., Krásný, L., Vohradský, J. (2017): Kinetic modelling and meta-analysis of the *B. subtilis* SigA regulatory network during spore germination and outgrowth. Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 1860, 894-904.

Rappas, M., Bose, D., Zhang, X. (2007): Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking σ^{54} -dependent gene transcription. Curr. Opin. Struct. Biol. 17, 110-116.

Rezuchova, B., Kormanec, J. (2001): A two-plasmid system for identification of promoters recognized by RNA polymerase containing extracytoplasmic stress response σ^E in *Escherichia coli*. J. Microbiol. Methods. 45, 103-111.

Rezuchova, B., Miticka, H., Homerova, D., Roberts, M., Kormanec, J. (2003): New members of the *Escherichia coli* sigmaE regulon identified by a two-plasmid system. FEMS Microbiol. Lett. 225, 1-7.

Ross, W., Thompson, J. F., Newlands, J. T., Gourse, R. L. (1990): *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. EMBO J. 9, 3733-3742.

Ross, W., Ernst, A., Gourse, R. L. (2001): Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions alpha subunit binding to the UP element minor groove. Genes Dev. 15, 491-506.

Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A. K., Singh, Y. (2010): The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. FEBS J. 277, 605-626.

Santamaría, R., Gil, J. A., Mesas, J. M., Martín, J. F. (1984): Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. J. Gen. Microbiol. 130, 2237-2246.

- Seeburg, P. H., Nüsslein, C., Schaller, H. (1977): Interaction of RNA polymerase with promoters from bacteriophage fd. *Eur. J. Biochem.* 74, 107-113.
- Seo, J. H., Hong, J. S., Kim, D., Cho, B. K., Huang, T. W., Tsai, S. F., Palsson, B. O., Charusanti, P. (2012): Multiple-omic data analysis of *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 reveals its transcriptional architecture and regulatory features. *BMC Genom.* 13, 679.
- Serizawa, M., Yamamoto, H., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Sekiguchi, J. (2004): Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene.* 329, 125-136.
- Shin, J. H., Park, S. H., Oh, Y. H., Choi, J. W., Lee, M. H., Cho, J. S., Jeong, K. J., Joo, J. C., Yu, J., Park, S. J., Lee, S. Y. (2016): Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for enhanced production of 5-aminovaleric acid. *Microb. Cell Fact.* 15, 174.
- Schröder, J., Tauch, A. (2010): Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 685-737.
- Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., Hornischer, K., Bruchmann, S., Düvel, J., Häussler, S. (2015): Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog.* 11, e1004744.
- Schwartz, E. C., Shekhtman, A., Dutta, K., Pratt, M. R., Cowburn, D., Darst, S., Muir, T. W. (2008): A full-length group 1 bacterial sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding. *Chem. Biol.* 15, 1091-1103.
- Snustad, D., Simmons, M. J., (2009): Transkripce a úpravy RNA. In: Genetika. Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno, 293-296.
- Song, T., Song, S. E., Raman, S., Anaya, M., Husson, R. N. (2008): Critical role of a single position in the -35 element for promoter recognition by *Mycobacterium tuberculosis* SigE and SigH. *J. Bacteriol.* 190, 2227-2230.
- Song, Y., Matsumoto, K., Tanaka, T., Kondo, A., Taguchi, S. (2013): Single-step production of polyhydroxybutyrate from starch by using α -amylase cell-surface displaying system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 12-14.
- Souček, A. (1996): Nepravidelné nesporeující aerobní bakterie. In: Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (1996): Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha, 298-302.
- Staroń, A., Sofia, H. J., Dietrich, S., Ulrich, L. E., Liesegang, H., Mascher, T. (2009): The third pillar of bacterial signal transduction: Classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol. Microbiol.* 74, 557-581.
- Stäbler, N., Oikawa, T., Bott, M., Eggeling, L. (2011): *Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-amino acids. *J. Bacteriol.* 193, 1702-1709.

- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Ševčíková, B., Mazuráková, V., Kormanec, J. (2005): Characterization of the alternative sigma factor σ^G in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Folia Microbiol.* 50, 47-58.
- Šilar, R. (2007): Promotory *Corynebacterium glutamicum* regulované alternativními sigma faktory RNA polymerasy. Praha, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, *Katedra genetiky a mikrobiologie*.
- Šilar, R., Holátko, J., Rucká, L., Rapoport, A., Dostálová, H., Kadeřábková, P., Nešvera, J., Pátek, M. (2016): Use of *in vitro* transcription system for analysis of *Corynebacterium glutamicum* promoters recognized by two sigma factors. *Curr. Microbiol.* 73, 401-408.
- Taniguchi, H., Wendisch, V. F. (2015): Exploring the role of sigma factor gene expression on production by *Corynebacterium glutamicum*: sigma factor H and FMN as example. *Front. Microbiol.* 6, 740.
- Taniguchi, H., Henke, N. A., Heider, S. A. E., Wendisch, V. F. (2017a): Overexpression of the primary sigma factor gene *sigA* improved carotenoid production by *Corynebacterium glutamicum*: Application to production of β -carotene and the non-native linear C50 carotenoid bisanhydrobacterioruberin. *Metab. Eng. Commun.* 4, 1-11.
- Taniguchi, H., Busche, T., Patschowski, T., Niehaus, K., Pátek, M., Kalinowski, J., Wendisch, V. F. (2017b): Physiological roles of sigma factor SigD in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol.* 17, 158.
- Thakur, K. G., Joshi, A. M., Gopal, B. (2007): Structural and biophysical studies on two promoter recognition domains of the extra-cytoplasmic function sigma factor σ^C from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 282, 4711-4718.
- Toyoda, K., Teramoto, H., Yukawa, H., Inui, M. (2015): Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor σ^H in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 197, 483-496.
- Toyoda, K., Inui, M. (2016a): The extracytoplasmic function σ factor σ^C regulates expression of a branched quinol oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 100, 486-509.
- Toyoda, K., Inui, M. (2016b): Regulons of global transcription factors in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 45-60.
- Toyoda, K., Inui, M. (2018): Extracytoplasmic function sigma factor σ^D confers resistance to environmental stress by enhancing mycolate synthesis and modifying peptidoglycan structures in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 107, 312-329.
- Van der Rest, M. E., Lange, C., Molenaar, D. (1999): A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 541-545.

- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. (2007): Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol.* 71, 495-548.
- Vogt, M., Haas, S., Klaffl, S., Polen, T., Eggeling, L., van Ooyen, J., Bott, M. (2014): Pushing product formation to its limit: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucin overproduction. *Metab. Eng.* 22, 40-52.
- Voskuil, M., Chambliss, G. (2002): The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. *J. Mol. Biol.* 322, 521-532.
- Vuthoori, S., Bowers, C. W., McCracken, A., Dombroski, A. J., Hinton, D. M. (2001): Domain 1.1 of the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase modulates the formation of stable polymerase/promoter complexes. *J. Mol. Biol.* 309, 561-572.
- Wade, J. T., Roa, D. C., Grainger, D. C., Hurd, D., Busby, S. J. W., Struhl, K., Nudler, E. (2006): Extensive functional overlap between σ factors in *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 806-814.
- Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P. C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K., Buck, M. (2008): Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the σ^{54} promoter-specificity factor. *Mol. Microbiol.* 68, 538-546.
- Wösten, M. M. (1998): Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 127-150.
- Xafenias, N., Kmezik, C., Mapelli, V. (2016): Cathodes enhance *Corynebacterium glutamicum* growth with nitrate and promote acetate and formate production. *Biores. Technol.* 216, 105-113.
- Yamada, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T., Aida, K. (1972): The Microbial production of amino acids. Kodansha Ltd., Tokyo.
- Yamamoto, S., Suda, M., Niimi, S., Inui, M., Yukawa, H. (2013): Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2938-2948.
- Yang, Y., Shi, F., Tao, G., Wang, X. (2012): Purification and structural analysis of mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol.* 50, 235-240.
- Yim, S. S., An, S. J., Choi, J. W., Ryu, A. J., Jeong, K. J. (2014): High-level secretory production of recombinant single-chain variable fragment (scFv) in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 273-284.
- Yim, S. S., Choi, J. W., Lee, R. J., Lee, Y. J., Lee, S. H., Kim, S. Y., Jeong, K. J. (2016): Development of a new platform for secretory production of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 163-172.
- Yukawa, H., Omumasaba, C. A., Nonaka, H., Kos, P., Okai, N., Suzuki, N., Suda, M., Tsuge, Y., Watanabe, J., Ikeda, Y., Vertes, A. A., Inui, M. (2007): Comparative analysis

of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. Microbiol. 153, 1042-1058.

Zdanowski, K., Doughty, P., Jakimowicz, P., O'Hara, L., Buttner, M. J., Paget, M. S. B., Kleanthous, C. (2006): Assignment of the zinc ligands in RsrA, a redox-sensing ZAS protein from *Streptomyces coelicolor*. Biochemistry. 45, 8294-8300.

Zhang, Y., Feng, Y., Chatterjee, S., Tuske, S., Ho, M. X., Arnold, E., Ebright, R. H. (2012): Structural basis of transcription initiation. Science. 338, 1076-1080.

Zielinski, N. A., Maharaj, R., Roychoudhury, S., Danganan, C. E., Hendrickson, W., Chakrabarty, A. M. (1992): Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: environmental regulation of the *algC* promoter. J. Bacteriol. 174, 7680-7688.

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., Daffe', M. (2008): Direct visualization of the outer membrane of *mycobacteria* and *corynebacteria* in their native state. J. Bacteriol. 190, 5672-5680.