

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Jan Blumenstein

Hybridní faktory sigma RNA polymerasy *Corynebacterium glutamicum*

Hybrid sigma factors of RNA polymerase *Corynebacterium glutamicum*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Štěpánek, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 9.8. 2019

Podpis:

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především svému školiteli RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. za jeho odborné vedení, praktické připomínky, vstřícný přístup a trpělivost při zpracování této diplomové práce.

Stejně tak bych chtěl poděkovat vedoucímu Laboratoře molekulární genetiky bakterií MBÚ AV ČR, v.v.i Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. i ostatním svým kolegům z tohoto pracoviště za přínosné rady, pomoc při řešení problémů a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat i svým rodičům za obrovskou podporu a trpělivost během celého mého studia.

Abstrakt

Corynebacterium glutamicum je grampozitivní nesporulující půdní bakterie využívaná v průmyslu jako producent aminokyselin, nukleotidů, biopaliv a alkoholů. Cílem této práce bylo vytvořit hybridní faktor σ , který jako podjednotka RNA polymerázy bude rozpoznávat pouze příslušný hybridní promotor, takže neovlivní expresi hostitelských genů. Na základě aminokyselinových sekvencí faktorů σ^D a σ^H byly kombinací sekvencí genů navrženy 2 typy hybridních faktorů, σ^{DH} a σ^{HD} . Jako alternativa hybridních molekul σ^{DH} a σ^{HD} byly dále na základě *in silico* homologního modelování vneseny mutace do přirozeného faktoru σ^H v oblasti rozpoznávající -35 element σ^H -dependentního promotoru. Hybridní promotory byly vytvořeny kombinací promotorových oblastí -35 a -10, které pocházely ze σ^D - a σ^H -dependentních promotorů. Stanovení aktivity promotorů s použitím fluorescence reportérového proteinu GFPuv prokázalo, že exprese genu *gfpuv* pod kontrolou sledovaného hybridního promotoru v kmenech s hybridními faktory σ^{DH} a σ^{HD} byla nízká ve srovnání s kmeny, které nesly přirozený faktor σ a příslušný promotor. Při použití jednoho z mutantních faktorů σ^H ($\sigma^{\text{mutH-6A}}$) se záměnami v oblasti rozpoznávající element -35 σ^H -dependentních promotorů došlo ke specifické transkripci z hybridního promotoru *PsigDH* a tedy dosažení cíle.

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

Abstract

Corynebacterium glutamicum is a Gram-positive non-sporulating soil bacterium which is used in biotechnology as a producer of amino acids, nucleotides, biofuels and alcohols. The aim of this thesis was to create a hybrid σ factor of RNA polymerase which would be able to recognize a matching hybrid promoter without effect on expression of the host genes. Based on the σ^D and σ^H amino acid sequence, two types of hybrid factors, σ^{DH} and σ^{HD} , were designed by the sequence combination of *sigD* and *sigH*. As an alternative approach, based on the *in silico* homology modeling, mutations of wild-type σ^H in the region recognizing the -35 promoter element of the σ^H -dependent promoter were introduced. Hybrid promoters were constructed by combining the -35 and -10 promoter regions that were derived from the σ^D - and σ^H -dependent promoters. Promoter activity was determined by using *gfpuv* reporter gene under the control of hybrid promoter. The expression of *gfpuv* in strains with hybrid sigma factors σ^{DH} / σ^{HD} and hybrid promoters was rather low compared to strains that carried wild-type σ factor and the respective promoter. The aim of the thesis was achieved by using one of the mutant σ^H factor (σ^{mutH_6A}) with alterations in the region recognizing the -35 element of the σ^H -dependent promoter. This mutant σ factor selectively drove transcription of the reporter gene from the hybrid *PsigDH* promoter.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, sigma factor, promoter

Seznam zkratek

anti- σ – faktor anti-sigma

AT bohatá oblast – oblast bohatá na adenin a thymin

ATP – adenosintrifosfát

AU (*arbitrary unit*) – bezrozměrná arbitrální jednotka

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

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

C – cytosin

Clp – Crp-like protein

ClpB – Crp-like protein B

CopC – Cop rezistence protein C

CseE – Cold shock protein E

ddH₂O – destilovaná a deionizovaná voda

dH₂O – destilovaná voda

dNTP – deoxyribonukleosidtrifosfát

dsDNA - dvouřetězcová DNA

ECF (*extracytoplasmatic factor*) – faktor σ s extracytoplasmatickou funkcí

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EtOH – etanol

G – guanin

GFP (*green fluorescent protein*) – zelený fluorescenční protein

GRAS (*generally recognised as a safe*) – obecně považován za bezpečný

HTH – proteinový motiv helix-turn-helix

IHF (*integration host factor*) – integrační hostitelský faktor

IPTG – izopropyl- β -D-thiogalaktosid

K – lysin

Kpb – tisíc párů bází

kDa – tisíc daltonů

M – adenin/cytosin

N – pozice pro jakýkoliv nukleotid v sekvenci nukleové kyseliny

NCR (*non-conserved region*) – nekonzervovaná oblast

NDP – nukleosiddifosfát

NTP – nukleosidtrifosfát
OD – optická denzita
pb – pár bází
PCR (*polymerase chain reaction*) – polymerázová řetězová reakce
PEG - polyethylenglykol
PMSF – fenylmethylsulfonyl fluorid
R – adenin/guanin
rpm – počet otáček za minutu
SDS – sodiumdodecylsulfát
T – thymin
TBE – Tris-borát-EDTA pufr
TrxB – Thioredoxin B
TrxB1 – Thioredoxin B1
TrxC – Thioredoxin C
UAS (*upstream activation sequence*) – sekvence vazby aktivátoru
UP element – *upstream promoter element*
uvrA (*UV resistance A*) – gen kódující podjednotku A endonukleázy UvrABC
uvrC (*UV resistance C*) – gen kódující podjednotku C endonukleázy UvrABC
uvrD3 (*UV resistance D3*) – gen pro UvrD3 helikázu
W – adenin/thymin
x g – násobek tíhového zrychlení
Y – cytosin/thymin
YT (*yeast trypton*) – médium obsahující kvasinkový extrakt a trypton
 Δ (*delta*) – deleční kmen

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Corynebacterium glutamicum	3
3.2	Transkripce	4
3.3	Bakteriální RNA polymeráza	4
3.4	Bakteriální promotory	6
3.5	Faktory σ	7
3.5.1	Rodina faktorů σ^{70}	8
3.5.2	Rodina faktorů σ^{54}	9
3.5.3	Faktory sigma <i>Corynebacterium glutamicum</i>	11
3.5.3.1	Faktor σ^A	11
3.5.3.2	Faktor σ^B	11
3.5.3.3	Faktor σ^C	12
3.5.3.4	Faktor σ^D	13
3.5.3.5	Faktor σ^E	14
3.5.3.6	Faktor σ^H	14
3.5.3.7	Faktor σ^M	15
3.5.4	Hybridní faktory sigma	15
4	Materiál a metody	17
4.1	Bakteriální kmeny	17
4.2	DNA a plazmidy	17
4.2.1	Primery pro PCR a sekvenování	17
4.2.2	Oligonukleotidy pro vzájemnou asociaci.....	17
4.2.3	DNA markery	17
4.2.4	Plazmidy	18

4.2.4.1	pEPR1	18
4.2.4.2	pEC-XT99A.....	19
4.2.4.3	pMA-RQ.....	20
4.3	Kultivační média.....	20
4.4	Pufry.....	20
4.5	Chemikálie	21
4.6	Komerční soupravy	22
4.7	Přístrojové vybavení.....	22
4.8	Software.....	22
4.9	Metody	23
4.9.1	Elektroforéza DNA v agarózových gelech	23
4.9.2	Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu	23
4.9.3	Miniizolace plazmidové DNA	24
4.9.4	Příprava vzorku na sekvenování	25
4.9.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	25
4.9.6	Asociace syntetických komplementárních oligonukleotidů.....	26
4.9.7	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	27
4.9.8	Přečištění lineární DNA pomocí komerční soupravy	27
4.9.9	Ligace DNA	28
4.9.10	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	28
4.9.11	Transformace <i>E. coli</i> (Hanahan, 1983).....	28
4.9.12	Příprava kompetentních buněk <i>C. glutamicum</i>	29
4.9.13	Transformace <i>C. glutamicum</i> pomocí elektroporace	30
4.9.14	Měření fluorescence <i>C. glutamicum</i> v bezbuněčném extraktu	30
5	Výsledky	33
5.1	Design hybridních faktorů sigma a hybridních promotorů	33

5.2	Konstrukce plazmidů s hybridními promotory pEPR1P <i>sigDH</i> a pEPR1P <i>sigHD</i>	34
5.3	Příprava plazmidů s hybridními faktory sigma, pEC-XT99A <i>sigDH</i> a pEC-XT99A <i>sigHD</i>	36
5.4	Vytvoření dvouplazmidových kmenů a analýza aktivity promotorů	37
5.4.1	Příprava a ověření dvouplazmidových kmenů	37
5.4.2	Aktivita hybridních promotorů řízená hybridními faktory sigma.....	38
5.4.3	Aktivita promotorů řízených modifikovanými faktory σ^H	42
6	Diskuze	47
7	Souhrn	51
8	Seznam použité literatury	52

1 Úvod

Corynebacterium glutamicum je grampozitivní nesporeující půdní bakterie patřící mezi aktinomycey. Jedná se o ideální model pro studium grampozitivních bakterií, jelikož je snadno kultivovatelným mikroorganismem a na rozdíl od řady příbuzných druhů rodu *Corynebacterium* není patogenní. Expresní systémy založené na *C. glutamicum* jsou využívány v průmyslu k produkci aminokyselin, nukleotidů, biopaliv, alkoholů i heterologních proteinů.

Stejně jako u ostatních bakterií je iniciace transkripce *C. glutamicum* závislá na rozpoznání -35 a -10 promotorové oblasti pomocí faktoru sigma RNA polymerázy. U *C. glutamicum* se nacházejí 3 skupiny faktorů sigma. První skupinu zastupuje vegetativní faktor σ^A , jenž je zodpovědný za transkripci genů uplatňujících se v exponenciální fázi růstu. Druhou skupinu zastupuje alternativní faktor σ^B , který zajišťuje transkripci genů zejména během přechodu z exponenciální fáze růstu do stacionární. Poslední skupinou jsou faktory sigma s extracytoplazmatickou funkcí (ECF) σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M , které se uplatňují při odpovědi na buněčný stres.

V této práci byly kombinací částí genů pro σ^D a σ^H pomocí modelu těchto faktorů sigma *in silico* navrženy 2 typy hybridních faktorů σ a poté na základě *in silico* homologního modelování metodou molekulární dynamiky i formy přirozeného faktoru σ^H s mutací v oblasti rozpoznávající -35 promotorovou oblast. Předpokladem bylo, že tyto faktory budou rozpoznávat pouze příslušné hybridní promotory a zároveň nebudou ovlivňovat expresi hostitelských genů. Takový model by byl vhodný nejen k prohloubení znalostí o specifitě vazby faktoru σ k jeho příslušnému promotoru, ale i pro tvorbu nových striktně specifických expresních systémů využitelných v biotechnologiích.

2 Cíle práce

- Zkonstruovat rekombinantní plazmidy pEPR1P*sigDH* a pEPR1P*sigHD* nesoucí hybridní promotory P*sigDH* a P*sigHD* v transkripční fúzi s reportérovým genem *gfpuv*.
- Zkonstruovat rekombinantní plazmidy pECXT99A*sigDH* a pEC-XT99A*sigHD* nesoucí geny *sigDH* a *sigHD* kódující hybridní faktory σ
- Vytvořit dvouplazmidové systémy:
 - C. glutamicum* (pEC-XT99A*sigDH* + pEPR1P*sigDH*)
 - C. glutamicum* (pEC-XT99A*sigDH* + pEPR1P*sigHD*)
 - C. glutamicum* (pEC-XT99A*sigHD* + pEPR1P*sigDH*)
 - C. glutamicum* (pEC-XT99A*sigHD* + pEPR1P*sigHD*)
- Testovat specifickou aktivitu hybridních promotorů při nadprodukcii příslušných hybridních faktorů σ s použitím transkripční fúze s reportérovým genem *gfpuv*.

3 Literární přehled

3.1 *Corynebacterium glutamicum*

Nepatogenní grampozitivní půdní bakterie *Corynebacterium glutamicum* patřící do kmene *Actinomycetales* a skupiny *Mycolata* díky přítomnosti mykologických aminokyselin ve své buněčné stěně byla objevena v roce 1957 jakožto přirozený producent kyseliny L-glutamové (Kinoshita *et al.*, 1957). Jedná se o aerobní nepohyblivou bakterii kyjovitého tvaru, která je však schopna růst i v anaerobních a mikroaerobních podmínkách (Ikeda *et al.*, 2009). Postupem času se ukázalo, že *C. glutamicum* může být průmyslově využita i pro nadprodukcii dalších aminokyselin, jako jsou L-alanin (Jojima *et al.*, 2010), L-arginin (Park *et al.*, 2014), L-lysin (Becker *et al.*, 2011) či L-valin (Hasegawa *et al.*, 2013). Mezi další látky, které jsou s použitím *C. glutamicum* průmyslově produkovány, patří etanol (Jojima *et al.*, 2015), izobutanol (Yamamoto *et al.*, 2013), 1-propanol a 1,2-propandiol (Siebert a Wendisch, 2015) či organické kyseliny, a to mléčná (Okino *et al.*, 2005), ketoglutarová (Jo *et al.*, 2012), glykolová (Zahoor *et al.*, 2014) a 2-ketoizovalerová (Buchholz *et al.*, 2013).

C. glutamicum patří mezi mikroorganismy označované GRAS (*generally recognised as a safe*). Snadno se kultivuje a po optimalizaci minimálního média roste do vysokých denzit (Lee *et al.*, 2016). Tyto vlastnosti spolu s nízkou aktivitou buněčných proteáz, slabými restrikčně modifikačními systémy a vysokou genetickou stabilitou činí z *C. glutamicum* ideální expresní systém pro produkci heterologních proteinů (Nakamura *et al.*, 2003; Vertès *et al.*, 1993). Navíc umožňuje sekreci správně sbaleného heterologního proteinu přímo do kultivačního média (Yim *et al.*, 2014). Mezi proteiny, které již jsou průmyslově produkovány v expresních systémech založených na *C. glutamicum*, patří lidský epidermální růstový faktor (Date *et al.*, 2006), α -amylázy kmenů *Bacillus amyloliquefaciens* nebo *Streptomyces griseus* (Cadenas *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1986), ovčí interferon γ (Billman-Jacobe *et al.*, 1994), proteáza z *Bacillus subtilis* (Billman-Jacobe *et al.*, 1995), a xylanáza či celúazy kmenů *Streptomyces halstedii* (Adham *et al.*, 2001).

Kromě produkce zmiňovaných látek disponuje díky své schopnosti degradovat toxické látky jako např. fenol (Brinkrolf *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2005) bioremediačním potenciálem.

Genom *C. glutamicum* o velikosti 3 280 Kpb je poměrně bohatý na G+C páry (54 %) a podle jedné z anotací obsahuje 3002 kódujících sekvencí (Kalinowski *et al.*, 2003). Stanovení kompletní nukleotidové sekvence genomu umožnilo rozšíření biotechnologického potenciálu této bakterie. Pro další využití při genových manipulacích jsou u *C. glutamicum* zaváděny i nové techniky, jako je např. editace genomu pomocí systému CRISPR/cas9 (Wang *et al.*, 2018).

3.2 Transkripce

Transkripce je přepis genetické informace z DNA do RNA, který je katalyzován RNA polymerázou.

RNA polymeráza během iniciace vyhledává promotor na templátu DNA za pomoci podjednotky σ (faktoru σ), přičemž vzniká uzavřený komplex. Následuje tání -10 promotorové oblasti, což vede k rozdělení dvoušroubovice DNA a vzniku otevřeného komplexu. Templátové vlákno DNA se tak dostává do aktivního místa RNA polymerázy a dochází k opakované syntéze krátkých úseků RNA o délce 2 až 15 nukleotidů (abortivní iniciace).

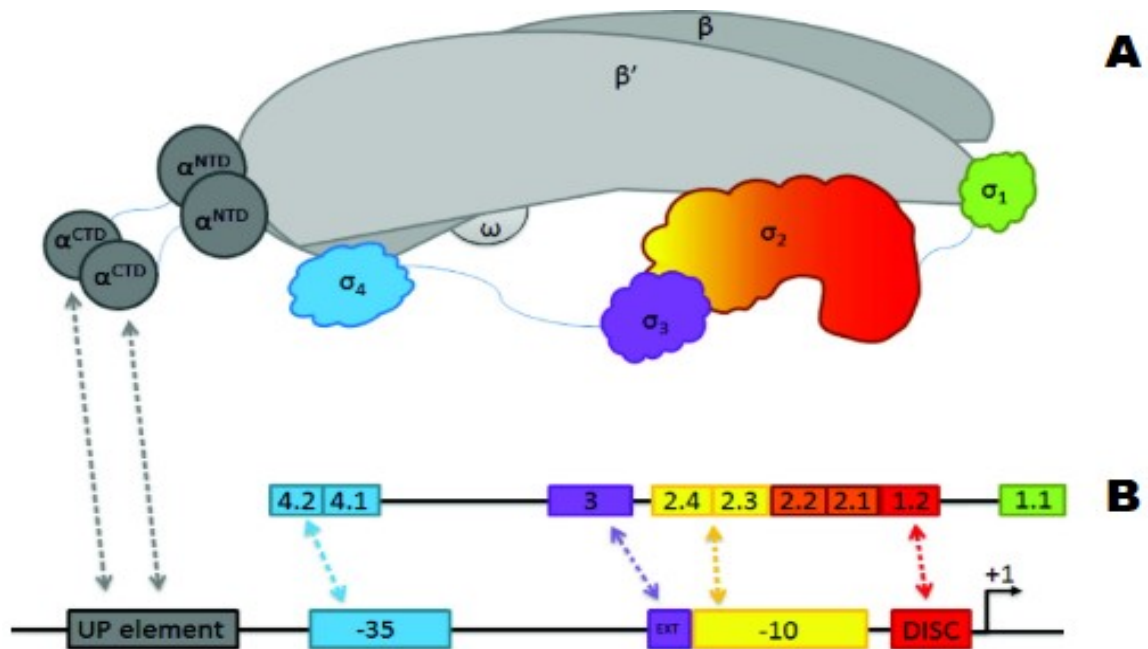
Po disociaci faktoru σ může jádro RNA polymerázy nasyntetizovat kompletní transkript během elongační fáze. Elongace probíhá v místě lokálního rozvinutí DNA zvaného transkripční bublina. Během ní RNA polymeráza postupně rozvíjí dvoušroubovici DNA a syntetizuje řetězec RNA, který je průběžně vytěšňován z transkripční bubliny.

Po elongaci následuje fáze terminace, kdy dojde k uvolnění vzniklého transkriptu. Terminace může být buď ρ -závislá, kdy k uvolnění transkriptu dochází pomocí ATPázy zvané faktor ρ , nebo ρ -nezávislá, kdy uvolnění vzniklého řetězce RNA umožní vlásenka bohatá na GC páry následovaná oblastí bohatou na uracil.

3.3 Bakteriální RNA polymeráza

RNA polymeráza je enzym zodpovědný za transkripci. Kompletní holoenzym RNA polymerázy se skládá z jádra enzymu o celkové molekulové hmotnosti 370 kDa ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) a podjednotky faktoru σ (Obr. 1) (Murakami a Darst, 2003). Jádro RNA polymerázy je konzervováno v bakteriálních, archaeálních i eukaryotních organizmech (Ebright, 2000). Na rozdíl od eukaryotní RNA polymerázy má katalytické jádro bakteriální RNA polymerázy samo o sobě afinitu k templátu DNA a

nepotřebuje další pomocné obecné transkripční faktory jako RNA polymerázy eukaryotických organismů.



Obrázek 1. Holoenzym RNA polymerázy a faktor σ rozpoznávající promotor.
A) Holoenzym RNA polymerázy. Tmavě šedou barvou je zobrazena podjednotka α interagující pomocí své C-terminální domény s UP elementem. Světle šedou barvou jsou zobrazeny podjednotky β , β' a ω . Podjednotka σ je schematicky zobrazena čtyřmi spojenými doménami (světle modrá doména σ_4 , tmavě modrá doména σ_3 , červeno-žlutá doména σ_2 a zelená doména σ_1). **B) Schéma domén faktoru σ interagujících s promotorem.** Šedivou barvou je zobrazen UP element. Světle modrou barvou má -35 promotorová oblast, se kterou interaguje region 4.2 z domény σ_4 . Tmavě modrou barvou je zobrazen -10 rozšiřující motiv interagující s doménou σ_3 . Žlutou barvou má -10 promotorová oblast, se kterou interaguje region 2.4 domény σ_2 . DISC značí oblast diskriminátoru, se kterou interaguje region 1.2 domény σ_2 . Převzato (Davis *et al.*, 2017); upraveno.

Podjednotka α se v holoenzymu vyskytuje ve formě homodimeru (každá z podjednotek má molekulovou hmotnost 36,5 kDa). Dimerizace podjednotky α je zásadní pro sestavení celého komplexu RNA polymerázy, neboť slouží jako platforma, ke které se mohou připojit podjednotky β a β' . Za tuto interakci zodpovídá N-terminální doména podjednotky α (Zhang a Darst, 1998). C-terminální doména naopak interaguje s transkripčními aktivátory a UP elementem promotoru (Obr. 1) (Ross *et al.*, 1993).

Dalšími podjednotkami jádra RNA polymerázy jsou β (150 kDa) a β' (155 kDa). Tyto dvě podjednotky umožňují katalytickou aktivitu RNA polymerázy a vazbu k templátu. Podjednotky β a β' utvářejí aktivní centrum, které je charakterizováno tvarem „krabího klepeta“. Jedná se o strukturu konzervovanou ve všech

organismech. Jedno rameno „klepeta“ je tvořeno podjednotkou β a druhé rameno β' , čímž vzniká 2,7 nm široký kanál, v němž jsou chelátovány ionty Mg^{2+} a kde probíhá syntéza RNA (Zhang *et al.*, 1999).

Podjednotka ω (10,5 kDa) se podílí na správném sestavení aktivního centra RNA polymerázy (Minakhin *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Podjednotka β' je totiž schopna při vazbě podjednotky ω zaujmout správnou konformaci nutnou k sestavení aktivního centra RNA polymerázy (Ghosh *et al.*, 2003). Dalšími funkcemi podjednotky ω jsou například zprostředkování stringentní odpovědi a stresová adaptace RNA polymerázy (Mathew a Chatterji, 2006).

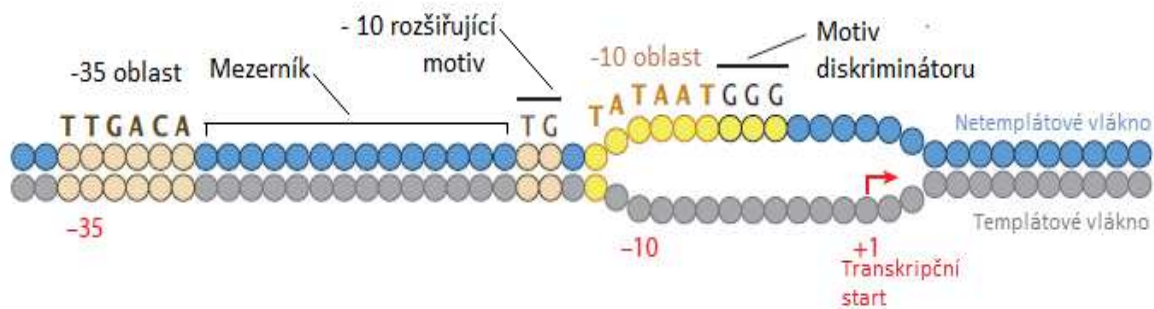
U grampozitivních bakterií byly v jádru RNA polymerázy nalezeny ještě podjednotky δ a ϵ . Molekulová hmotnost podjednotky δ je 21,5 kDa a tato podjednotka zabraňuje vazbě RNA polymerázy do intergenových oblastí, čímž zvyšuje specifitu a efektivitu transkripce (Achberger a Whiteley, 1981; Hilton a Whiteley, 1985; Pero *et al.*, 1975). Podjednotka δ také umožňuje snazší recyklaci RNA polymerázy po ukončení transkripce, což vede ke zvýšení celkové transkripční aktivity (Weiss a Shaw, 2015). Podjednotka ϵ má molekulovou hmotnost 9 kDa a její skutečná role nebyla doposud objasněna. Jedním z možných vysvětlení je ochrana RNA polymerázy před některými proteiny bakteriofágů (Doherty *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2014).

3.4 Bakteriální promotory

Promotor je oblast DNA, kde dochází ke specifické vazbě RNA polymerázy. U bakterií je rozpoznání promotorové oblasti zajištěno podjednotkou holoenzymu RNA polymerázy zvanou faktor σ . Pro rozpoznání promotoru faktorem σ jsou nezbytné oblasti -35 a -10 (Pribnowův box) (Obr. 2). Pro genom *E. coli* platí, že konvenční (konsensus) sekvence (nejpravděpodobněji se vyskytující nukleotidy) pro obě oblasti rozpoznávané vegetativním faktorem σ^{70} jsou: TTGACA (-35) a TATAAT (-10). Jsou oddělené mezerou o délce 16-18 nukleotidů a AT bohatost oblasti -10 umožňuje snadné rozplétání dvoušroubovice DNA při iniciaci transkripce (Feklistov a Darst, 2011; Hawley a McClure, 1983; Ruff *et al.*, 2015). Tyto oblasti jsou nezbytné pro iniciaci transkripce a jsou přítomny ve všech bakteriálních promotorech.

Dalším prvkem bakteriálního promotoru je motiv diskriminátoru, který se nachází mezi transkripčním startem a -10 oblastí promotoru (Obr. 1 a 2). Jedná se zpravidla o G bohatou oblast mající vliv na stabilitu otevřeného komplexu, jelikož interaguje s faktorem σ . Běžná délka diskriminátoru se pohybuje mezi 6 - 8 nukleotidy (Ruff *et al.*, 2015).

U některých bakteriálních promotorů se v pozici -14 a -15 nachází rozšiřující motiv TG (Obr. 2), který interaguje s podjednotkou σ_2 faktoru σ^{70} (Barne *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 2003). Součástí promotorové oblasti může být i tzv. UP element (Obr. 1). Jedná se o oblast -40 až -60 promotoru s konvenční sekvencí nnAAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTTnnAAAAnn interagující s N-terminální doménou α podjednotky RNA polymerázy a zvyšující sílu promotoru (Estrem *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 2001).



Obrázek 2. Schéma bakteriálního promotoru. Vlevo se nachází -35 promotorová oblast s konvenční sekvencí TTGACA. Poté následuje mezerník, rozšiřující motiv s konvenční sekvencí TGN, -10 promotorová oblast s konvenční sekvencí TATAAT, motiv diskriminátoru bohatý na GC páry a transkripční start na templátovém vlákně. Podle Feklistov *et al.*, (2014); upraveno.

3.5 Faktory σ

Faktory σ byly objeveny Richardem Burgessem a jeho skupinou již v roce 1969. Jedná se o podjednotku bakteriální RNA polymerázy, která po svém navázání na jádro RNA polymerázy umožní rozpoznání promotoru, rozdělení řetězců dsDNA, vznik transkripční bubliny a zahájení transkripce (Burgess *et al.*, 1969). Bakterie mají zpravidla jeden primární faktor σ , který zodpovídá za transkripci vegetativních (*housekeeping*) genů, čímž je pro bakteriální buňku esenciální. Taková situace je typická pro bakterii nacházející se ve stavu exponenciálního růstu, kdy má dostatek živin a nepotýká se s žádnou nepříznivou situací. Za nedostatku živin nebo stresových podmínek však potřebuje exprimovat geny, které jí umožní tuto situaci

překonat. K tomu slouží alternativní faktory σ , které se také nazývají faktory σ s extracytoplazmatickou funkcí (ECF). Skupina genů, jejichž promotory jsou rozpoznány konkrétním faktorem σ tvoří odpovídající σ regulon (Feklistov *et al.*, 2014).

Faktory σ *E. coli* jsou rozděleny do 2 rodin: σ^{70} a σ^{54} . Jedná se o evolučně vzdálené rodiny, které mají roli v různých životních podmínkách bakterie. Zatímco rodina σ^{70} se u bakterie *E. coli* uplatňuje během běžného růstu, rodina σ^{54} hraje roli např. během hladovění na dusík (Danson *et al.*, 2019; Schulz *et al.*, 2000), přičemž se odlišuje i mechanismus iniciace transkripce (u rodiny σ^{70} dochází k samovolnému přechodu z uzavřeného iniciačního komplexu v otevřený, ale pro rodinu σ^{54} je nezbytný pomocný transkripční aktivátor).

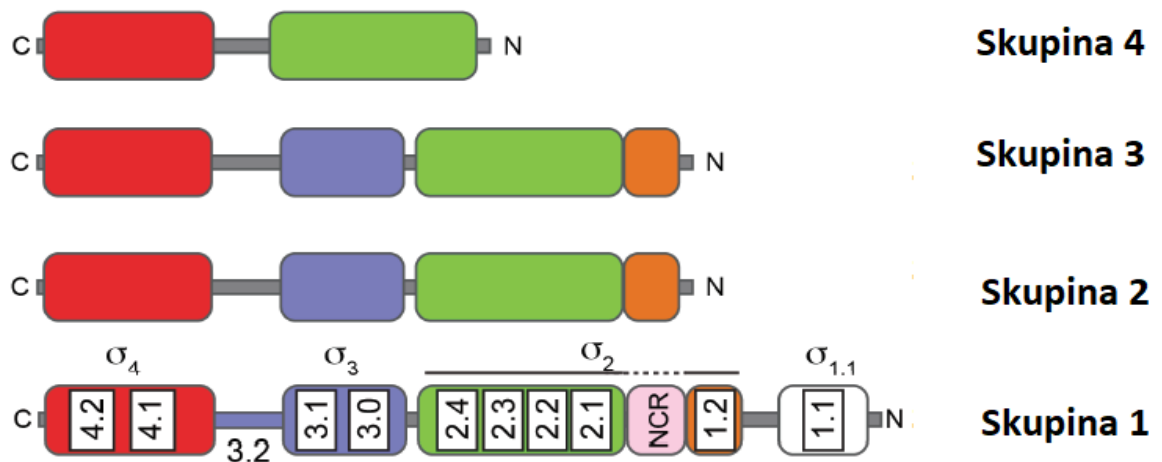
Kromě interakce faktorů σ s ostatními podjednotkami RNA polymerázy a DNA je známa i interakce s odpovídajícími faktory anti- σ . Jde o velmi důležitý mechanismus regulace stresové odpovědi. Většinou se jedná o transmembránový protein, který se váže na faktor σ a znemožňuje mu tak zaujmout ideální konformaci pro vazbu k jádru RNA polymerázy. Při podnětu z vnějšího prostředí však dojde k uvolnění faktoru anti- σ (proteolýzou nebo posttranslační modifikací faktoru anti- σ) a spuštění transkripce genů patřících do regulonu příslušného faktoru σ (Hermann, 2002; Hughes a Mathee, 1998).

3.5.1 Rodina faktorů σ^{70}

Faktory σ rodiny σ^{70} jsou tvořeny několika konzervovanými doménami ($\sigma_{1.1}$, σ_2 , σ_3 a σ_4), jejichž zastoupení určuje příslušnost konkrétního faktoru σ do jedné ze 4 skupin (Obr. 3). Tyto domény interagují s -35 a -10 promotorovou oblastí a přilehlými motivy (Gribskov a Burgess, 1986; Paget, 2015).

Doména $\sigma_{1.1}$ je lokalizována na N-konci faktoru σ a její sekundární strukturu tvoří tři α -helixy, které jsou propojeny dvěma smyčkami. Funkcí této domény je zabránění vazbě volného faktoru σ na RNA polymerázu před jejím kompletním složením (Schwartz *et al.*, 2008). Doména σ_2 je evolučně nejkonzervovanější a interaguje s -10 promotorovou oblastí na netemplátovém vlákně DNA (Feklistov a Darst, 2011; Haugen *et al.*, 2006), zatímco doména σ_3 interaguje s -10 rozšiřujícím motivem (Mitchell *et al.*, 2003). C-terminální doména σ_4 se naopak váže na -35

promotorovou oblast a je tvořena čtyřmi α -helixy (2 s motivem HTH) (Helmann a Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1998).



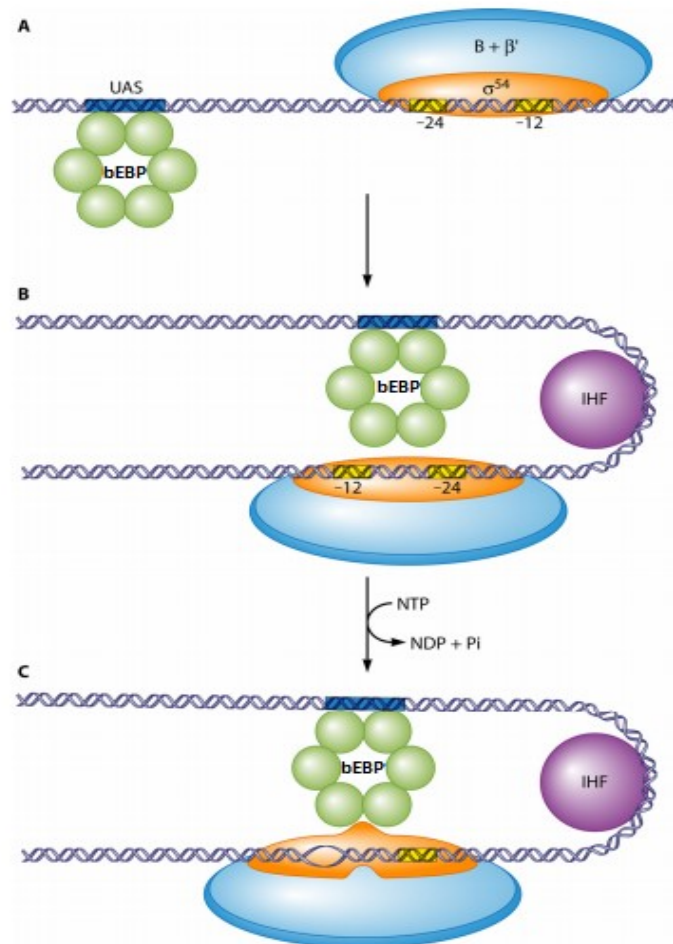
Obrázek 3. Doménová organizace faktorů rodiny σ^{70} a jejich rozdělení do 4 skupin. Bílou barvou je zobrazena N-terminální $\sigma_{1.1}$ doména. Doména σ_2 je tvořena regiony 1.2 (oranžová barva), NCR (nekonzervovaná oblast; růžová barva), dále regiony 2.1, 2.2, 2.3 a 2.4 (zelená barva). Modrou barvou je zobrazena doména σ_3 a červenou doména σ_4 . Podle Paget, (2015); upraveno.

Skupina 1 zahrnuje vegetativní faktory σ nezbytné pro metabolismus buňky v podmínkách exponenciálního růstu. U této skupiny jsou zastoupeny všechny čtyři jmenované domény (Gribskov a Burgess, 1986; Paget a Helmann, 2003). Skupina 2 zahrnuje faktory σ , jež jsou strukturně podobné faktorům σ skupiny 1, ale postrádají N-terminální doménu $\sigma_{1.1}$. Tyto faktory se uplatňují především během růstu za nedostatku živin a dalších stresových situací spojených se stacionární fází růstu (Gribskov a Burgess, 1986). Skupina 3 je funkčně i strukturně rozmanitá s doménami σ_2 , σ_3 a σ_4 a reguluje např. syntézu bičíku či sporulaci (Grossman *et al.*, 1987; Paget, 2015). Skupina 4 je strukturně nejjednodušší skupinou faktorů σ^{70} , neboť obsahuje pouze domény σ_2 a σ_4 , a její zástupci se uplatňují při odpovědi na stresové podmínky (Staroň *et al.*, 2009).

3.5.2 Rodina faktorů σ^{54}

Rodina σ^{54} nenesse téměř žádnou sekvenční ani strukturní homologii s rodinou faktorů σ^{70} . Zatímco faktory σ^{70} rozpoznávají -35 a -10 promotorovou oblast, faktory σ^{54} rozpoznávají oblasti -12 (konvenční sekvence TGC) a -24

(konvenční sekvence GG). Obě oblasti jsou pak součástí souhrného motivu YTGGCACGrNNNTTGCW (Barrios *et al.*, 1999; Bush a Dixon, 2012). Faktory rodiny σ^{54} se uplatňují během stresových situací, a to např. hladovění na dusík nebo infekce bakteriofágy (Austin a Dixon, 1992; Bordes *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2000).



Obrázek 4. Schéma aktivace iniciace transkripce závislé na faktorech rodiny σ^{54} . **A)** faktor σ^{54} přivádí RNA polymerázu k promotoru, který je vymezený -12 a -24 oblastí. Aktivátor bEBP (zelená barva) je navázán na sekvenci vazby aktivátoru (UAS). **B)** Dochází k ohnutí DNA, které je zprostředkováno faktorem IHF (fialová barva), čímž dojde k přiblížení aktivátoru bEBP k faktoru σ^{54} . **C)** Po hydrolýze NTP \rightarrow NDP + Pi (nejčastěji hydrolýza ATP) dojde k přeměně uzavřeného komplexu na komplex otevřený a může proběhnout iniciace transkripce. Převzato z Bush a Dixon (2012); upraveno.

Pro zahájení transkripce z σ^{54} -dependentních promotorů je třeba transkripční aktivátor bEBP (*bacterial enhancer binding protein*) s ATPázovou aktivitou (Obr. 4). Ten se váže přes svoji C-terminální doménu do sekvence vazby aktivátoru, která je vzdálená 80 až 150 nukleotidů proti směru transkripce (Buck *et al.*, 1986; Danson *et al.*, 2019). Po navázání proteinu IHF (*integration host factor*) do oblasti

nacházející se mezi sekvencí vazby aktivátoru a promotorem dojde k ohnutí DNA, které umožní proteinu bEBP se vázat na faktor σ^{54} a hydrolyzovat ATP, čímž dojde k přechodu z uzavřeného komplexu na otevřený (Obr. 4) (Bush a Dixon, 2012; Yang a Nash, 1989).

3.5.3 Faktory sigma *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum má 7 různých faktorů σ patřících do rodiny σ^{70} . Zastoupena je skupina faktorů 1 (σ^A), 2 (σ^B) a 4 (σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M). Skupina 3 se v *C. glutamicum* nevyskytuje (Pátek a Nešvera, 2011).

3.5.3.1 Faktor σ^A

Vegetativní faktor σ^A je kódován genem *sigA* a zodpovídá za expresi většiny genů během exponenciální fáze růstu. Jedná se o esenciální faktor σ , takže nelze připravit kmen s delecí genu *sigA*, neboť absence funkčního proteinu SigA je pro buňku letální (Oguiza *et al.*, 1997; Pátek a Nešvera, 2011). Při přechodu do stacionární fáze dochází ke snížení exprese genu *sigA* a úlohu σ^A přebírá σ^B (Larisch *et al.*, 2007). Taniguchi se svou skupinou prokázali, že nadměrná exprese genu *sigA* z expresního vektoru či naopak delece genu *sigB* vedou ke zvýšené produkci karotenoidů, čehož se dá využít v biotechnologiích (Taniguchi *et al.*, 2017a).

Analýzou více než 150 promotorových oblastí genů exprimovaných během exponenciální fáze růstu byly stanoveny konvenční sekvence σ^A -dependentních promotorů (Pátek a Nešvera, 2011). Sekvenováním RNA *C. glutamicum* bylo dále detekováno více než 2 500 transkripčních startů genů za exponenciální fáze růstu, které byly přiřazeny k příslušným promotorům. Z výsledků srovnávacích analýz vyplynulo, že -35 oblast tvoří konvenční sekvence ttgnca a -10 oblast sekvence TAnnnT (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

3.5.3.2 Faktor σ^B

Alternativní faktor σ^B patří do skupiny faktorů 2. Je kódován genem *sigB* a jeho exprese je řízena σ^H -dependentním promotorem (Holátko *et al.*, 2012). Uplatňuje se zejména během přechodu z exponenciální fáze růstu do stacionární (Larisch *et al.*, 2007). Ke zvýšení exprese genu *sigB* dochází také při

environmentálních stresech (např. etanol, chlad či nízké pH). Při teplotním šoku dochází naopak ke snížení exprese jak genu *sigB*, tak i genu *sigA* (Halgasova *et al.*, 2001). Nicméně *in vitro* transkripční experimenty ukázaly, že faktor σ^A je schopen spustit transkripci ze σ^B -dependentních promotorů a faktor σ^B je schopen spustit transkripci ze σ^A -dependentních promotorů (Šilar *et al.*, 2016).

U $\Delta sigB$ delečních kmenů byla za podmínek nízké koncentrace kyslíku provedena analýza prostřednictvím qRT-PCR a DNA mikročipů. Z analýzy vyplynulo, že došlo ke snížení exprese genů kódujících proteiny glykolýzy, takže faktor σ^B je pozitivním regulátorem metabolismu glukózy za nedostatku kyslíku (Ehira *et al.*, 2008).

Řada σ^B -dependentních promotorů je sekvenčně shodných se σ^A -dependentními promotory, přičemž konvenční sekvence jsou tvořeny GNGNCN (oblast -35) a TAMAATGA (oblast -10) (Pátek a Nešvera, 2011). Specifickou vlastností je však jejich preference G v pozici -5 oblasti diskriminátoru (Albersmeier *et al.*, 2017).

Faktor σ^B a jeho promotor byly využity při tvorbě autoinducibilního expresního systému. Za modifikovaný σ^B -dependentní promotor byl umístěn reportérový gen, jehož exprese byla značně zvýšena během stacionární fáze. Tento expresní systém se navíc podařilo optimalizovat nejen pro jednorázovou kultivaci, ale i pro kultivaci v bioreaktorech, což svědčí o jeho potenciálu pro průmyslovou produkci heterologních proteinů (Kim *et al.*, 2016).

3.5.3.3 Faktor σ^C

Nejméně prostudovaný faktor σ^C patří do skupiny 4, je kódován genem *sigC* a podílí se na adaptaci buňky za podmínek nízké hladiny kyslíku (Pátek a Nešvera, 2011).

Z porovnání transkriptomů $\Delta sigC$ delečních kmenů s divokým kmenem za podmínek exponenciálního růstu vyplynulo snížení exprese genů kódujících cytochromoxidázu, hemsyntázu a protein z rodiny CopC. Nadprodukce SigC navíc vedla ke zvýšení exprese genů kódujících cytochromoxidázu a hemsyntázu a zároveň ke snížení exprese genů kódujících komponenty cytochrom *bc₁* komplexu, přičemž míra exprese genu cytochrom *aa₃* oxidázy ovlivněna nebyla. Jelikož delece genu pro cytochrom *aa₃* oxidázu, inhibice cytochrom *aa₃* oxidázy či hladovění na

měď vedou k aktivaci σ^C regulonu, je zřejmé, že fyziologická role σ^C spočívá v regulaci stresové odpovědi spojené s rozrušením přenosu elektronů přes cytochromy (Morosov *et al.*, 2018; Toyoda a Inui, 2016).

Co se týče sekvenčních motivů σ^C -dependentních promotorů, ze srovnání jejich 8 zástupců byly odvozeny konvenční sekvence pro -35 (GGAAAC) a -10 promotorovou oblast (CGACWR) (Dostálová *et al.*, 2017; Toyoda a Inui, 2016).

3.5.3.4 Faktor σ^D

Dalším stresovým faktorem σ patřícím do skupiny 4 je faktor σ^D . První analýzy naznačovaly, že faktor σ^D hraje roli v transkripci genů zodpovědných za adaptaci buňky na mikroarobní podmínky (Ikeda *et al.*, 2009). Další experimenty s nadprodukcí SigD upřesnily, že se podílí na biosyntéze mykolových kyselin a jejich začleňování do mykomembrány, přičemž interakce faktoru σ^D s promotory těchto genů byly potvrzeny pomocí *in vitro* transkripce (Dostálová *et al.*, 2017; Taniguchi *et al.*, 2017b). Zároveň se prokázalo, že faktor σ^D silně ovlivňuje uspořádání peptidoglykanu a tím pádem způsobuje větší odolnost buňky vůči lysozymu. Úlohou faktoru σ^D je tedy transkripce genů, které hrají roli v zajištění integrity buněčné stěny *C. glutamicum* a v odpovědi na povrchový stres buňky (Taniguchi *et al.*, 2017b; Toyoda a Inui, 2018).

O významné roli faktoru σ^D jakožto stresového faktoru rozhoduje i fakt, že je regulován faktorem anti- σ^D , který je kódován genem *rsdA* a jehož promotor je σ^D -dependentní (Toyoda a Inui, 2018).

Identifikací 11 σ^D -dependentních promotorů a srovnáním jejich nukleotidových sekvencí byly stanoveny konvenční sekvence pro tyto promotory, a to -35 (GTAAC^{A/G}) a -10 (GAT) (Dostálová *et al.*, 2019; Toyoda a Inui, 2018).

Ukázalo se však, že součástí σ^D regulonu jsou i přirozené hybridní promotory, jejichž zástupci jsou: *P_{lpd}*, jehož sekvence jsou -35 σ^D -10 σ^H (GTT), a *P_{cg0607}*, jehož sekvence jsou -35 σ^H (GGAA) a -10 σ^D (Dostálová *et al.*, 2019).

Bylo zjištěno, že během *in vitro* transkripce došlo k rozpoznání promotoru *P_{cg0607}* jak faktorem σ^D , tak i faktorem σ^H , zatímco promotor *P_{lpd}* byl rozeznán pouze faktorem σ^D . Přestože *in vivo* experimenty opět prokázaly primární σ^D -dependenci těchto hybridních promotorů, oba byly zároveň slabě σ^H -dependentní, což poukazuje na jejich $\sigma^{D/H}$ promiskuitu (Dostálová *et al.*, 2019).

3.5.3.5 Faktor σ^E

Faktor σ^E , patřící rovněž do 4. skupiny, je kódován genem *sigE* a uplatňuje se v odpovědi na povrchový stres vyvolaný lysozymem, EDTA, SDS či tepelným šokem. Navíc mutanti $\Delta sigE$ vykazují zvýšenou citlivost k antibiotikům, což je způsobeno sníženou expresí genů pro specifické metyltransferázy, které jsou součástí σ^E regulonu a podílí se na metylacích mykolových kyselin, čímž ovlivňují permeabilitu buněčné stěny a schopnost buňky ubránit se vnějším stresovým vlivům (Park *et al.*, 2008). Zároveň bylo zjištěno, že ke zvýšené expresi genu *sigE* dochází také v přítomnosti kyseliny mléčné a při hladovění na dusík (Jakob *et al.*, 2007; Silberbach *et al.*, 2005).

Faktor σ^E je negativně regulován pomocí svého anti- σ faktoru CseE, přičemž kmeny nadprodukující CseE vykazovaly fenotyp velmi podobný $\Delta sigE$ mutantům *C. glutamicum*. Zároveň byla prokázána i vzájemná interakce obou proteinů *in vitro* (Park *et al.*, 2008).

Přestože doposud nebyly publikovány konvenční sekvence pro striktně σ^E -dependentní promotory u *C. glutamicum*, jsou alespoň známy odpovídající konvenční sekvence u příbuzného mikroorganismu *Mycobacterium tuberculosis*: -35 GGAAC a -10 GTT (Sachdeva *et al.*, 2010).

3.5.3.6 Faktor σ^H

Faktor σ^H je kódován genem *sigH* a uplatňuje se zejména během teplotního šoku a oxidativního stresu (Ehira *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005a). Protože za takových podmínek se poškozují proteiny, dochází i ke zvýšení exprese genů kódujících proteiny „teplotního šoku“, Clp proteázu či řadu transkripčních regulátorů spojených s tepelným a oxidativním stresem (Choi *et al.*, 2009; Ehira *et al.*, 2009; Engels *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005b).

Jelikož součástí σ^H regulonu jsou i geny pentózofosfátového cyklu, který poskytuje substráty pro biosyntézu riboflavinu, dochází při odpovědi na oxidativní stres i ke zvýšení biosyntézy riboflavinu (Toyoda *et al.*, 2015). Faktor σ^H je zároveň zodpovědný i za expresi genů *uvrA*, *uvrC* a *uvrD3*, které kódují enzymy hrající roli během opravných mechanismů DNA při SOS odpovědi (Busche *et al.*, 2012). Vliv faktoru σ^H je však mnohem komplexnější, neboť u *C. glutamicum* ovlivňuje expresi

genů *sigB* a *sigM*, čímž buňce poskytuje širokou škálu možností odpovědi na stresové situace (Holátko *et al.*, 2012; Nakunst *et al.*, 2007).

Stejně jako oba předchozí faktory má i faktor σ^H svůj faktor anti- σ , který je kódován genem *rshA* a nachází se ve stejném operonu jako gen *sigH*, přestože je přepisován i ze svého vlastního σ^H -dependentního promotoru (Busche *et al.*, 2012).

Ze srovnání σ^H -dependentních promotorů vyplývá, že jejich -35 (gGGAA^T/c) a -10 (GTT) promotorové oblasti jsou vysoce konzervované, neboť se shodují i s -35 a -10 oblastmi σ^H -dependentních promotorů *M. tuberculosis* (Pátek a Nešvera, 2011).

3.5.3.7 Faktor σ^M

Posledním faktorem σ je faktor σ^M , který se uplatňuje během odpovědi na teplotní, chladový či disulfidický stres, přičemž exprese jeho kódujícího genu *sigM* je řízena faktorem σ^H (Nakunst *et al.*, 2007).

Co se týče vlastního σ^M regulonu, analýzou transkriptomu $\Delta sigM$ kmene *C. glutamicum* bylo zjištěno, že do něj patří geny *suF* operonu, geny kódující thioredoxiny TrxB1 a TrxC či thioredoxin reduktázu TrxB a geny kódující chaperony (GroES, GroEL, DnaJ, GrpE a ClpB), takže víceméně ty, které jsou potřebné pro opravu a správné skládání proteinů (Nakunst *et al.*, 2007).

Konvenční sekvence pro σ^M -dependentní promotory je předběžně vymezena nukleotidovými hexamery gGGAAT (-35) a YGTTGR (-10), avšak jejich definitivní podoba je otázkou dalšího výzkumu (Nakunst *et al.*, 2007).

3.5.4 Hybridní faktory sigma

První experimenty týkající se konstrukce hybridních faktorů σ a jim odpovídajících promotorů byly provedeny skupinou profesora Kumara u kmene bakterií *E. coli* (Kumar *et al.*, 1995). Syntetický hybridní faktor σ^{70-32} byl vytvořen z prvních 529 N-terminálních aminokyselin vegetativního faktoru σ^{70} a z 84 C-terminálních aminokyselin alternativního faktoru σ^{32} *E. coli*. K vytvoření syntetického promotoru se využila -35 oblast σ^{32} -dependentního a -10 oblast σ^{70} -dependentního promotoru. *In vivo* experimenty prokázaly, že zkonstruovaný hybridní faktor σ^{70-32} byl schopen rozeznat tento hybridní promotor (Kumar *et al.*, 1995).

Další experimenty testující syntetické hybridní faktory σ a jim odpovídající hybridní promotory byly provedeny vědeckou skupinou profesora Rhodiuse v hostitelském kmeni *E. coli* produkujícím syntetické hybridní faktory. Tyto syntetické faktory σ byly získány kombinační výměnou σ_4 a σ_2 domén příslušných nativních faktorů σ^E *E. coli* a σ^{ECF11} *Pseudomonas syringae* (Thakur *et al.*, 2013) a testovaly odpovídající hybridní promotory získané kombinací -35 a -10 σ^E -dependentního promotoru P02_*rpoHP3* a σ^{ECF11} -dependentního promotoru P11_3726 (Rhodius *et al.*, 2013).

Bylo zjištěno, že oba syntetické hybridní faktory σ rozpoznávaly jen své příslušné hybridní promotory. Nativní promotory P02_*rpoHP3* a P11_3726 nebyly rozpoznávány hybridními faktory σ a přirozené faktory σ^E *E. coli* a σ^{ECF11} *P. syringae* nerozpoznávaly hybridní promotory (Rhodius *et al.*, 2013).

Přestože výše uvedené výsledky naznačují, že konstrukce bakteriálních hybridních promotorů a hybridních faktorů je vhodný směr pro syntetickou biologii, neboť umožňuje striktní regulaci takto konstruovaných genů, žádný obdobný experiment nebyl u systémů založených na *C. glutamicum* dosud publikován.

V dalších zajímavých pracích zabývajících se hybridními faktory σ jde o hybridy σ^{32} *E. coli* s faktory σ z plastidů vyšších rostlin, a to konkrétně *Arabidopsis thaliana* (Buhot *et al.*, 2006) či *Nicotiana tabacum* (Mohsenpour *et al.*, 2015). Toto téma je však již dosti vzdálené smyslu této diplomové práce.

4 Materiál a metody

4.1 Bakteriální kmeny

- *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
- *Escherichia coli* TOP10

4.2 DNA a plazmidy

4.2.1 Primery pro PCR a sekvenování

TRPTCGF1 5'- CAGTTGTGTGATGTGGCAATGTTTCACG - 3'

GFP1 5'- CTAATTCAACAAGAATTGGGAC - 3'

ECXT99AF 5'- CCCGTTCTGGATAATGTTTT - 3'

ECXT99AR 5'- GCTACGGCGTTTCACTTCTG - 3'

4.2.2 Oligonukleotidy pro vzájemnou asociaci

Tyto dvojice komplementárních oligonukleotidů nesoucích promotorvé sekvence byly použity pro přímé klonování ve vektoru pEPR1.

PCGDHF 5'- GCCGAAGACTTTGCGCTGGTCAGCGATGGAAGTAACAGAGTTA
GGGTCCCAAGTGTGTATCTATTCCAGG - 3'

PCGDHR 5'- GATCCCTGGAATAGATAACAACACTTGGGACCCTAACTCTGTTAC
TTCCATCGCTGACCAGCGCAAAGTCTTCGGCTGCA - 3'

PCGHDF 5'- GCACCCATTGTTCCCGCTTTAACCGCTATCTGGAATGATTGATAG
CAACTTCTCGATCTACTGAGTGAAAAG - 3'

PCGHDR 5'- GATCCTTTTCACTCAGTAGATCGAGAAGTTGCTATCAATCATTCC
AGATAGCGGTAAAGCGGGAACAATGGGTGCTGCA - 3'

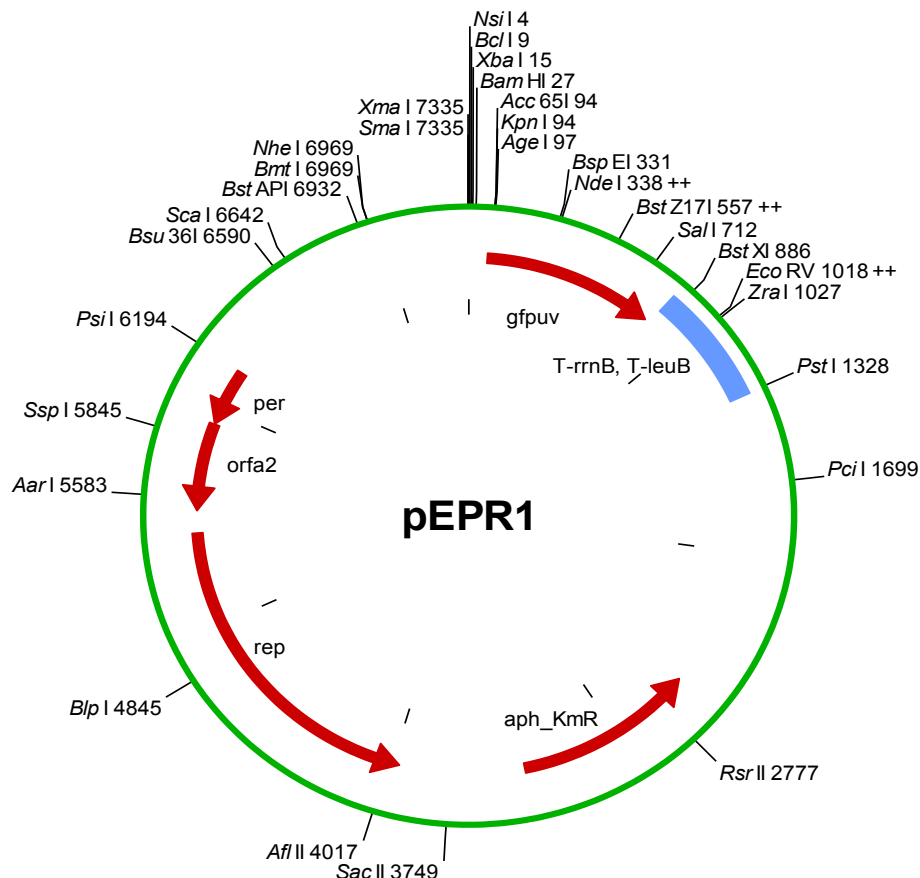
4.2.3 DNA markery

- 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs, USA)
- DNA marker 155-970 (Top-Bio, ČR)

4.2.4 Plazmidy

4.2.4.1 pEPR1

Podvojný promotor-test vektor pro *E. coli* a *C. glutamicum* pEPR1 (Obr. 5) má velikost 7,3 kpb a nese gen *aph* pro kanamycinovou rezistenci a reportérový gen *gfpuv* kódující zelený fluorescenční protein (GFP). Expres reportérového genu umožňuje snadné sledování aktivity námi vloženého promotoru (Knoppová *et al.*, 2007).



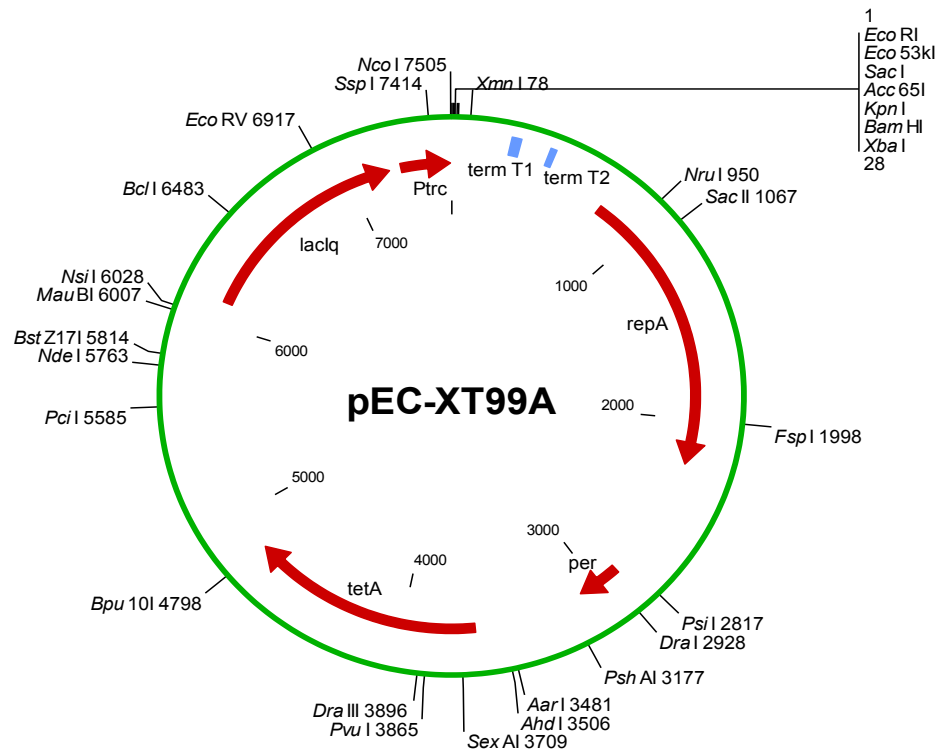
Obrázek 5. Schéma vektoru pEPR1. Vektor je určen pro kvantitativní testování promotorů. Reportérovým genem je *gfpuv*. Modře je zobrazen terminátor *T-rrnB, T-leuB*, a červeně jsou vyznačeny strukturní geny.

Použité rekombinantní plazmidy odvozené od pEPR1:

- **pEPR1PrsdA**: nese vložený σ^D -dependentní promotor *PrsdA*
- **pEPR1PuvrD3**: nese vložený σ^H -dependentní promotor *PuvrD3*

4.2.4.2 pEC-XT99A

Podvojný expresní vektor pro *E. coli* a *C. glutamicum* má velikost 7,5 kpb a slouží k indukované expresi genu našeho zájmu (Obr. 6). Obsahuje gen pro tetracyklinovou rezistenci (*tetA*) a promotor *P_{trc}* indukovatelný IPTG. Po indukci dochází k expresi genu našeho zájmu, který je vkládán do multiklonovacího místa umístěného za *P_{trc}* (Kirchner a Tauch, 2003).



Obrázek 6. Schéma vektoru pEC-XT99A. Modře jsou vyznačeny terminátory T1 a T2 a červeně jsou vyznačeny strukturální geny.

Použité rekombinantní plazmidy odvozené od pEC-XT99A:

- **pEC-XT99Asig^D**: nese vložený gen *sigH* kódující faktor σ^D
- **pEC-XT99Asig^H**: nese vložený gen *sigH* kódující faktor σ^H
- **pEC-XT99AmutH_4A+K**: nese vložený gen *sigH* s mutací v doméně σ_4
- **pEC-XT99AmutH_6A**: nese vložený gen *sigH* s mutací v doméně σ_4
- **pEC-XT99AmutH_6A+K**: nese vložený gen *sigH* s mutací v doméně σ_4

4.2.4.3 pMA-RQ

Komerční plazmid nesoucí gen pro ampicilinovou rezistenci.

Použité rekombinantní plazmidy odvozené od pMA-RQ:

- **pMA-RQsigDH**: nese vložený gen pro hybridní faktor σ^{DH}
- **pMA-RQsigHD**: nese vložený gen pro hybridní faktor σ^{HD}

4.3 Kultivační média

Komplexní tekuté médium 2xYT (1000 ml)

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

Médium bylo po rozpuštění v dH₂O do celkového objemu 1000 ml sterilizováno autoklávováním.

Komplexní pevné médium 2xYT (1000 ml)

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

Médium bylo po rozpuštění v dH₂O do celkového objemu 1000 ml sterilizováno autoklávováním.

4.4 Pufry

PBS pufr

- 136,89 mM NaCl
- 2,68 mM KCl
- 10,05 mM Na₂HPO₄
- 1,77 mM KH₂PO₄
- pH = 8,0 (upraveno H₃PO₄)

Pufr byl po rozpuštění v dH₂O sterilizován autoklávováním.

4.5 Chemikálie

Agar – Oxoid, UK

Agaróza SeaKem® LE – Lonza, USA

Ampicilin – Serva, Německo

Bovine serum albumine (BSA) – Sigma-Aldrich, USA

CutSmart® Buffer – New England BioLabs, USA

dNTP – Top-Bio, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) – Lachema, ČR

Ethanol 97 % – Lachema, ČR

Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) – Serva, Německo

Gel Loading Dye, Blue (6x) – New England BioLabs, USA

GelRed® – Biotium, USA

Glycerol – VWR, ČR

GoTaq® DNA polymeráza – Promega, USA

Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4) – Lachema, ČR

Hydroxid sodný (NaOH) – Lach-Ner, ČR

Chlorid draselný (KCl) – Lach-Ner, ČR

Chlorid sodný (NaCl) – Lachema, ČR

Chlorid vápenatý (CaCl_2) – Lachema, ČR

Izopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) – Sigma - Aldrich, USA

Kanamycin – Sigma-Aldrich, USA

Kyselina boritá – Sigma-Aldrich, USA

Kvasinkový extrakt – Serva, Německo

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) – Sigma-Aldrich, USA

Kyselina fosforečná (H_3PO_4) – Lach - Ner, ČR

Kyselina chlorovodíková (HCl) – Lachema, ČR

Kyselina octová (CH_3COOH) – Penta, ČR

Lysozym – Serva, Německo

3-(N-morpholino)propanosulfonová kyselina (MOPS) – Serva, Německo

Polyethylenglykol (PEG) – Thermo Fisher Scientific, USA

Restrikční endonukleázy – New England BioLabs, USA

Tetracyklin – Serva, Německo

TRIS-hydroxymetylaminomethan – Serva, Německo

Trypton – Oxoid, UK

T4 DNA ligáza – New England BioLabs, USA

4.6 Komerční soupravy

High Pure Plasmid Isolation Kit® – Roche, Německo

High Pure PCR Product Purification Kit® – Roche, Německo

4.7 Přístrojové vybavení

Analytická váha GR-202 EC – A&D Company, Japonsko

Centrifuga A15 – B.Braun Biotech International, Německo

Digitální fotoaparát KODAK DC290 Zoom – KODAK, USA

Elektroforetická aparatura – Jordan Scientific, UK

Elektroporátor Gene pulser – Bio-rad, Německo

FastPrep®-24 Classic Instrument – MP biomedicals, USA

Fluorimetr Safire² – Tecan, Rakousko

Chlazená centrifuga Eppendorf 5804 – Eppendorf, Německo

Chlazená centrifuga Mikro 200R – Hettich, Německo

Laboratorní váha – Sartorius, Německo

Magnetická míchačka Mini MR Standard – IKA, Německo

pH metr PHM210 Standard – Radiometer Analytical SAS, Francie

Třepačka Gallenkamp – Gallenkamp, UK

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

UV/VIS spektrofotometr Biomate 5 Double Beam – Thermo Electron Corporation, USA

UV/VIS spektrofotometr NanoPhotometer – IMPLLEN, Německo

4.8 Software

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

Bio-Vision® (Vilber, Francie) – fotodokumentace agarózových gelů a analýza obrazu

Microsoft Office 2013 – úprava tabulek, grafů a textu

Lasergene verze 7.1 (DNASTAR, Inc., USA) – analýza a zpracování nukleotidových a aminokyselinových sekvencí

Clone Manager 9 Basic Edition (SciEd Software; USA) – grafické znázornění, konstrukce a analýza rekombinantních molekul

4.9 Metody

4.9.1 Elektroforéza DNA v agarózových gelech

Materiál:

- pufr TBE (90 mM Tris-HCl; 2mM EDTA; 90 mM H₃BO₃; pH = 8,0)
- GelRed®
- Agaróza SeaKem® LE
- DNA markery: 1 kb DNA ladder, DNA marker 155-970
- Gel Loading Dye, Blue (6X)

Postup:

Agaróza byla rozpuštěna ve 35 ml 0,5 x TBE v požadované koncentraci 1-1,5% (w/v) pomocí zahřívání v mikrovlnné troubě. Do jamek vytvořených pomocí hřebínku byly po ztuhnutí gelu nanášeny vzorky i standard velikosti nukleových kyselin spolu s GelRed a nanášecím pufrům Gel Loading Dye, Blue. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Elektroforéza běžela 50-80 min při 5 V/cm. Gel byl vizualizován pomocí UV - transiluminátoru a vyhodnocen softwarem Bio - Vision®.

4.9.2 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu

Materiál:

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

Postup:

Z agarózového gelu byl pod UV lampou skalpelem vyříznut bloček o hmotnosti 100-300 mg, který obsahoval požadovaný fragment DNA. Dále se postupovalo dle pokynů výrobce soupravy High Pure PCR Product Purification Kit®. Nakonec byl produkt z kolonky eluován 25 µl 10 mM Tris-HCl.

4.9.3 Miniizolace plazmidové DNA

Materiál:

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

Postup:

Kultura *E. coli* byla zaočkována do 2 ml 2xYT média s příslušným antibiotikem. Po kultivaci přes noc při teplotě 37 °C byla kultura přenesena do 2ml mikrozkuvek. Následovala centrifugace při 14 000 x g po dobu 3 min. Supernatant byl odstraněn a pelet zamražen v teplotě -20 °C. Poté byl pelet resuspendován ve 200 µl P1 + 6 µl lysozymu a následovalo 15 min inkubace v teplotě 37 °C. Poté se k vzorku přidalo 400 µl P2 roztoku. Vzorek byl jemně promíchán převrácením mikrozkuvky a 5 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po přidání P3 a jemném promícháním následovala inkubace při 4 °C po dobu 10 min. Poté byla suspenze centrifugována 10 min při 14 000 x g a teplotě 10 °C.

710 µl supernatantu bylo odebráno do nové čisté 2ml mikrozkuvky a promícháno s dvojnásobným objemem EtOH (1420 µl). Směs s etanolem byla inkubována 15 min při 4 °C a následně centrifugována 10 min při 14 000 x g a teplotě 10 °C. Po odstranění supernatantu byla otevřená mikrozkuvka 10 min sušena při laboratorní teplotě. Pelet byl rozpuštěn v 75 µl acetát-MOPS a následně promíchán s 150 µl EtOH. Po 15 min inkubaci při 4 °C byla směs znovu centrifugována 10 min při 14 000 x g a 10 °C. Po centrifugaci následovalo odstranění supernatantu a vysušení při laboratorní teplotě. Nakonec byl pelet rozpuštěn v 50 µl 10 mM Tris-HCl. Vzorek byl analyzován pomocí agarózové elektroforézy.

V případě miniizolace plazmidové DNA z hostitelského kmene *C. glutamicum* byl postup stejný. Lišilo se pouze množství přidaného lysozymu (30 µl) a délka inkubace vzorku s puřem P1 (2 h).

4.9.4 Příprava vzorku na sekvenování

Materiál:

- High Pure Plasmid Isolation Kit®
- ddH₂O
- 10 µM sekvenační primer
- 10 mM Tris-HCl pH = 8,5

Postup:

Vyizolovaný plazmid byl přečištěn pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit® a následně eluován 25 µl 10 mM Tris-HCl. Směs pro sekvenaci obsahovala 500 ng plazmidové DNA, 2,5 µl sekvenačního primeru a ddH₂O k doplnění do celkového objemu 10 µl. Připravená směs byla sekvenována firmou Eurofins Genomics (Německo).

4.9.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Materiál:

- ddH₂O
- Green GoTaq® Reaction Buffer
- GoTaq® polymeráza
- 10 µM primery pro PCR
- 10 mM dNTP
- DNA templát

Postup:

Směs byla namíchána v ledové lázni dle příslušné tabulky (Tab. 1). Směs o výsledném objemu 25 µl byla promíchána a vložena do termocycleru, kde proběhl příslušný program (Tab. 2). Po proběhnutí programu byl výsledek PCR ověřen agarózovou elektroforézou.

Tabulka 1. Reakční směs pro PCR.

Chemikálie	Objem v 25 μ l
pufr	5 μ l
dNTP	0,5 μ l
primer 1	0,5 μ l
primer 2	0,5 μ l
polymeráza	0,12 μ l
ddH ₂ O	17,38 μ l
DNA	1 μ l

Tabulka 2. Průběh PCR reakce.

Reakce	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Iniciační denaturace	95	2 min	1
Denaturace	94	30 s	35
Hybridizace	54-60	30 s	
Syntéza DNA	72	30–200 s	
Konečná syntéza	72	5 min	1

4.9.6 Asociace syntetických komplementárních oligonukleotidů

Materiál:

- 100 μ M syntetické oligonukleotidy
- Platinum® *Taq* 10x High Fidelity PCR buffer (HiFi pufr)
- 50 mM MgSO₄
- ddH₂O

Postup:

Reakční směs byla smíchána do výsledného objemu 50 μ l (Tab. 3). Po promíchání byla umístěna do termocycleru, kde proběhl příslušný program. Nejdříve byla směs inkubována při 95° C po dobu 5 minut. Poté docházelo každou minutu ke snížení reasociační teploty o 1 °C až směs dosáhla teploty 45 °C. Nakonec došlo k ochlazení směsi na 4 °C.

Tabulka 3. Reakční směs hybridizace oligonukleotidů.

Chemikálie	objem v 50 μl
HiFi pufr	5 μ l
oligonukleotid 1	2,5 μ l
oligonukleotid 2	2,5 μ l
MgSO ₄	1,25 μ l
ddH ₂ O	39 μ l

4.9.7 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Materiál:

- Restrikční pufr – NEBuffer 3.1 (10x); CutSmart® (10x)
- Restrikční endonukleázy – BamHI-HF; EcoRI-HF; NsiI; PstI-HF; XbaI
- DNA
- ddH₂O

Postup:

V 1,5ml mikroskopické kádince byla připravena směs o výsledném objemu 30 μ l. Směs obsahovala 3 μ l odpovídajícího restrikčního pufru, 100-2000 ng DNA a 1 μ l restrikční endonukleázy. Restrikční směs byla doplněna ddH₂O do 30 μ l. Po promíchání směsi následovala 1-4h inkubace při 37 °C (delší doba v případě štěpení DNA určené pro klonování). Výsledek restrikčního štěpení byl analyzován elektroforézou.

4.9.8 Přečištění lineární DNA pomocí komerční soupravy

Materiál:

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

Postup:

Přečištění proběhlo za pomoci roztoků z komerční soupravy High Pure PCR Product Purification Kit® od firmy Roche dle manuálu výrobce. Nakonec byl přečištěný vzorek lineární DNA eluován z kolony 25 μ l 10 mM Tris-HCl.

4.9.9 Ligace DNA

Materiál:

- T4 DNA ligáza
- T4 DNA Ligase Reaction buffer (10x)
- 50 % (w/v) PEG 4000

Postup:

Ligační směs byla namíchána v 0,5ml mikrozkušavce. Obsahovala 1 μ l T4 DNA Ligase Buffer (10x), 1 μ l T4 DNA ligázy, 1 μ l PEG 4000 a fragmenty DNA v molárním poměru inzerť/vektor 3:1. Směs byla doplněna ddH₂O do celkového objemu 10 μ l. Vlastní ligace probíhala po dobu 4,5 h při teplotě 18 °C v termocyleru.

4.9.10 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Materiál:

- 0,1 M CaCl₂
- 45 % (w/v) glycerol

Postup:

Kultura *E. coli* TOP10 byla kultivována ve 2xYT médiu na rotační třepačce při teplotě 37 °C a 180 otáčkách za minutu do OD₆₀₀ = 0,5. Poté byl 1 ml kultury centrifugován (5000 x g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 0,5 ml 0,1 M ledového CaCl₂ a ponechán 30 min na ledu. Poté proběhla další centrifugace (5000 x g, 5 min, 10 °C), supernatant byl odstraněn a finálně resuspendován v 0,1 ml 0,1 M CaCl₂. Po přidání 25 μ l glycerolu byly kompetentní buňky okamžitě použity pro transformaci či uchovány -70 °C.

4.9.11 Transformace *E. coli* (Hanahan, 1983)

Materiál:

- Plazmidová DNA nebo ligační směs
- Antibiotikum (30 μ g/ml kanamycin; 10 μ g/ml tetracyklin; 100 μ g/ml ampicilin)

Postup:

Ke 100 μ l připravené suspenze kompetentních buněk *E. coli* TOP10 bylo přidáno 0,1-0,5 μ g plazmidu nebo 10 μ l ligační směsi. Poté byla suspenze ponechána 30 min v ledové lázni. Následovala inkubace ve vyhřátém termobloku při teplotě 42,5 °C po dobu 90 s. Poté byla směs 5 min ochlazena v ledové lázni a k suspenzi bylo přidáno 400 μ l tekutého média 2xYT. Regenerace buněk probíhala 45 min při 37 °C na třepačce. Následně bylo 200-300 μ l buněčné suspenze vyseto na pevné médium s příslušným antibiotikem. Inkubace buněk na pevném médiu při 37 °C trvala 24 hodin.

4.9.12 Příprava kompetentních buněk *C. glutamicum***Materiál:**

- Roztok G [10% glycerol (w/v)]
- Pufr GT [10% glycerol (v/v); 8 mM Tris-HCl; pH = 7,4]
- V případě již transformovaných buněk příslušné antibiotikum

Postup:

Kultura *C. glutamicum* z pevného média byla zaočkována do 10 ml 2xYT tekutého média a kultivována přes noc ve 30 °C. Narostlou kulturou bylo inokulováno 65 ml 2xYT média do $OD_{600} = 0,2$. Následná kultivace probíhala na třepačce při 30 °C do dosažení $OD_{600} = 0,5-0,8$ (celý proces trval 1,5 - 2 hodiny). Poté byla bakteriální kultura chlazená po dobu 30 min v ledu a byla provedena centrifugace kultury při 4500 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 30 ml GT. Následovala opět centrifugace (4500 x g, 4 °C) po dobu 10 min, po níž došlo znovu k odstranění supernatantu, a celý krok se zopakoval. Po dvojnásobném promytí v GT následovala resuspendace v 1 ml G a následné přenesení 175 μ l suspenze do jednotlivých mikrozkušavek. Takto připravené kompetentní buňky *C. glutamicum* byly použity ihned k elektroporaci nebo uchovávány v -70 °C.

4.9.13 Transformace *C. glutamicum* pomocí elektroporace

Materiál:

- Antibiotikum (30 µg/ml kanamycin; 10 µg/ml tetracyklin)
- Plazmidová DNA

Postup:

175 µl suspenze elektrokompetentních buněk *C. glutamicum* bylo smícháno s 1-10 µg plazmidové DNA. Směs byla inkubována 1 minutu v ledové lázni a poté přepipetována do vychlazené elektroporační kyvety. K provedení elektroporace posloužil elektroporátor GENE PULSER (parametry elektrického pulzu: napětí 2,5 kV; kapacita 25 µF a odpor 600 Ω). Po provedení elektroporace byl k suspenzi přidán 1 ml 2xYT. Po přenesení směsi zpět do 2ml mikrozkušavky následoval tepelný šok v termobloku při 46 °C po dobu 6 minut. Následně byly buňky regenerovány 2 hodiny při 30°C na třepačce. Poté byly buňky vysety na pevné médium s příslušným antibiotikem odpovídajícím rekombinantnímu plazmidu a dány do 30 °C.

4.9.14 Měření fluorescence *C. glutamicum* v bezbuněčném extraktu

Materiál:

- Pufr PBS; pH = 8,0
- 0,1 M PMSF
- 1 M IPTG
- Činidlo Bradfordové [0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 43% (v/v) EtOH; 8,5% (v/v) H₃PO₄]
- 10 mg/ml BSA
- 30 µg/ml kanamycin
- 10 µg/ml tetracyklin

Postup:

Inokulační kulturou, která byla kultivována v 10 ml 2YT s příslušným antibiotikem po dobu 16 hodin, bylo inokulováno 80 ml čerstvého 2xYT s týmž antibiotikem na OD₆₀₀ ≈ 0,6. Takto zaočkované baňky byly kultivovány na třepačce při teplotě 30 °C do OD₆₀₀ = 1,0. Po dosažení OD₆₀₀ = 1,0 bylo z baňky odebráno přibližně 15 ml kultury pro stanovení „bazální hodnoty specifické intenzity

fluorescence“. Z kultury bylo dále přeneseno 30 ml do nové kultivační baňky, zaindukováno 30 μ l 1 M IPTG (čas „0“) a dáno třepat, přičemž zbylá kultura byla dále kultivována jako kontrolní neindukovaný vzorek.

Pro měření fluorescence byla ve stanovených intervalech (3, 6 a 24 h po IPTG indukci) odebrána biomasa odpovídající vždy 7,2 mg suché hmotnosti buněk (4 ml při $OD_{600} = 3,0$). Odebraný vzorek byl ochlazen v ledové lázni a následně centrifugován 5 minut při 5000 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml vychlazeného PBS s přidaným PMSF (finální koncentrace v PBS byla 0,1 mM). Po další centrifugaci (1 min při 14 000 x g a 4 °C) byl pelet resuspendován v 500 μ l PBS a takto připravené vzorky byly uchovávány v chladu a temnu.

Po posledním odběru byly všechny zpracované vzorky přeneseny do speciálních 2 ml mikrozkuvek s připravenými skleněnými mikrokuličkami Balotina o průměru do 0,5 mm (200 μ l) a homogenizovány třikrát po dobu 1 min při rychlosti 6,5 m/s. Následovala centrifugace homogenizovaných vzorků (20 min, 14 000 x g, 10 °C), po níž bylo odebráno 260 μ l bezbuněčného extraktu do nové mikrozkuvky.

Koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu byla změřena metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976). Do plastových kyvet bylo napipetováno 10 μ l bezbuněčného lyzátu a 10 μ l H_2O . K vzorkům bylo přidáno 980 μ l činidla Bradfordové. Standardy BSA byly připraveny o koncentracích 0,1 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,75 mg/ml a 1 mg/ml. 20 μ l standardů bylo s 980 μ l Bradfordova činidla napipetováno do plastové kyvety. Po 30 min inkubaci byla pomocí spektrometru změřena absorbance standardů při vlnové délce 595 nm, na jejímž základě byla stanovena kalibrační křivka. Následně byla změřena absorbance jednotlivých vzorků a dle kalibrační křivky vypočtena koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu.

Pro měření intenzity fluorescence v bezbuněčném extraktu fluorimetrem Safire² (parametry viz Tab. 4) bylo přeneseno 200 μ l vzorků do jamek mikrotitrační destičky NuncloneTM Delta Surface. Zjištěná intenzita fluorescence (AU) byla poté vztažena na množství proteinů v jednotlivých vzorcích (AU/mg).

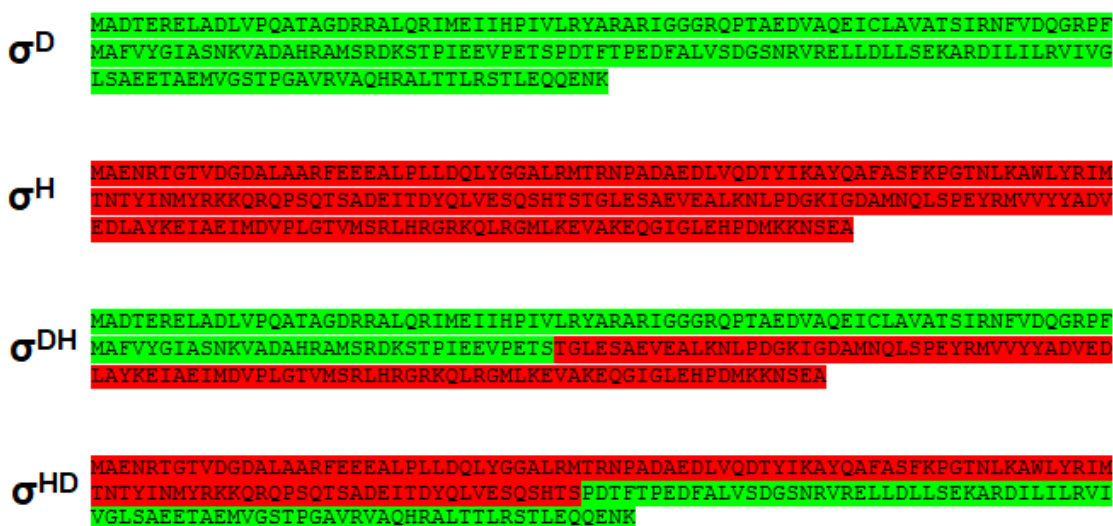
Tabulka 4. Nastavení parametrů Safire².

Parametr měření	Hodnota
Vlnová délka excitace	397 nm
Vlnová délka emise	509 nm
Šířka excitační štěrby	5,0 nm
Šířka emisní štěrby	20,0 nm
Doba třepání	5 s
Doba usazování	10 s
Mód snímání	spodní
Integrační čas	40 μ s

5 Výsledky

5.1 Design hybridních faktorů sigma a hybridních promotorů

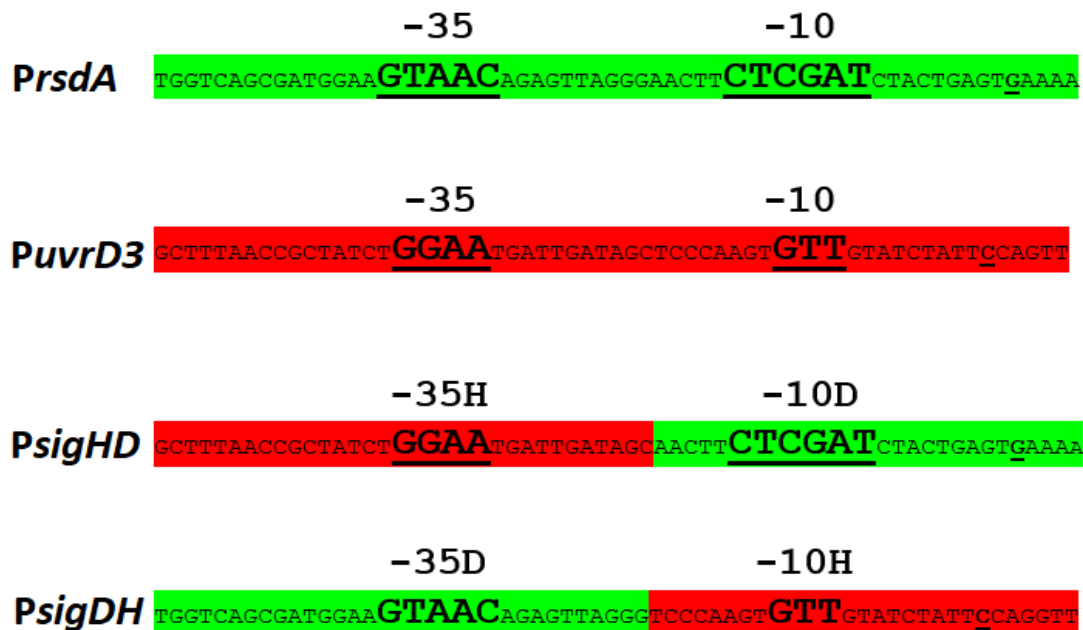
Faktory σ^H a σ^D z kmene *C. glutamicum* téměř striktně rozeznávají promotory se silně konzervovanými promotory GGAA^T/_G – 18 nt – GTT (σ^H) a GTAAC – 18 nt – GAT (σ^D). Vzhledem k předpokladu, že regulony těchto faktorů sigma jsou výlučné (nepřekrývají se), jako kombinace pro tvorbu hybridů byly zvoleny právě tyto faktory sigma. Výchozím bodem práce byl návrh sekvencí hybridních faktorů σ^{DH} a σ^{HD} a hybridních promotorů *PsigDH* a *PsigHD* (J. Nešvera). U hybridních faktorů σ byly pomocí kombinací sekvencí genů vyměněny odpovídající úseky genů kódující doménu σ_4 , takže gen kódující σ^{DH} nesl σ_4 doménu faktoru σ^H a gen kódující σ^{HD} naopak nesl σ_4 doménu faktoru σ^D (Obr. 7). Hranice obou částí byly zvoleny v oblastech, kde podle *in silico* modelů nemají proteiny σ^H a σ^D zřejmé sekundární struktury.



Obrázek 7. Aminokyselinové sekvence přirozených a hybridních faktorů σ . Zeleně jsou vyznačeny aminokyselinové zbytky pocházející z faktoru σ^D a červeně pocházející z faktoru σ^H .

Hybridní promotory byly vytvořeny kombinací konvenčních sekvencí -35 a -10 oblastí přirozeného typického σ^H -dependentního promotoru *PuvrD3* a výlučně σ^D -dependentního promotoru *PrsdA*. Promotor *PsigDH* je tvořen -35 oblastí *PrsdA*

a -10 oblastí *PuvrD3* a promotor *PsigHD* -35 oblastí *PuvrD3* a -10 oblastí *PrsdA* (Obr. 8). Hranice pro kombinaci úseků sekvence DNA byla zvolena podle oblasti, kde nejsou konvenční sekvence promotorů konzervovány. Podle našich předpokladů měl hybridní faktor σ^{DH} rozpoznávat hybridní promotor *PsigHD* a naopak hybridní faktor σ^{HD} měl být specifický pro promotor *PsigDH*.



Obrázek 8. Nukleotidové sekvence hybridních promotorů. Zeleně jsou znázorněny sekvence pocházející ze σ^{D} -dependentního promotoru, zatímco červeně ze σ^{H} -dependentního promotoru. Zvýrazněny a podtrženy jsou odpovídající konvenční sekvence jednotlivých promotorů. Podtržený a nezvýrazněný nukleotid představuje transkripční start v pozici +1.

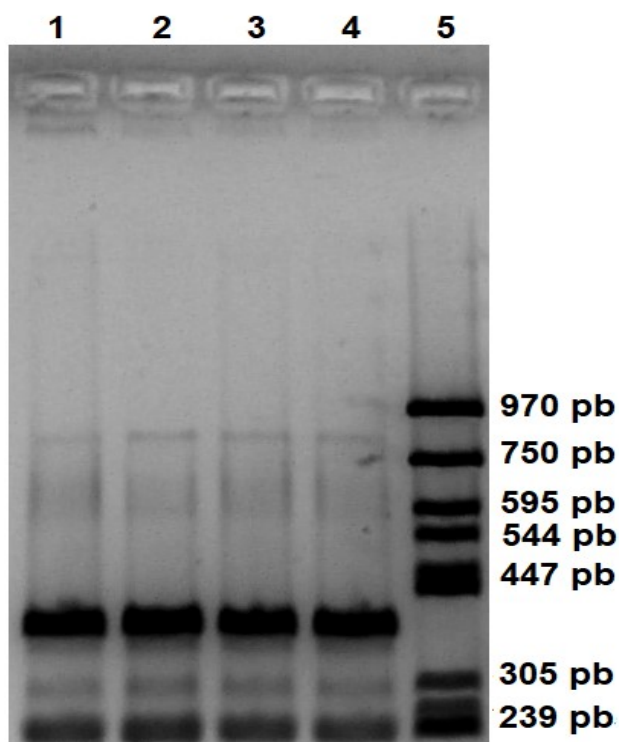
5.2 Konstrukce plazmidů s hybridními promotory

pEPR1*PsigDH* a pEPR1*PsigHD*

Komplementární páry oligonukleotidů PCGHDF + PCGHDR a PCGDHF + PCGDHR s promotorovými sekvencemi odpovídajícími *PsigHD* či *PsigDH* byly asociovány v termocycleru a pak ligovány s vektorem pEPR1 štěpeným enzymy *Bam*HI a *Nsi*I. Poté byly touto ligační směsí transformovány kompetentní buňky *E. coli* TOP10 a vysety na pevné 2xYT médium s kanamycinem.

Z 8 náhodně vybraných kolonií získaných po transformacích kmene *E. coli* TOP10 oběma ligačními směsmi byla vyizolována plazmidová DNA. Úspěšnost

izolace plazmidu byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy. K ověření přítomnosti vloženého promotoru byla s 50x ředěnými plazmidovými DNA provedena standardní PCR za použití kombinace primerů GFP1 + TRPTCGF1 a GoTaq[®] DNA polymerázy. Získané PCR produkty byly následně analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obr. 9). U čtyř plazmidů, jejichž PCR produkty odpovídaly požadované velikosti, byla nukleotidová sekvence klonovaných hybridních promotorů ověřena sekvenací. Rekombinantní plazmidy pEPR1P*sigDH1* a pEPR1P*sigHD2* nesoucí potvrzené požadované nukleotidové sekvence byly nově purifikovány z odpovídajících kultur *E. coli* TOP10(pEPR1P*sigDH1*) a TOP10(pEPR1P*sigHD2*).



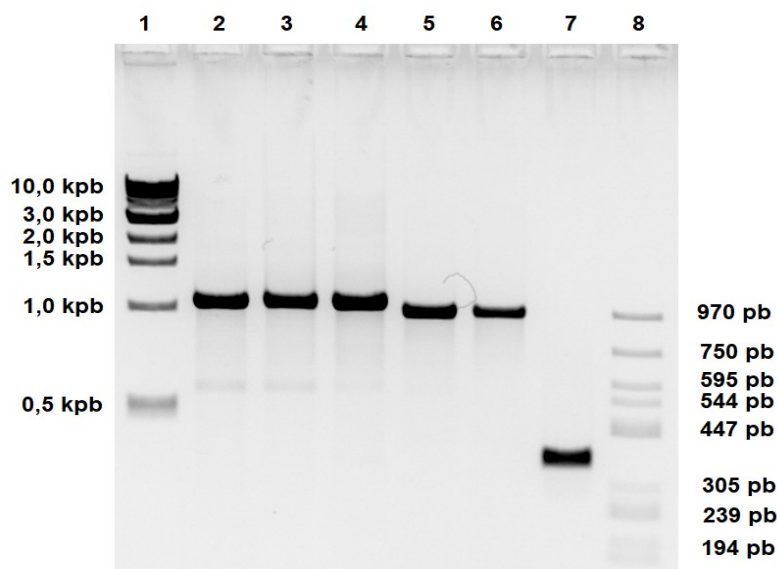
Obrázek 9. PCR produkty získané na 50x ředěných plazmidových templátech pomocí kombinace primerů GFP1 + TRPTCGF1 a GoTaq[®] DNA polymerázy. Dráha č. 1: templát pEPR1P*sigDH1*, dráha č. 2: templát pEPR1P*sigHD2*, dráha č. 3: templát pEPR1P*sigHD1*, dráha č. 4: templát pEPR1P*sigHD2*, dráha č. 5: lineární DNA marker 155-970.

5.3 Příprava plazmidů s hybridními faktory sigma, pEC-XT99AsigDH a pEC-XT99AsigHD

Jelikož hybridní geny *sigDH* a *sigHD* byly syntetizovány firmou Thermo Fisher Scientific a dodány na plazmidu pMA-RQ, bylo třeba je nejprve překlonovat do expresního vektoru pEC-XT99A.

Z agarózového gelu byly vyizolovány *EcoRI* a *XbaI* - štěpené fragmenty pMA-RQ*sigDH* či pMA-RQ*sigHD* nesoucí geny kódující hybridní faktory σ^{DH} či σ^{HD} . Vektor pEC-XT99A byl štěpen také pomocí *EcoRI*, *XbaI*. Poté následovala ligace štěpeného vektoru pEC-XT99A s fragmenty obsahujícími geny *sigDH* a *sigHD*.

Oběma vytvořenými ligačními směsmi byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* TOP10. Klony, které narostly na 2xYT pevné půdě s tetracyklinem, byly následně ověřovány pomocí restriční analýzy (*PstI*) a standardní PCR pomocí primerů ECXT99AF + ECXT99AR a GoTaq[®] polymerázy (Obr. 10). U velikostně správných konstruktů byla sekvence genů kódujících hybridní faktory σ^{DH} či σ^{HD} ověřena sekvenací. Ověřené rekombinantní plazmidy pEC-XT99AsigDH3 a pEC-XT99AsigHD2 byly purifikovány a před dalším použitím uchovávány při -20 °C.



Obrázek 10. PCR analýza rekombinantních konstruktů pEC-XT99AsigDH a pEC-XT99AsigHD. Dráha č. 1: lineární 1 kb DNA marker, dráha č. 2-4: PCR produkty na templátu pEC-XT99AsigDH1 – pEC-XT99AsigDH3 (cca 1040 pb), dráha č. 5: PCR produkt na templátu pEC-XT99AsigHD1 (cca 970 pb); dráha č. 6: PCR produkt na templátu pEC-XT99AsigHD2 (cca 970 pb); dráha č. 7: PCR produkt na templátu pEC-XT99A (cca 340 pb); dráha č. 8: lineární marker DNA marker 155-970.

5.4 Vytvoření dvouplazmidových kmenů a analýza aktivity promotorů

5.4.1 Příprava a ověření dvouplazmidových kmenů

K *in vivo* analýze interakce promotorů s faktory σ se v Laboratoři molekulární genetiky bakterií využívá dvouplazmidový systém: v jedné buňce *C. glutamicum* se zároveň replikují 2 typy rekombinantních plazmidů: expresní vektor pEC-XT99A s vloženým genem kódujícím faktor σ a promotor-test vektor pEPR1 s analyzovaným promotorem. Reportérový gen *gfpuv* nesený vektorem pEPR1 umožňuje stanovit aktivitu promotoru na základě měření fluorescence produkovaného GFP.

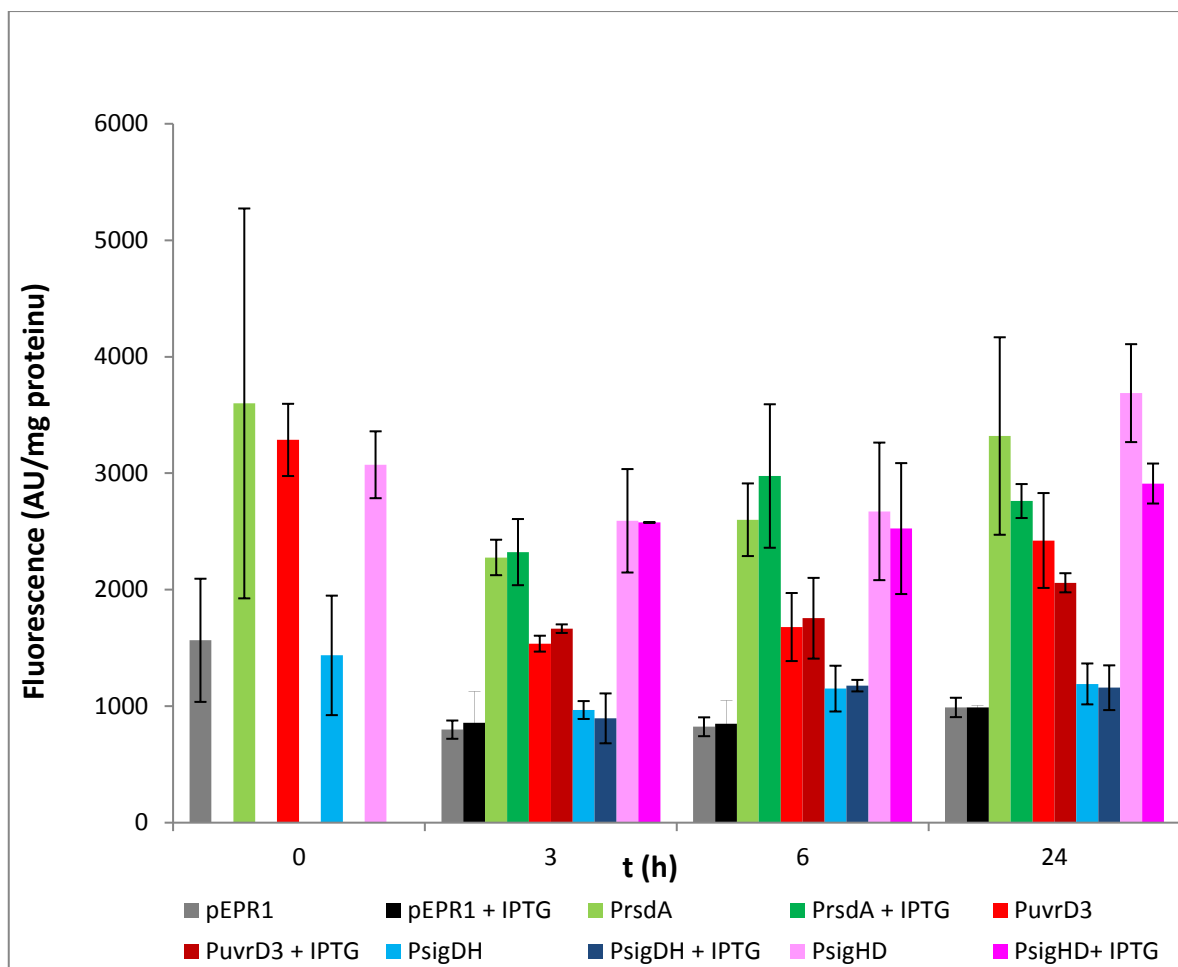
Všechny dále testované dvouplazmidové kmeny *C. glutamicum* (pEC-XT99A*sig*„X“ + pEPR1P*sig*„Y“) byly připraveny dvoustupňově, tj. nejdříve byl hostitelský kmen *C. glutamicum* transformován rekombinantním plazmidem založeným na expresním vektoru pEC-XT99A, z takto vzniklého konstruktů byly připraveny nové kompetentní buňky a teprve ty byly finálně transformovány rekombinantním plazmidem nesoucím klonovaný promotor pEPR1P*sig* „Y“.

Správnost takto získaných dvouplazmidových systémů byla ověřena jak restriční analýzou (*Pst*I) izolovaných rekombinantních plazmidů, tak i standardní PCR pomocí primerů GFP1 + TRPTCGF1 či ECXT99AF + ECXT99AR a GoTaq® polymerázy na 50x ředěných izolátech jako templátu. Odpovídající konstrukty, a to včetně rekombinantního klonu nesoucího jeden rekombinantní plazmid a prázdný vektor pEPR1, byly následně uchovány v glycerolových konzervách při -70 °C a dále analyzovány metodou měření intenzity fluorescence za podmínek IPTG - indukované nadexprese klonovaného genu kódujícího příslušný faktor σ .

Co se týče následných srovnávacích kvantitativních analýz takto připravených dvouplazmidových systémů pomocí metody měření fluorescence, všechny experimenty byly prováděny stejně, tj. vzorky byly odebírány vždy 3, 6 a 24 hodin po indukci exprese genu *sig*„X“ pomocí 1 mM IPTG (kultura v čase 0 při OD₆₀₀ cca 1,0). V jednom experimentu byla vždy testována sada klonovaných promotorů (*PrsdA* a *PuvrD3*, *PsigDH* a *PsigHD*) s týmž nadprodukováným faktorem σ .

5.4.2 Aktivita hybridních promotorů řízená hybridními faktory sigma

Pro dvouplazmidové systémy nadprodukcující hybridní faktor σ^{DH} bylo zjištěno, že v podstatě nijak nereagují na indukci pomocí IPTG, neboť výsledné hodnoty specifické intenzity fluorescence byly u odpovídajících promotorů za indukovaných podmínek téměř totožné (Obr. 11).

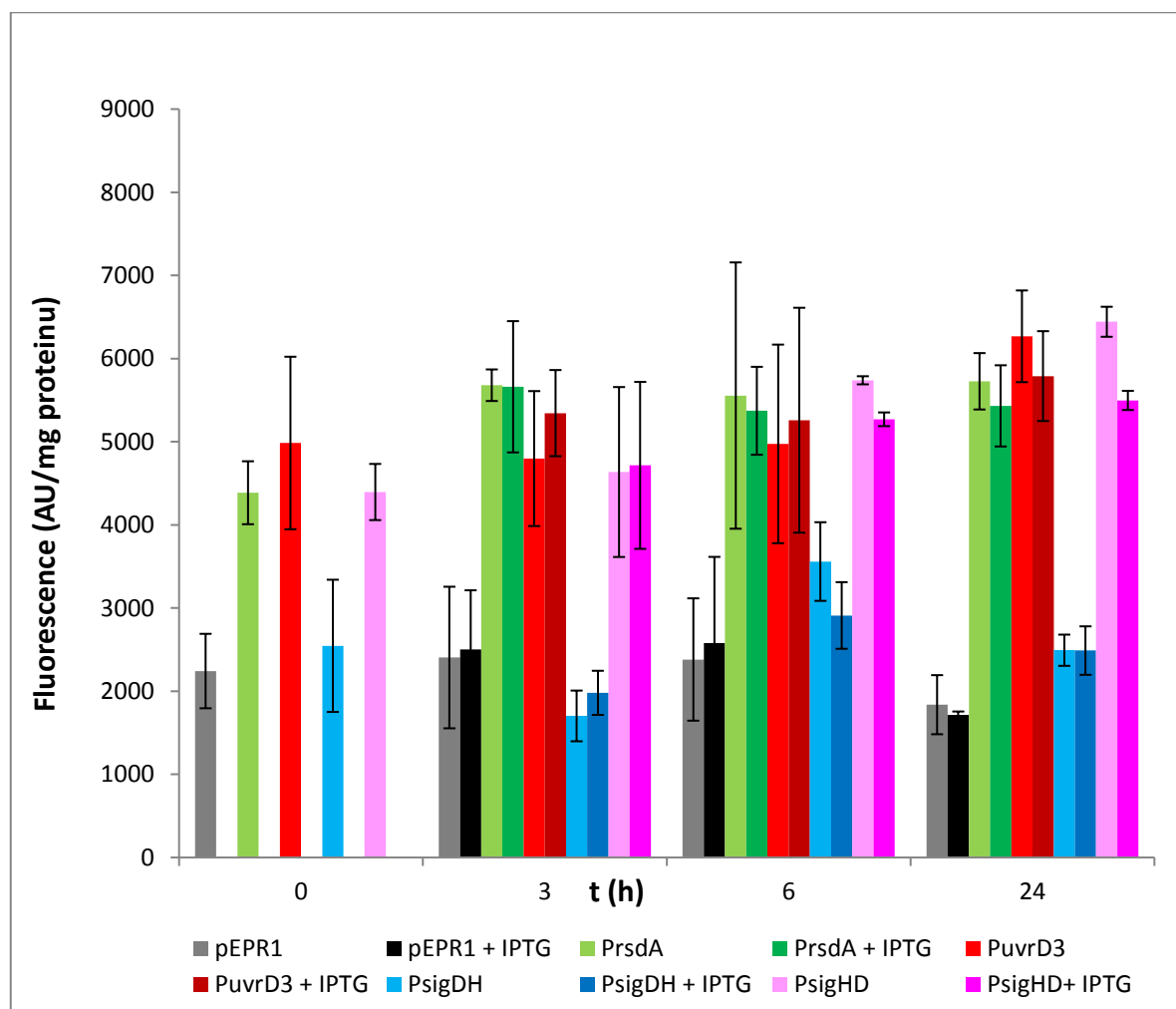


Obrázek 11. Aktivita sady promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genu kódujícího faktor σ^{DH} . Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu vynesené proti času v hodinách. Šedě je znázorněn samotný vektor pEPR1, zeleně kontrolní σ^{D} -dependentní promotor *PrsdA*, červeně kontrolní σ^{H} -dependentní promotor *PuvrD3*, modře hybridní promotor *PsigDH* a růžově *PsigHD*. Světlé odstíny platí pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze dvou nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z analýzy zároveň vyplynulo, že se hybridní promotor *PsigHD* chová obdobně jako σ^{D} -dependentní kontrola *PrsdA*, jejichž hodnoty specifické intenzity fluorescence dosahovaly přibližně trojnásobku hodnot naměřených pro

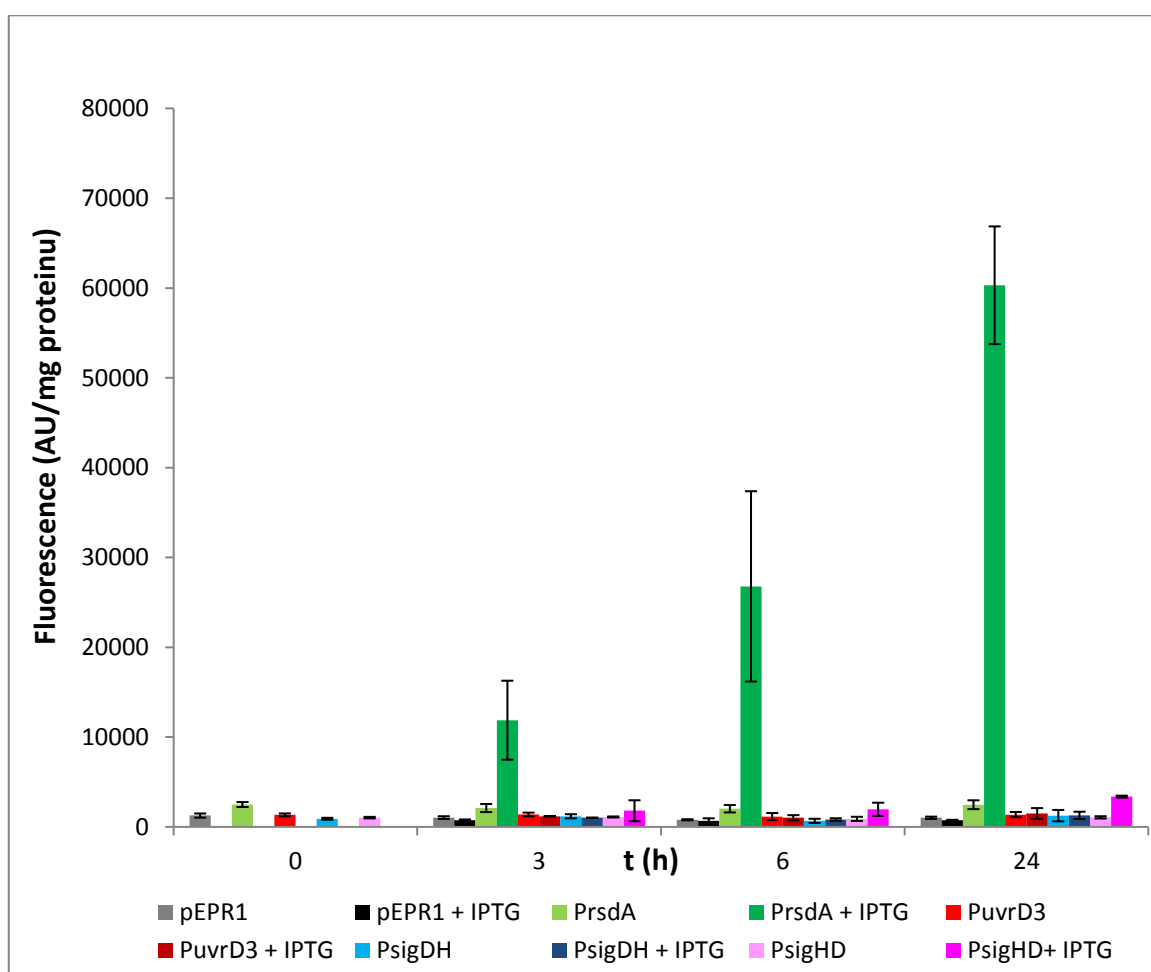
dvouplazmidový systém se samotným promotor - test vektorem pEPR1 („bazální hodnota systému“ nepřevýšila 1000 AU/mg proteinu), zatímco specifická intenzita fluorescence zjištěná pro hybridní promotor *PsigDH* se od této bazální hodnoty systému nijak výrazně nelišila.

Chování dvouplazmidového systému nadprodukcujícího druhý hybridní faktor σ^{HD} bylo, co se týče fluorescenční intenzity, velice obdobné jako u již zmíněného systému založeného na hybridním faktoru σ^{DH} . Jedinou, i když výraznou změnou, byly zcela srovnatelné hodnoty specifické intenzity fluorescence naměřené jak pro hybridní promotor *PsigHD*, tak i pro oba zástupce přírodních σ^D - i σ^H -dependentních promotorů zároveň (Obr. 12).



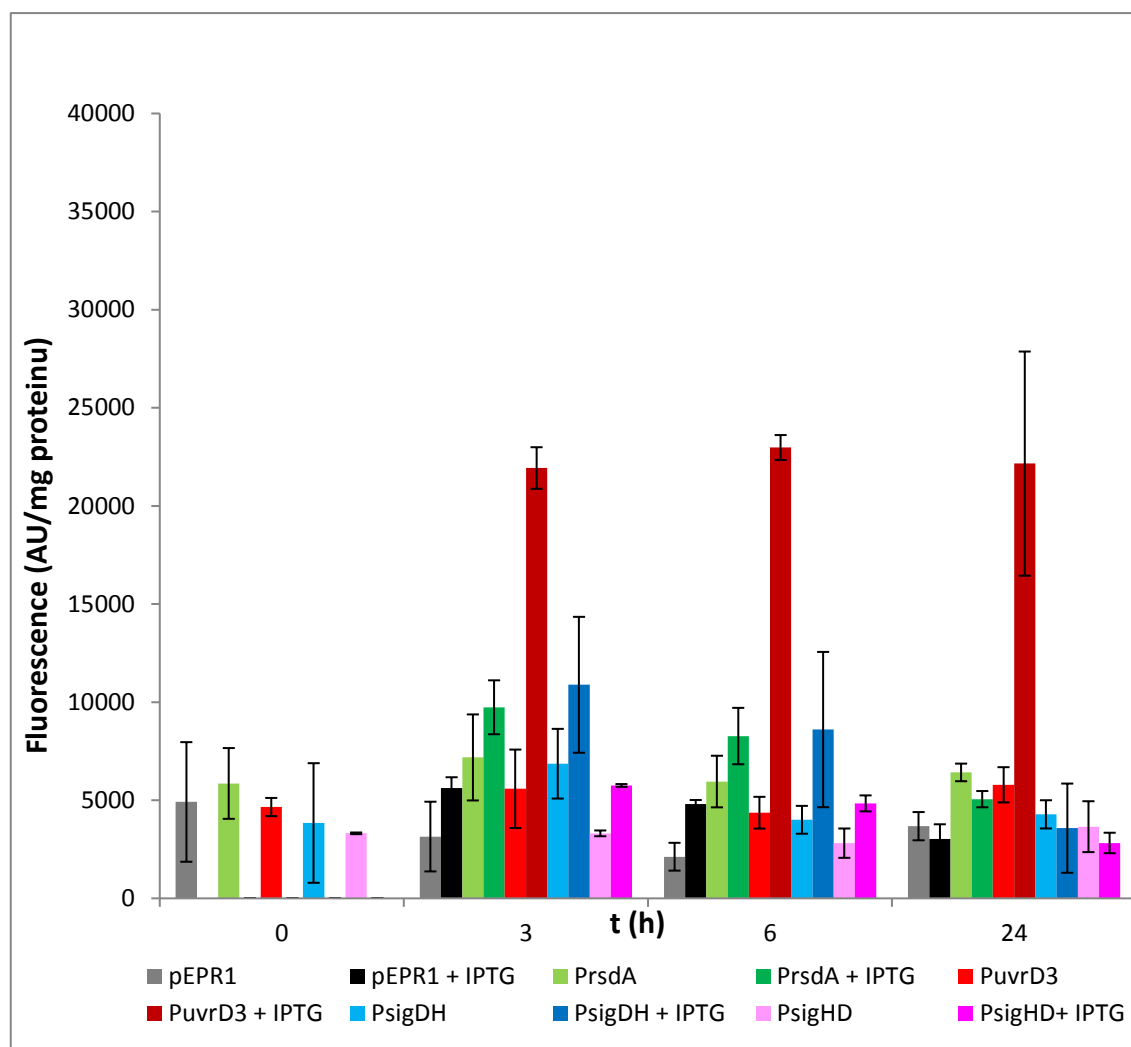
Obrázek 12. Aktivita sady promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genu kódujícího faktor σ^{HD} . Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu vynesené proti času v hodinách. Šedě je znázorněn samotný vektor pEPR1, zeleně kontrolní σ^D -dependentní promotor *PrsdA*, červeně kontrolní σ^H -dependentní promotor *PuvrD3*, modře hybridní promotor *PsigDH* a růžově *PsigHD*. Světlé odstíny platí pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze dvou nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

V kontrolním dvouplazmidovém systému nadprodukcujícím přirozený faktor σ^D (Obr. 13) již došlo k očekávanému výraznému zvýšení aktivity přirozeného σ^D -dependentního promotoru *PrsdA* za indukčních podmínek (hodnoty specifické intenzity fluorescence činily více než dvacetinásobek odpovídajících hodnot naměřených za neindukčního stavu). Zároveň se, i když v mnohem menší míře, zvýšila i aktivita hybridního promotoru *PsigHD* (pozorovaný vzrůst byl přibližně trojnásobný v čase 24 h po indukci), avšak v tomto případě byly absolutní hodnoty specifické intenzity fluorescence velmi nízké (necelých 3400 AU/mg proteinu ve 24. hodině po indukci), zatímco pro přirozený promotor *PrsdA* tato hodnota přesahovala 60 000 AU/mg proteinu.



Obrázek 13. Aktivita sady promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genu kódujícího faktor σ^D . Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu vynesené proti času v hodinách. Šedě je znázorněn samotný vektor pEPR1, zeleně kontrolní σ^D -dependentní promotor *PrsdA*, červeně kontrolní σ^H -dependentní promotor *PuvrD3*, modře hybridní promotor *PsigDH* a růžově *PsigHD*. Světlé odstíny platí pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Znárodně výsledky jsou aritmetické průměry ze dvou nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Během fluorescenční analýzy v systému nadprodukcujícím přirozený faktor σ^H došlo za indukčních podmínek k očekávanému velkému nárůstu aktivity přirozeného σ^H -dependentního promotoru *PuvrD3* (přibližně pětinasobnému oproti systému bez induktoru). Mírný, a to nejvýše dvojnásobný, nárůst intenzity fluorescence za indukčních podmínek byl dokonce zaznamenán i v systémech s oběma hybridními faktory *PsigDH* a *PsigHD*, avšak v tomto případě musíme brát v potaz i potenciální zkreslení tohoto výsledku kvůli velkému rozptylu naměřených hodnot, neboť v 24. hodině po indukci se aktivita těchto obou promotorů dostala na hodnotu srovnatelnou s hodnotou bazální fluorescence systému (Obr. 14).

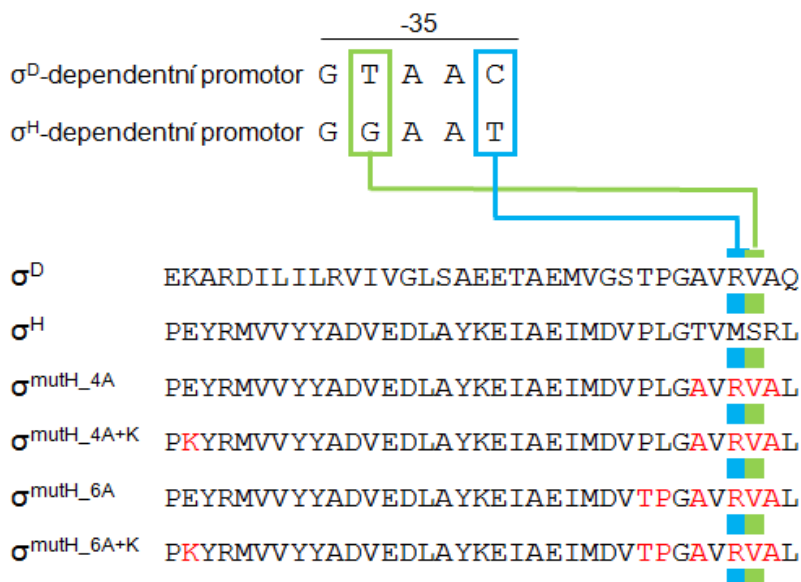


Obrázek 14. Aktivita sady promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genu kódujícího faktor σ^H . Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu vynesené proti času v hodinách. Šedě je znázorněn samotný vektor pEPR1, zeleně kontrolní σ^D -dependentní promotor *PrsdA*, červeně kontrolní σ^H -dependentní promotor *PuvrD3*, modře hybridní promotor *PsigDH* a růžově *PsigHD*. Světlé odstíny platí pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze dvou nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

5.4.3 Aktivita promotorů řízených modifikovanými faktory σ^H

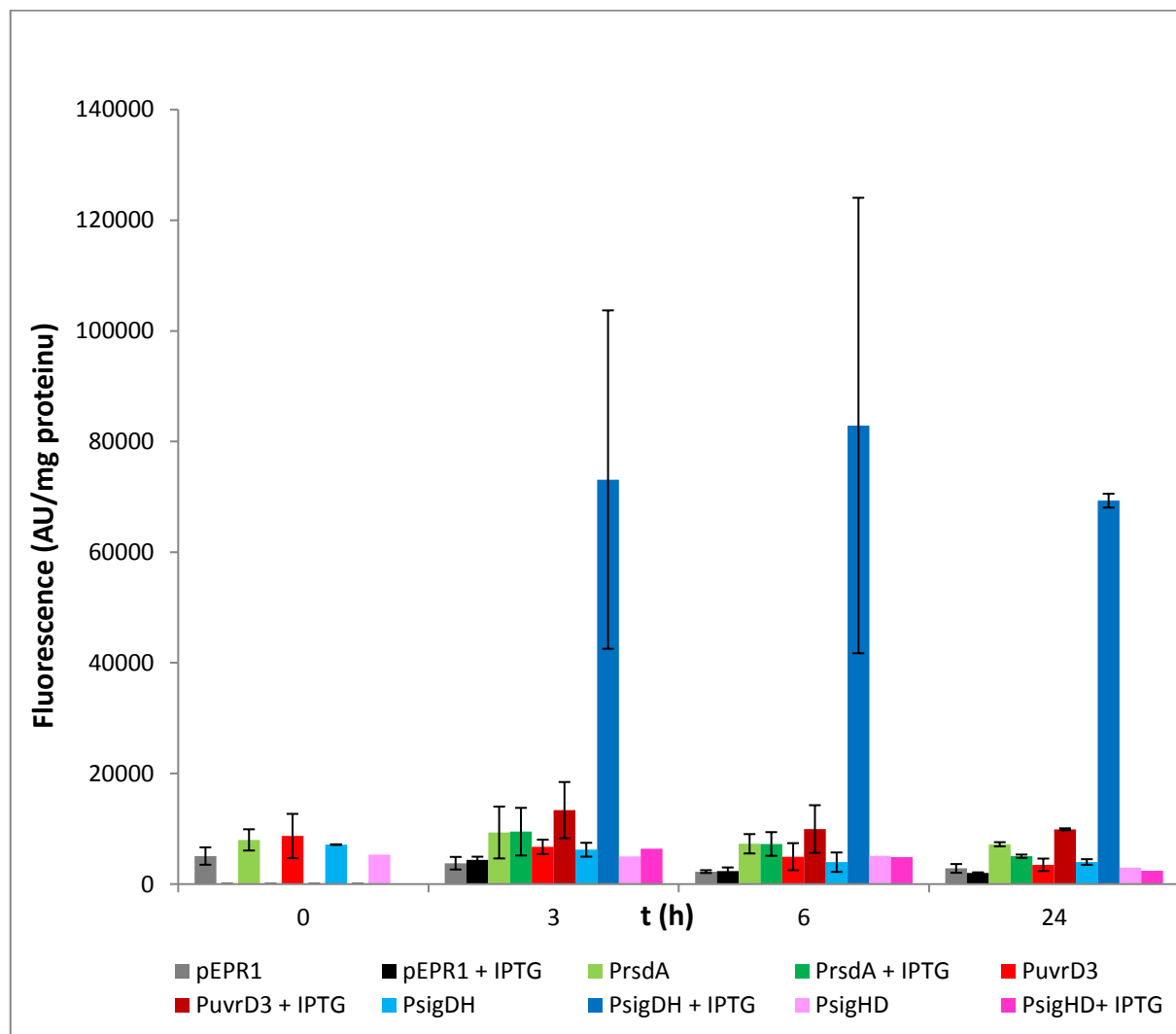
Protože ani jeden z testovaných hybridních faktorů σ^{DH} či σ^{HD} nerozeznával odpovídající hybridní promotory dle našich původních předpokladů, rozhodli jsme se tyto hybridní promotory dále testovat i v přítomnosti nadprodukovaných cíleně modifikovaných faktorů σ^H .

Na základě *in silico* homologního modelování a molekulární dynamiky (Dr. Barvík, Fyzikální ústav UK Praha) byla pomocí Q5[®] *Site-Directed Mutagenesis Kit* vytvořena sada 4 mutantů faktoru σ^H v doméně σ_4 (σ^{mutH_4A} , $\sigma^{\text{mutH}_4A+K}$, σ^{mutH_6A} a $\sigma^{\text{mutH}_6A+K}$; Dr. Štěpánek). Všechny tyto mutanty nesly záměny umožňující teoretickou interakci s -35 konvenční oblastí σ^D -dependentních promotorů (Obr. 15), čímž mohly lépe rozpoznávat hybridní promotor *PsigDH*, přičemž pozitivně nabitý aminokyselinový zbytek lysinu K₁₄₀ měl u modifikovaných faktorů $\sigma^{\text{mutH}_4A+K}$ a $\sigma^{\text{mutH}_6A+K}$ opětne restabilizovat komplex mutovaného faktoru σ^H A₁₆₈VRVA₁₇₂ s -35 konvenční oblastí σ^D -promotoru, jehož stabilita byla negativně ovlivněna záměnou původního argininu R₁₇₂ za alanin, zatímco posun prolinového zbytku o jednu pozici umožnil díky flexibilitě své molekuly podstatně vhodnější sekundární strukturu modifikovaných faktorů σ^{mutH_6A} a $\sigma^{\text{mutH}_6A+K}$ pro jejich interakci s -35 oblastí promotoru.



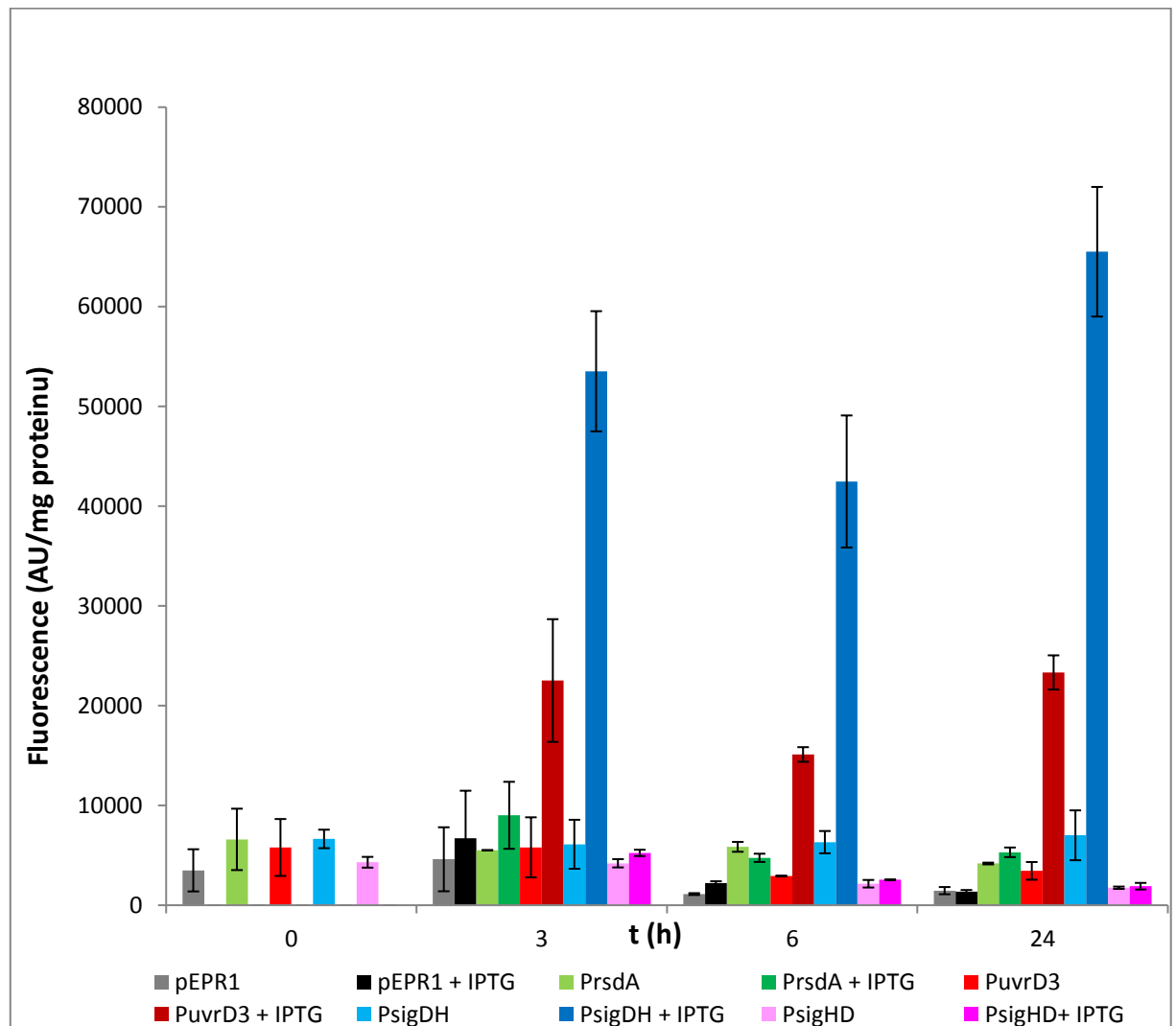
Obrázek 15. Interakce lišících se nukleotidů -35 konvenční oblasti σ^D - a σ^H -dependentních promotorů s odpovídajícími interagujícími aminokyselinovými zbytky nativních a modifikovaných faktorů σ . Červeně jsou vyznačeny provedené mutace u modifikovaných faktorů σ^{mutH} .

Jelikož dřívější analýza nativního hybridního promotoru *P_{lpd}* neprokázala rozpoznávání tohoto promotoru (Dostálová *et al.*, 2019) v pořadí prvním, a to v podstatě nejjednodušším, mutantním faktorem $\sigma^{\text{mutH}_{4A}}$ (nepublikované výsledky Laboratoře molekulární genetiky bakterií), nebyl tento modifikovaný faktor $\sigma^{\text{mutH}_{4A}}$, na rozdíl od ostatních dosud netestovaných modifikovaných faktorů $\sigma^{\text{mutH}_{6A}}$, $\sigma^{\text{mutH}_{6A+K}}$ a $\sigma^{\text{mutH}_{4A+K}}$, do experimentální části této diplomové práce zahrnut.



Obrázek 16. Aktivita sady promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genu kódujícího faktor $\sigma^{\text{mutH}_{6A}}$. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu vynesené proti času v hodinách. Šedě je znázorněn samotný vektor pEPR1, zeleně kontrolní σ^D -dependentní promotor *PrsdA*, červeně kontrolní σ^H -dependentní promotor *PuvrD3*, modře hybridní promotor *PsigDH* a růžově *PsigHD*. Světlé odstíny platí pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze dvou nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

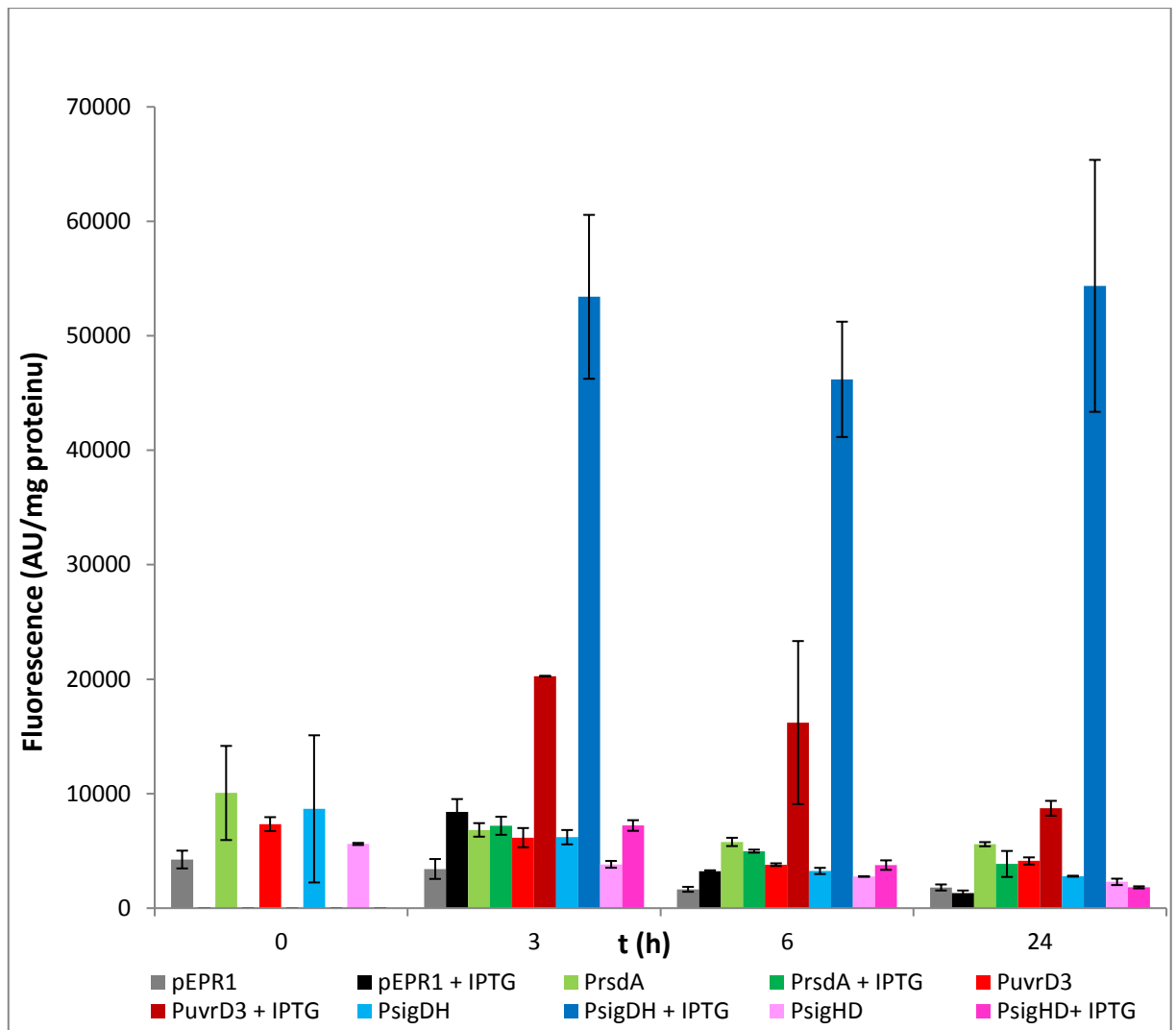
V dvouplazmidovém systému nadprodukcujícím faktor $\sigma^{\text{mutH}_{6A}}$ došlo k výraznému vzrůstu aktivity hybridního promotoru *PsigDH* za indukčních podmínek (až dvacetinásobek specifické hodnoty fluorescence oproti stavu bez IPTG, bohužel opět s velkým rozptylem naměřených hodnot; Obr. 16). Mírný nárůst aktivity promotoru nastal i v případě přirozeného σ^{H} -dependentního promotoru *PuvrD3*, kdy specifická intenzita fluorescence po indukci dosáhla přibližně dvojnásobného zvýšení, avšak v absolutním vyjádření jde o prakticky zanedbatelné hodnoty.



Obrázek 17. Aktivita sady promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genu kódujícího faktor $\sigma^{\text{mutH}_{6A+K}}$. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu vynesené proti času v hodinách. Šedě je znázorněn samotný vektor pEPR1, zeleně kontrolní σ^{D} -dependentní promotor *PrsdA*, červeně kontrolní σ^{H} -dependentní promotor *PuvrD3*, modře hybridní promotor *PsigDH* a růžově *PsigHD*. Světlé odstíny platí pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze dvou nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Dále byla sledována aktivita promotorů ve dvouplazmidovém systému nadprodukcujícím faktor $\sigma^{\text{mutH}_{6A+K}}$ (Obr. 17). Indukce pomocí IPTG opět výrazně ovlivnila aktivitu hybridního promotoru *PsigDH* a způsobila přibližně devítinásobný nárůst specifické intenzity fluorescence oproti neindukovanému stavu. Zároveň po přidání IPTG došlo i k nárůstu aktivity přírodního σ^{H} -dependentního promotoru *PuvrD3*, a to v podstatě na pětinásobek hodnoty specifické intenzity fluorescence bez přidaného induktoru, což však představovalo jen přibližně 35% hodnoty zjištěné pro *PsigDH*.

V posledním testovaném dvouplazmidovém systému nadprodukcujícím faktor $\sigma^{\text{mutH}_{4A+K}}$ (Obr. 18) byl opět zjištěn velmi výrazný vliv indukce na aktivitu hybridního promotoru *PsigDH*, neboť v tomto případě se hodnoty specifické intenzity fluorescence postupně zvyšovaly až na téměř dvacetinásobek v čase 24 hodin po indukci oproti neindukovanému stavu. Indukovaná nadprodukce modifikovaného faktoru $\sigma^{\text{mutH}_{4A+K}}$ však podstatně ovlivnila i expresi *gfpuv* z přirozeného σ^{H} -dependentního promotoru *PuvrD3* (v tomto případě byl nejvyšší, a to více než čtyřnásobný, nárůst aktivity promotoru pozorován v čase 6 h po indukci), avšak i z absolutních hodnot specifické intenzity fluorescence je zřejmé, že tento přírodní promotor *PuvrD3* je rozeznáván podstatně hůře než sledovaný hybridní konstrukt *PsigDH*.



Obrázek 18. Aktivita sady promotorů v kmenech s indukovanou nadexpresí genu kódujícího faktor $\sigma^{\text{mutH}_{4A+K}}$. Sloupce udávají hodnotu naměřené intenzity fluorescence v jednotkách AU/mg proteinu vynesené proti času v hodinách. Šedě je znázorněn samotný vektor pEPR1, zeleně kontrolní σ^D -dependentní promotor *PrsdA*, červeně kontrolní σ^H -dependentní promotor *PuvrD3*, modře hybridní promotor *PsigDH* a růžově *PsigHD*. Světlé odstíny platí pro neindukované systémy a tmavé pro systémy indukované IPTG. Znárodně výsledky jsou aritmetické průměry ze dvou nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

6 Diskuze

Se stoupajícím zájmem o využití σ -modifikovaných expresních systémů *Corynebacterium glutamicum* v biotechnologiích (Kim *et al.*, 2016; Taniguchi *et al.*, 2017a), a to i v souvislosti s rozmachem syntetické biologie, se molekulární biologové snaží o striktní modulaci heterologní genové exprese, která by, pokud možno, zasahovala co nejméně do regulace exprese genů vlastního hostitelského organismu. K potvrzení toho, že promotor určitého operonu patří do regulonu konkrétního faktoru σ (v návaznosti na sekvenování transkriptomu, které provádíme na partnerském pracovišti na Univerzitě v Bielefeldu), se v naší Laboratoři molekulární genetiky bakterií využívá kombinace metod *in vivo* (měření specifické aktivity promotoru genu v dvouplazmidovém systému; Dostálová *et al.*, 2017) a *in vitro* (*in vitro* transkripce) (Holátko *et al.*, 2012; Knoppová *et al.*, 2007).

Cílem diplomové práce bylo vytvořit expresní systémy *C. glutamicum* tvořené hybridními faktory σ , které se skládají z alternativních (stresových) faktorů σ^D a σ^H , a hybridními promotory rozpoznávanými těmito faktory σ . S ohledem na doménové uspořádání těchto faktorů σ se jedná o nejjednodušší typy faktorů σ , neboť jsou tvořeny pouze dvěma doménami (σ_2 a σ_4), propojenými flexibilním *linkerem* (Lin *et al.*, 2019; Staroň *et al.*, 2009). Faktor σ^D hraje roli za limitace kyslíku a při poškození buněčné stěny (Ikeda *et al.*, 2009; Taniguchi *et al.*, 2017b), zatímco faktor σ^H se uplatňuje hlavně během odpovědi na teplotní a oxidativní stres. Působení faktoru σ^H (který je považován za jeden z globálních regulátorů) je však pleiotropní, protože se podílí i na expresi genů kódujících další faktory σ , a to σ^A , σ^B , a σ^M (Holátko *et al.*, 2012; Larisch *et al.*, 2007).

Jelikož publikované výsledky poukazovaly na vysokou odlišnost konvenční sekvence promotorů řízených těmito faktory σ , jevíly se tyto faktory jako nejvhodnější pro vytvoření hybridního faktoru σ , který by specificky rozpoznával pouze příslušný hybridní promotor.

Kombinací domén σ_2 a σ_4 faktoru σ^D a σ^H se podařilo zkonstruovat geny pro hybridní faktory σ^{DH} a σ^{HD} , které byly vloženy do expresního vektoru pEC-XT99A, a k nim i syntetické hybridní promotory skládající se z -35 a -10 oblastí přirozeného σ^D - a σ^H -dependentního (*PrsdA* respektive *PuvrD3*) promotoru, které byly klonovány v *promoter-test* vektoru pEPR1. Hypotéza, že hybridní faktor σ^{HD} nebo σ^{DH}

rozpozná pouze příslušný hybridní promotor *PsigHD* nebo *PsigDH*, se však měřením specifické aktivity promotorů v systému nadprodukcující faktory σ^{DH} či σ^{HD} nepotvrdila (Obr. 11 a 12). Oba hybridní faktory σ rozpoznávaly hybridní promotory téměř se stejnou intenzitou, tj. nezávisle na typu hybridního promotoru. Protože během těchto měření nebyl patrný vliv induktoru na intenzitu exprese genu *gfpuv* a specifická intenzita fluorescence byla nízká, lze předpokládat, že funkčnost připravených hybridních faktorů σ^{DH} a σ^{HD} byla velmi omezená. Výsledky našeho měření aktivity promotorů se tedy rozcházejí se závěry obou stěžejních publikací týkajících se konstrukce syntetických hybridních faktorů σ , které rozpoznávaly pouze příslušné hybridní promotory (Kumar *et al.*, 1995; Rhodius *et al.*, 2013). Je však třeba zdůraznit, že obě zmíněné publikace se týkaly tvorby hybridních faktorů σ u gramnegativních bakterií, takže je možné, že u grampozitivního kmene *C. glutamicum* mohla výměna domén σ_2 a σ_4 mnohem více narušit proces sbalování proteinu a tím znemožnit správnou interakci zkonstruovaných hybridních faktorů σ s jádrem RNA polymerázy *C. glutamicum* či templátovou DNA, popř. oběma zároveň. Navíc výsledky novější práce (Rhodius *et al.*, 2013) zahrnují obrovský počet kombinací, u nichž se vždy automaticky očekávalo, že budou funkční, a analýzy aktivit promotorů byly velmi povrchní.

Mnohem zajímavější výsledek však poskytoval dvouplazmidový kmen *C. glutamicum* nadprodukcující nativní faktor σ^D a nesoucí syntetický hybridní promotor *PsigHD*, kde došlo k mírnému rozpoznání tohoto promotoru faktorem σ^D (Obr. 13). Přihlédneme-li ke složení tohoto promotoru (-35 oblast ze σ^H -dependentního promotoru a -10 oblast ze σ^D -dependentního promotoru), znamená to, že pro rozpoznání promotoru faktorem σ^D , i když s mnohem nižší intenzitou, postačovala -10 konvenční oblast promotoru. Tento jev byl již pozorován u *E. coli*, u níž bylo prokázáno, že v případě dostatečně silného promotoru může dojít k transkripci z takového promotoru i v nepřítomnosti -35 promotorové oblasti. Tento jev byl popsán u promotorů obsahujících -10 prodloužený motiv, se kterým interaguje doména σ_3 a ta u faktoru σ^D *C. glutamicum* není přítomná (Mitchell *et al.*, 2003), ale není vyloučeno, že nejde o jev obecnější.

Primární roli -10 promotorové oblasti pro rozpoznávání promotoru potvrdil i druhý kontrolní dvouplazmidový systém nadprodukcující nativní faktor σ^H , neboť u něj byla prokázána exprese z hybridního promotoru *PsigDH* (Obr. 14), jehož -10 promotorová oblast nesla konvenční sekvenci σ^H -dependentních promotorů.

Zároveň bylo zjištěno, že v tomto systému docházelo, i když v mnohem menší míře i k expresi z „opačného“ hybridního promotoru *PsigHD* (Obr. 14), jehož -10 oblast odpovídala konvenční sekvenci σ^D -dependentních promotorů, což by teoreticky mohlo vyvracet výše uváděnou prioritní roli -10 promotorové oblasti, avšak toto pozorování je v souladu s nejnovějšími poznatky, že promotory rozpoznávané faktorem σ^D nemusí být striktně σ^D -dependentní, ale mohou být rozpoznány právě i faktorem σ^H (Dostálová *et al.*, 2019). Jelikož během této studie byly objeveny i přirozené hybridní promotory σ^{DH} (*P_{lpd}*) a σ^{HD} (*Pcg0607*), je zřejmé, že analyzované syntetické hybridní promotory nejsou jen jakési teoretické konstrukty, ale promotory skutečné, neboť se sporadicky vyskytují i v přirozených organismech (Dostálová *et al.*, 2019).

Nakonec byly analyzovány dvouplazmidové systémy nadprodukcující cíleně modifikované formy faktoru σ^H teoreticky umožňující interakci s -35 oblastí σ^D -dependentních promotorů (Obr. 15), a tedy schopné rozpoznávat hybridní promotor *PsigDH*. Z analýzy vyplynulo, že nejlepší variantou ohledně specifického rozpoznání hybridního promotoru *PsigDH* byl faktor $\sigma^{\text{mutH}_{6A}}$ (Obr. 16 - 18), který se od přirozeného faktoru σ^H liší záměnou v 6 aminokyselinových zbytcích ($P_{165} \rightarrow T_{165}$, $L_{166} \rightarrow P_{166}$, $T_{168} \rightarrow A_{168}$, $M_{170} \rightarrow R_{170}$, $S_{171} \rightarrow V_{171}$ a $R_{172} \rightarrow A_{172}$).

U zbylých dvou mutantních faktorů $\sigma^{\text{mutH}_{6A+K}}$ a $\sigma^{\text{mutH}_{4A+K}}$ totiž docházelo nejen k obdobně silnému rozpoznávání hybridního faktoru *PsigDH*, ale i k mnohem vyšší expresi z přírodního σ^H -dependentního promotoru *PuvrD3*, takže tyto modifikace vykazovaly mnohem nižší promotorovou specifitu.

Výsledky měření aktivity promotorů ve dvouplazmidových systémech nesoucích modifikované formy faktoru σ^H prokázaly, že homologní modelování je mnohem lepší cestou k získání funkčních faktorů σ se změnou promotorovou specifitou než jednoduché kombinování jednotlivých funkčních domén σ_2 a σ_4 . Otázkou zůstává, kterým směrem se má dále homologní modelování pozměněných faktorů σ ubírat. Bude lepší zůstat jen u záměnových variant mezi jednotlivými faktory σ v rámci téhož mikroorganismu či přejít na mezirodové a vzdálenější hybridy, u nichž je větší šance, že umožní striktní expresi z odpovídajících hybridních promotorů díky rozdílnosti konvenčních sekvencí promotorů u fylogeneticky vzdálenějších mikroorganismů? Podle předběžných výsledků je však již teď jasné, že kombinace homologního modelování vazby faktorů σ na promotory

a biologického ověřování předpokladů zjištěných *in silico* skýtá velmi nadějně
vyhlídky.

7 Souhrn

- Klonováním hybridních promotorů *PsigDH* a *PsigHD* v *promoter-test* vektoru pEPR1 byly zkonstruovány rekombinantní plazmidy pEPR1*PsigDH* a pEPR1*PsigHD*.
- Klonováním hybridních genů *sigDH* a *sigHD* byly zkonstruovány rekombinantní plazmidy pEC-XT99*AsigDH* a pEC-XT99*AsigHD*.
- Byla vytvořena sada dvouplazmidových kmenů *Corynebacterium glutamicum* (pEC-XT99*Asig*„X“ + pEPR1*Psig*„Y“).
- Metodou měření aktivity promotoru prostřednictvím reportérové fluorescence bylo zjištěno, že hybridní faktory σ^{DH} či σ^{HD} nejsou schopny rozpoznávat hybridní promotory *PsigHD* a *PsigDH*. Výchozí hypotéza se tedy nepotvrdila.
- Alternativní cestou přípravy systému „faktor σ -promotor“ se specifickým rozpoznáváním vybraných promotorů byla kombinace mutantních faktorů σ^{H} a hybridního promotoru *PsigDH*. Z mutací navržených na základě homologního modelování vazby promotor-sigma se jako nejnadějnější ukázal faktor $\sigma^{\text{mutH}_6\text{A}}$, který prokázal téměř specifickou funkčnost v transkripci z hybridního promotoru *PsigDH*.
- Cenným výsledkem je poznatek, že homologní modelování záměn aminokyselinových zbytků faktorů σ interagujících s nukleotidy klíčových sekvencí promotorů otevírá cestu pro skutečné využití těchto *in silico* modelů pro studium transkripce a případné využití výsledků v biotechnologii.

8 Seznam použité literatury

- Achberger, E.C., Whiteley, H.R., 1981. The role of the δ peptide of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase in promoter selection. *J. Biol. Chem.* 256, 7424–7432.
- Adham, S.A., Honrubia, P., Díaz, M., Fernández-Abalos, J.M., Santamaría, R.I., Gil, J.A., 2001. Expression of the genes coding for the xylanase Xys1 and the cellulase Cel1 from the straw-decomposing *Streptomyces halstedii* JM8 cloned into the amino-acid producer *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. *Arch. Microbiol.* 177, 91–97.
- Albersmeier, A., Pfeifer-Sancar, K., Rückert, C., Kalinowski, J., 2017. Genome-wide determination of transcription start sites reveals new insights into promoter structures in the actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 257, 99–109.
- Austin, S., Dixon, R., 1992. The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. *EMBO J.* 11, 2219–2228.
- Barne, K.A., Bown, J.A., Busby, S.J., 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, 4034–4040.
- Barrios, H., Valderrama, B., Morett, E., 1999. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 4305–4313.
- Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., Wittmann, C., 2011. From zero to hero – design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab. Eng.* 13, 159–168.
- Billman-Jacobe, H., Hodgson, A.L., Lightowlers, M., Wood, P.R., Radford, A.J., 1994. Expression of ovine gamma interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1641–1645.
- Billman-Jacobe, H., Wang, L., Kortt, A., Stewart, D., Radford, A., 1995. Expression and secretion of heterologous proteases by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1610–1613.
- Bordes, P., Wigneshweraraj, S.R., Schumacher, J., Zhang, X., Chaney, M., Buck, M., 2003. The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: Identifying a surface that binds σ^{54} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2278–2283.
- 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.

- Brinkrolf, K., Brune, I., Tauch, A., 2006. Transcriptional regulation of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Genet. Mol. Res.* 5, 773–789.
- Buchholz, J., Schwentner, A., Brunnenkan, B., Gabris, C., Grimm, S., Gerstmeir, R., Takors, R., Eikmanns, B.J., Blombach, B., 2013. Platform engineering of *Corynebacterium glutamicum* with reduced pyruvate dehydrogenase complex activity for improved production of L-lysine, L-valine, and 2-ketoisovalerate. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5566–5575.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M., Dixon, R., 1986. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* 320, 374–378.
- Buhot, L., Horv ath, E., Medgyesy, P., Lerbs-Mache, S., 2006. Hybrid transcription system for controlled plastid transgene expression. *Plant J.* 46, 700–707.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., Bautz, E.K., 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221, 43–46.
- Busche, T.,  ilar, R., Pi manova, M., Pátek, M., Kalinowski, J., 2012. Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* 13, 445.
- Bush, M., Dixon, R., 2012. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54} -dependent transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 497–529.
- Cadenas, R.F., Gil, J.A., Martín, J.F., 1992. Expression of *Streptomyces* genes encoding extracellular enzymes in *Brevibacterium lactofermentum*: secretion proceeds by removal of the same leader peptide as in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 362–369.
- Danson, A.E., Jovanovic, M., Buck, M., Zhang, X., 2019. Mechanisms of σ^{54} -dependent transcription initiation and regulation. *J. Mol. Biol.*
- Date, M., Itaya, H., Matsui, H., Kikuchi, Y., 2006. Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 66–70.
- Davis, M.C., Kesthely, C.A., Franklin, E.A., MacLellan, S.R., 2017. The essential activities of the bacterial sigma factor. *Can. J. Microbiol.* 63, 89–99.
- Doherty, G.P., Fogg, M.J., Wilkinson, A.J., Lewis, P.J., 2010. Small subunits of RNA polymerase: localization, levels and implications for core enzyme composition. *Microbiology UK* 156, 3532–3543.
- Dostálová, H., Busche, T., Holátko, J., Rucká, L.,  tepanek, V., Barvık, I., Ne vera, J., Kalinowski, J., Pátek, M., 2019. Overlap of promoter recognition specificity of stress response sigma factors SigD and SigH in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Front. Microbiol.* 9, 3287.

- Dostálová, H., Holátko, J., Busche, T., Rucká, L., Rapoport, A., Halada, P., Nešvera, J., Kalinowski, J., Pátek, M., 2017. Assignment of sigma factors of RNA polymerase to promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express* 7, 133.
- Ebright, R.H., 2000. RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304, 687–698.
- 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.
- Engels, S., Schweitzer, J.-E., Ludwig, C., Bott, M., Schaffer, S., 2004. *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor σ^H . *Mol. Microbiol.* 52, 285–302.
- Estrem, S.T., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R.L., 1998. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9761–9766.
- Feklistov, A., Darst, S.A., 2011. Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase σ subunit. *Cell* 147, 1257–1269.
- Feklistov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., Gross, C.A., 2014. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 357–376.
- Ghosh, P., Ramakrishnan, C., Chatterji, D., 2003. Inter-subunit recognition and manifestation of segmental mobility in *Escherichia coli* RNA polymerase: a case study with ω - β' interaction. *Biophys. Chem.* 103, 223–237.
- Gribskov, M., Burgess, R.R., 1986. Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 14, 6745–6763.
- Grossman, A.D., Straus, D.B., Walter, W.A., Gross, C.A., 1987. σ^{32} synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 1, 179–184.
- Halgasova, 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., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.

- Hasegawa, S., Suda, M., Uematsu, K., Natsuma, Y., Hiraga, K., Jojima, T., Inui, M., Yukawa, H., 2013. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1250–1257.
- Haugen, S.P., Berkmen, M.B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., Gourse, R.L., 2006. rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* 125, 1069–1082.
- Hawley, D.K., McClure, W.R., 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 11, 2237–2255.
- Helmann, J.D., 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* 46, 47–110.
- Helmann, J.D., Chamberlin, M.J., 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 839–872.
- Hilton, M.D., Whiteley, H.R., 1985. UV cross-linking of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase to DNA in promoter and non-promoter complexes. *J. Biol. Chem.* 260, 8121–8127.
- 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.
- Hughes, K.T., Mathee, K., 1998. The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 231–286.
- 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., Baba, M., Tsukamoto, N., Komatsu, T., Mitsunashi, 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.
- Jo, J.-H., Seol, H.-Y., Lee, Y.-B., Kim, M.-H., Hyun, H.-H., Lee, H.-H., 2012. Disruption of genes for the enhanced biosynthesis of α -ketoglutarate in *Corynebacterium glutamicum*. *Can. J. Microbiol.* 58, 278–286.
- Jojima, T., Fujii, M., Mori, E., Inui, M., Yukawa, H., 2010. Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 159–165.
- Jojima, T., Noburyu, R., Sasaki, M., Tajima, T., Suda, M., Yukawa, H., Inui, M., 2015. Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1165–1172.

- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., Tauch, A., 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104, 5–25.
- Keller, A.N., Yang, X., Wiedermannová, J., Delumeau, O., Krásný, L., Lewis, P.J., 2014. ϵ , a new subunit of RNA polymerase found in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 196, 3622–3632.
- 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, T.-H., Kim, H.-J., Park, J.-S., Kim, Y., Kim, P., Lee, H.-S., 2005a. Functional analysis of *sigH* expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1542–1547.
- Kim, T.-H., Park, J.-S., Kim, H.-J., Kim, Y., Kim, P., Lee, H.-S., 2005b. The *whcE* gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 757–764.
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M., 2004. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50, 331–343.
- Kirchner, O., Tauch, A., 2003. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 287–299.
- 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.
- Kumar, A., Grimes, B., Logan, M., Wedgwood, S., Williamson, H., Hayward, R.S., 1995. A hybrid sigma subunit directs RNA polymerase to a hybrid promoter in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 246, 563–571
- 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 Genomics* 8, 4.
- Lee, J.-Y., Na, Y.-A., Kim, E., Lee, H.-S., Kim, P., 2016. The *Actinobacterium Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 807–822.

- Lin, W., Mandal, S., Degen, D., Cho, M.S., Feng, Y., Das, K., Ebricht, R.H., 2019. Structural basis of ECF- σ -factor-dependent transcription initiation. *Nat. Commun.* 10, 710.
- Lonetto, M.A., Rhodius, V., Lamberg, K., Kiley, P., Busby, S., Gross, C., 1998. Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit. *J. Mol. Biol.* 284, 1353–1365.
- Mathew, R., Chatterji, D., 2006. The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol.* 14, 450–455.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebricht, R.H., Severinov, K., 2001. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 892–897.
- Mitchell, J.E., Zheng, D., Busby, S.J.W., Minchin, S.D., 2003. Identification and analysis of “extended -10” promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 31, 4689–4695.
- Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Jelodar, N.B., Jouzani, G.S., 2015. Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 24, 433–440.
- Morosov, X., Davoudi, C.-F., Baumgart, M., Brocker, M., Bott, M., 2018. The copper-deprivation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* comprises proteins for biogenesis of the actinobacterial cytochrome *bc1-aa3* supercomplex. *J. Biol. Chem.* 293, 15628–15640.
- Murakami, K.S., Darst, S.A., 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 31–39.
- Nakamura, Y., Nishio, Y., Ikeo, K., Gojobori, T., 2003. The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene* 317, 149–155.
- 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 stress-related genes. *J. Bacteriol.* 189, 4696–4707.
- Oguiza, J.A., Marcos, A.T., Martín, J.F., 1997. Transcriptional analysis of the *sigA* and *sigB* genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 111–117.
- Okino, S., Inui, M., Yukawa, H., 2005. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 475–480.
- Paget, M.S., 2015. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: Structure, function and distribution. *Biomolecules* 5, 1245–1265.

- Paget, M.S., Helmann, J.D., 2003. The σ^{70} family of sigma factors. *Genome Biol.* 4, 203.
- 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. *Microbiology UK* 154, 915–923.
- Park, S.H., Kim, H.U., Kim, T.Y., Park, J.S., Kim, S.-S., Lee, S.Y., 2014. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nat. Commun.* 5, 4618.
- Pátek, M., Nešvera, J., 2011. Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 154, 101–113.
- Pero, J., Nelson, J., Fox, T.D., 1975. Highly asymmetric transcription by RNA polymerase containing phage-SP01-induced polypeptides and a new host protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1589–1593.
- Pfeifer-Sancar, K., Mentz, A., Rückert, C., Kalinowski, J., 2013. Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *BMC Genomics* 14, 888.
- Rhodijs, V.A., Segall-Shapiro, T.H., Sharon, B.D., Ghodasara, A., Orlova, E., Tabakh, H., Burkhardt, D.H., Clancy, K., Peterson, T.C., Gross, C.A., Voigt, C.A., 2013. Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters. *Mol. Syst. Biol.* 9, 702.
- Ross, W., Ernst, A., Gourse, R.L., 2001. Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: α subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev.* 15, 491–506.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R.L., 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407–1413.
- Ruff, E.F., Record, M.T., Artsimovitch, I., 2015. Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules* 5, 1035–1062.
- Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A.K., Singh, Y., 2010. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.* 277, 605–626.
- Schulz, A., Langowski, J., Rippe, K., 2000. The effect of the DNA conformation on the rate of NtrC activated transcription of *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{54} holoenzyme. *J. Mol. Biol.* 300, 709–725.
- 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.

- Shen, X.-H., Huang, Y., Liu, S.-J., 2005. Genomic analysis and identification of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbes Environ.* 20, 160–167.
- Siebert, D., Wendisch, V.F., 2015. Metabolic pathway engineering for production of 1,2-propanediol and 1-propanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Biofuels* 8, 91
- Silberbach, M., Hüser, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Walter, B., Krämer, R., Burkovski, A., 2005. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 119, 357–367.
- Smith, M.D., Flickinger, J.L., Lineberger, D.W., Schmidt, B., 1986. Protoplast transformation in coryneform bacteria and introduction of an alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* into *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 634–639.
- 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) σ factor protein family. *Mol. Microbiol.* 74, 557–581.
- 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., Busche, T., Patschkowski, T., Niehaus, K., Pátek, M., Kalinowski, J., Wendisch, V.F., 2017b. Physiological roles of sigma factor SigD in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol.* 17, 158
- 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.
- Thakur, P.B., Vaughn-Diaz, V.L., Greenwald, J.W., Gross, D.C., 2013. Characterization of five ECF sigma factors in the genome of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *PLoS ONE* 8, e58846.
- 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.
- Toyoda, K., Inui, M., 2016. 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., 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.

- Vertès, A.A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y., Yukawa, H., 1993. Presence of *mrr*- and *mcr*-like restriction systems in coryneform bacteria. *Res. Microbiol.* 144, 181–185.
- Wang, B., Hu, Q., Zhang, Yu, Shi, R., Chai, X., Liu, Z., Shang, X., Zhang, Yun, Wen, T., 2018. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Fact.* 17, 63.
- Weiss, A., Shaw, L.N., 2015. Small things considered: the small accessory subunits of RNA polymerase in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 541–554.
- 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, C.C., Nash, H.A., 1989. The interaction of *E. coli* IHF protein with its specific binding sites. *Cell* 57, 869–880.
- 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.
- Zahoor, A., Otten, A., Wendisch, V.F., 2014. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for glycolate production. *J. Biotechnol.* 192 Pt B, 366–375.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S.A., 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98, 811–824.