

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



David Nový

Funkce faktorů sigma u kmenů rodu *Rhodococcus*
Function of sigma factors in strains of genus *Rhodococcus*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Václav Štěpánek, CSc.

Praha, 2021

Poděkování:

Mé upřímné poděkování patří Dr. Štěpánkovi, který mi byl po celou dobu práce ochotným rádcem a korektorem. Jeho věcná a konstruktivní kritika týkající se formy textu i dané problematiky mi pomáhala při tvorbě finální verze práce. Děkuji též Dr. Pátkovi za jeho návrhy na finální úpravy textu.

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, 11.08.2021

Podpis:

Abstrakt:

Zástupci rodu *Rhodococcus* mají díky svému velkému genomu značný biotechnologický potenciál, avšak o regulaci genové exprese během iniciace transkripce, jejíž poznání by umožnilo optimalizovat biotechnologické procesy, se u těchto bakterií dosud ví příliš málo. Transkripční regulace se u rhodokoků totiž účastní velké množství faktorů sigma, jejichž mnohdy velký počet u konkrétních druhů v podstatě koreluje s velikostí genomu. Lze je zhruba rozdělit na dvě skupiny: hlavní, konzervované faktory, které se v obměnách objevují u mnoha bakterií, a vedlejší, specifické faktory, které se vlivem podmínek prostředí a způsobu života vyvinuly u jednotlivých kmenů. Všechny faktory sigma přítomné u rhodokoků patří do rodiny σ^{70} a lze je také rozdělit do čtyř skupin podle přítomnosti konzervovaných strukturních domén (skupina 1 až 4). Zvláštním typem faktorů sigma s extracytoplazmatickou funkcí (ECF, skupina 4) u rhodokoků jsou faktory nesoucí na svém C-konci další specifické domény, a to NTF-2-like nebo TPR, jejichž funkce dosud nejsou plně vysvětleny. Informace o fyziologických funkcích jednotlivých faktorů sigma u rhodokoků jsou zatím minimální, ale lze je doplnit analýzou analogických faktorů sigma a jejich funkcí u blízce příbuzných bakterií *Mycobacterium tuberculosis* nebo *Corynebacterium glutamicum*.

Klíčová slova:

RNA-polymeráza, faktory sigma, promotorová oblast, řízení genové exprese, konvenční sekvence, *Rhodococcus*

Abstract:

Thanks to their large genome sizes, rhodococci share considerable biotechnological potential, however, there is still little known about the regulation of gene expression during the initiation of transcription process. The knowledge of this process might help to optimize biotechnological application. A large number of sigma factors are involved in the transcriptional regulation of rhodococci and this number often positively correlates with their genome sizes. Sigma factors can be potentially divided into two groups: the first, conserved factors that may in some variants occur in many different species among bacteria, and the second, specific sigma factors, that have been evolutionarily selected in individual strains due to environmental and lifestyle conditions. All sigma factors present in rhodococci belong to the σ^{70} family and can also be divided into four groups according to the presence of conserved structural domains (groups 1 to 4). A special type of sigma factors with extracytoplasmic function (ECF, group 4) are factors carrying specific domains at their C-terminus, namely NTF-

2-like or TPR, whose functions are still not fully understood. Very little information about the physiological functions of individual sigma factors in rhodococci has been published but it can be supplemented by analysis of analogous sigma factors and their functions in closely related bacteria *Mycobacterium tuberculosis* or *Corynebacterium glutamicum*.

Keywords:

RNA polymerase, sigma factors, promoter region, gene expression control, consensus sequence, *Rhodococcus*

Seznam použitých zkratk

A – adenin

Acc. No. – přístupové číslo

C – cytosin

Δ – delece genu

DISC – diskriminátor

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECF – extracytoplasmatická funkce

EXT – extra motiv

G – guanin

Mpb – milion párů bází

N – libovolná báze

NS – nspecifikovaný kmen

NTF – jaderný transportní faktor

R. – *Rhodococcus*

RNA – ribonukleová kyselina

RNAP – DNA-dependentní RNA polymeráza

rRNA – ribosomální ribonukleová kyselina

S – Svedberg

sp. – druh

T – thymin

TPR – tetratrikopeptidová repetice

UP element – element promotoru protisměrný

| | |
|-------|---|
| OBSAH | |
| 1 | ÚVOD..... 1 |
| 2 | <i>RHODOCOCCUS</i> JAKO MODELOVÝ TAXON..... 2 |
| 2.1 | Obecné vlastnosti a taxonomické zařazení rodu <i>Rhodococcus</i> 2 |
| 2.2 | Význam kmenů rodu <i>Rhodococcus</i> a jejich využití v průmyslových aplikacích 3 |
| 2.2.1 | Bioremediace 4 |
| 2.2.2 | Biosyntéza organických látek 4 |
| 2.2.3 | <i>Rhodococcus</i> jako bioindikátor 5 |
| 2.3 | Srovnání genomů jednotlivých druhů rodu <i>Rhodococcus</i> 5 |
| 2.4 | Aplikace metod molekulární biologie a rekombinantní DNA u rodu <i>Rhodococcus</i> . 6 |
| 2.4.1 | Konstrukce standardních rekombinantních systémů 6 |
| 2.4.2 | Metody editace genomů..... 6 |
| 2.4.3 | Transgenní organismy 6 |
| 3 | TRANSKRIPCE..... 8 |
| 3.1 | Bakteriální RNA polymeráza 8 |
| 3.1.1 | Podjednotky bakteriální RNA polymerázy a jejich funkce 8 |
| 3.1.2 | Podjednotky DNA-dependentní RNA polymerázy a jejich interakce s promotory 11 |
| 3.2 | Faktory sigma u rodu <i>Rhodococcus</i> 12 |
| 3.2.1 | Modelové organismy pro hledání strukturních či funkčních homologí..... 13 |
| 3.2.2 | Primární faktory σ^A u rodu <i>Rhodococcus</i> 14 |
| 3.2.3 | Faktory obecné stresové odpovědi σ^B u rodu <i>Rhodococcus</i> 15 |
| 3.2.4 | Faktory σ^F u rodu <i>Rhodococcus</i> 16 |
| 3.2.5 | Faktory sigma s extracytoplasmatickou funkcí u rodu <i>Rhodococcus</i> 18 |
| 3.2.6 | Ostatní proteiny anotované jako faktory sigma 21 |
| 4 | ZÁVĚR 22 |
| | PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY 23 |

1 ÚVOD

Regulace transkripce již na úrovni její iniciace je pro organismy energeticky nejvýhodnější, neboť při ní dochází k úspoře nukleosidtrifosfátů, které by jinak byly při probíhající transkripci spotřebovány a znovu by musely být anabolickými drahami v buňce doplňovány. Není proto náhodou, že bakterie, které jsou často nuceny přežívat v rychle se měnících podmínkách prostředí, si během evoluce vyvinuly mechanismus, kdy pomocí záměny faktoru sigma za jiný v rámci holoenzymu DNA-dependentní RNA polymerázy (RNAP) mohou relativně rychle a maximálně efektivně modulovat genovou expresi již na úrovni iniciace transkripce. V závislosti na konkrétním faktoru sigma navázaném k RNAP jsou totiž transkribovány jen ty geny, které jsou momentálně potřeba, takže nedochází k syntéze transkriptů, které by v daných podmínkách neměly žádné opodstatnění.

Jelikož mají zástupci rodu *Rhodococcus* velký biotechnologický potenciál, pochopení regulace iniciace transkripce z hlediska aktivity konkrétních faktorů sigma a vytvoření komplexní transkripční regulační sítě je jednou z cest, jak tento potenciál efektivně využít a docílit optimalizace biotechnologických procesů. Prostředkem k tomu může být konstrukce syntetických promotorů popř. hybridních faktorů sigma, či zcela nové expresní systémy komplexně reagujících na potřeby moderního bioprůmyslu.

Hlavním cílem práce je shrnout dosavadní poznatky o faktorech sigma, které se vyskytují u zástupců rodu *Rhodococcus*, a to s důrazem na jejich počet, multidoménovou strukturu a funkci. V případech chybějících literárních údajů bylo záměrem využít analogie s faktory sigma příbuzných modelových organismů skupiny Mycolata.

2 RHODOCOCCUS JAKO MODELOVÝ TAXON

2.1 Obecné vlastnosti a taxonomické zařazení rodu *Rhodococcus*

Taxon *Rhodococcus* je rod grampozitivních, acidorezistentních, obligátně aerobních, kataláza pozitivních, nesporulujících bakterií patřících do kmene Actinobacteria. Zástupci rodu *Rhodococcus* mají kokovitý či filamentární tvar buněk, které mohou přecházet do myceliálního růstu a tvorby biofilmu, přičemž následná fragmentace mycelia umožňuje opět vznik jednotlivých kokovitých či filamentárních buněk. Buňky nemají bičíky a jsou tedy nepohyblivé. Z důvodu tohoto způsobu růstu a rozmnožování jsou zástupci rodu *Rhodococcus* řazeni mezi takzvané nokardioformní bakterie, které jsou právě touto vlastností charakteristické (Goodfellow a Alderson, 1977; Lechevalier, 1989; Sivan, *et al.*, 2006; Yanagawa a Honda, 1976, citováno dle Majidzadeh a Fatahi-Bafghi, 2018).

Dalším typickým rysem těchto nokardioformních bakterií je přítomnost mykolových kyselin, což jsou dlouhé větvené mastné hydroxykyseliny obsahující až 90 atomů uhlíku, které jsou v buněčných stěnách ukotveny vazbou k peptidoglykanu přes arabinogalaktany (Barry *et al.*, 1998; Sutcliffe, 1998). Právě délka základního řetězce mykolových kyselin měla v historii značný význam pro chemotaxonomické rozlišení zástupců rodu *Rhodococcus* od ostatních příbuzných nokardioformních bakterií rodů *Tsukamurella*, *Gordonia* a *Nocardia*, u nichž jsou tyto řetězce kratší než 34 atomů uhlíku, zatímco rod *Rhodococcus* je rozpoznáván na základě přítomnosti řetězců s 34 až 64 uhlíkovými atomy (Rainey *et al.*, 1995). Taxonomické rozdělení nokardioformních bakterií do jednotlivých rodů procházelo v minulosti velkými změnami a bylo běžné, že druhy považované za příslušníky jednoho rodu byly s příchodem pokročilejších analytických metod přejmenovány a přeřazeny do úplně jiného rodu, a to převážně právě kvůli délce mykolových kyselin. V historii se tak vícekrát stalo, že druhy řazené do rodu *Rhodococcus* byly přejmenovány a přesunuty do jiných příbuzných taxonů (například *Rhodococcus aechiensis* byl přejmenován na *Gordonia aechiensis*; Klatte *et al.*, 1994) a naopak druhy z jiných taxonů byly zařazeny do rodu *Rhodococcus* (například druh *Nocardia calcarea* je dnes znám jako *Rhodococcus erythropolis* díky analýze sekvence 16S rRNA; Yoon *et al.*, 1997).

Rod *Rhodococcus* zahrnuje i patogenní druhy, a to *Rhodococcus hoagii* (Kämpfer *et al.*, 2014; původně a nyní nejspíše opět *R. equi*; Vázquez-Boland *et al.*, 2020), který způsobuje infekce respiračního traktu zejména u koní (Magnusson, 1923, citováno dle Prescott, 1991). Známý je také fytopatogen *Rhodococcus fascians*, který způsobuje růstové deformace listů tabáku (Goethals *et al.*, 2001).

2.2 Význam kmenů rodu *Rhodococcus* a jejich využití v průmyslových aplikacích

Aplikační potenciál zástupců rodu *Rhodococcus* je nastíněn v Tabulce 1, z níž vyplývá, že možnosti jeho využití v průmyslových biotechnologiích jsou široké.

Tabulka 1: Biotechnologický potenciál zástupců rodu *Rhodococcus*

| Aplikace | Kmen | Zdroj |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Degradace uhlovodíků | <i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14 | de Carvalho <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>Rhodococcus</i> sp. BAP-1 | Li <i>et al.</i> , 2014 |
| | <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> 5Ap | Bukliarevich <i>et al.</i> , 2019 |
| | <i>Rhodococcus erythropolis</i> 1.7 | Sazykin <i>et al.</i> , 2019 |
| Degradace aromatických uhlovodíků | <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM1069 | Malarczyk a Pázdziach-Czochra, 2000 |
| | <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP | Kolomytseva <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>Rhodococcus aetherivorans</i> I24 | Puglisi <i>et al.</i> , 2010 |
| | <i>Rhodococcus opacus</i> PD630 | Yoneda <i>et al.</i> , 2016 |
| Degradace nitrilů | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1 | Martínková <i>et al.</i> , 2010 |
| | <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 | Martínková <i>et al.</i> , 2010 |
| Degradace ligninu | <i>Rhodococcus opacus</i> PD630 | Henson <i>et al.</i> , 2018 |
| Degradace ropných složek | <i>Rhodococcus</i> sp. (NS) | Mejcha <i>et al.</i> , 2019 |
| | <i>Rhodococcus</i> sp. HX-2 | Hu <i>et al.</i> , 2020 |
| Degradace xenobiotik | <i>Rhodococcus erythropolis</i> MI2 | Khairy <i>et al.</i> , 2016 |
| Odsiřování paliv | <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 | Caro <i>et al.</i> , 2008 |
| Produkce akrylamidu | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22 | Kobayashi <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>Rhodococcus ruber</i> TH3 | Ma a Yu, 2012 |
| | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1 | Nagasawa <i>et al.</i> , 1993 |
| Produkce nikotinamidu | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1 | Nagasawa <i>et al.</i> , 1988 |
| Produkce karotenoidů | <i>Rhodococcus</i> sp. SD-74 | Zheng <i>et al.</i> , 2013 |
| Produkce lipidů | <i>Rhodococcus opacus</i> PD630 | Li <i>et al.</i> , 2019 |
| | <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 | Li <i>et al.</i> , 2019 |
| Produkce povrchově aktivních látek | <i>Rhodococcus erythropolis</i> S67 | Luong <i>et al.</i> , 2018 |

(převzato z Pátek *et al.*, 2021 a upraveno)

NS – nspecifikovaný kmen

2.2.1 Bioremediace

Řada zástupců rodu *Rhodococcus* je schopna účinně degradovat různé sloučeniny uhlíku, a to např. polyethylen (Sivan *et al.*, 2006), fenol (Martínková *et al.*, 2009), velmi toxické polychlorované bifenoly (Masai *et al.*, 1995) či substituované deriváty uhlovodíků využívané jako herbicidy (Cheng *et al.*, 2018).

Izolát *Rhodococcus olei* Ktm-20^T degraduje až 36 % směsi petroleje, nafty a benzínu jako jediných zdrojů uhlíku během 14 dní. Schopnost degradace uhlovodíků obsažených v ropě a ropných produktech dělá z rhodokoků kandidáty pro úspěšnou bioremediaci takto kontaminovaných půd a vod, přičemž možnou limitací pro využití rhodokoků jako prostředku účinné bioremediace je jejich striktně aerobní metabolismus, a tedy potřeba permanentní dostupnosti kyslíku v kontaminované lokalitě (Chaudhary a Kim, 2018).

V laboratorních podmínkách kmen *Rhodococcus* sp. ZWL3NT využíval jako jediný zdroj uhlíku i substituované deriváty aromatických uhlovodíků, a to katechol či nitroderiváty toluenu. Experimenty s tímto izolátem prokázaly i jeho schopnost využívat dusík obsažený v nitrotoluenu pro svůj vlastní metabolismus. Lze proto uvažovat i o bioremediacích v prostředích, která jsou kromě kontaminace xenobiotiky chudá na dusík, což by mohlo být limitující pro rychlost a účinnost celého bioremediačního procesu (Tian *et al.*, 2013). V poslední době byla rovněž popsána i vysoká míra degradace velmi toxického mutagenního azobarviva methylerveně, a to izolátem *Rhodococcus* sp. UCC 0016 (Maniyam *et al.*, 2020).

V rámci rodu *Rhodococcus* se vyskytují půdní bakterie vysoce odolné proti vysychání prostředí (LeBlanc *et al.*, 2008) a také druhy značně odolné vůči přítomnosti iontů toxických těžkých kovů jako jsou ionty olova Pb^{2+} a zinku Zn^{2+} (*Rhodococcus* sp. RS67; Perelomov *et al.*, 2018), nebo ionty arsenu As^{3+} (*Rhodococcus aetherivorans* BCP1; Firrincieli *et al.*, 2019). Uvažuje se proto i o použití rhodokoků k biosorpci toxických kovů v kontaminovaném prostředí, což vede ke snižování negativních dopadů této toxicity i na ostatní organismy.

2.2.2 Biosyntéza organických látek

Jelikož zástupci rodu *Rhodococcus* disponují i řadou pro bakterie méně obvyklých syntetických drah, dospělo se rovněž k pokusům o využití kmenů rodu *Rhodococcus* při výrobě řady látek využitelných v chemickém průmyslu, zemědělství či medicíně biologickou cestou. Příkladem úspěšného použití rhodokoků v biotechnologiích může být například biosyntéza akrylamidu (Jiao *et al.*, 2020), karotenoidů a lipidů (*Rhodococcus opacus* PD630;

Thanapimmetha *et al.*, 2017). Produkce lipidických molekul na médiu s celulosou jako jediným zdrojem uhlíku bylo dosaženo i prvním, přímo pro tyto účely připraveným rekombinantním kmenem *Rhodococcus opacus* PD630. Zdrojovými organismy genů pro celulázy byly bakterie *Cellulomonas fimi* ATCC 484 (*cenABC*, *cex*, *cbhA*) a *Thermobifida fusca* DSM43792 (*cel6A*) (Hetzler *et al.*, 2013). Pro produkci lipidů je popsána rovněž i možnost využití ligninu jako jediného zdroje uhlíku, a to v uspořádání, v němž byly spolu na médiu s ligninem kultivovány kmeny *Rhodococcus opacus* PD630, *Rhodococcus jostii* RHA1 a mutantní kmen *Rhodococcus jostii* RHA1 (*ΔvanA*) (Li *et al.*, 2019).

2.2.3 *Rhodococcus* jako bioindikátor

Zajímavou vlastností rhodokoků je jejich schopnost utilizace plyných uhlovodíků, a to například acetylenu (druhy *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus zopfii*) nebo propanu (*Rhodococcus erythropolis*) jako zdroje uhlíku pro vlastní energetický metabolismus (Rosner *et al.*, 1997; Woods a Murrell, 1989). Zvýšený nárůst v půdě či povrchových vodách obsahujících právě tyto plyny dělá z výše uvedených zástupců rodu *Rhodococcus* vhodné bioindikátory přítomnosti ložisek fosilních paliv, neboť tyto plyné uhlovodíky se vyskytují ve významně vyšších koncentracích právě v blízkosti ložisek ropy a zemního plynu (Bell *et al.*, 1998).

2.3 Srovnání genomů jednotlivých druhů rodu *Rhodococcus*

Základem pro úspěšné použití rhodokoků v biotechnologiích jsou v mnohých případech jejich velké genomy (6 – 10 Mpb) nesoucí mnoho genů pro enzymy alternativních katabolických i anabolických drah. Genomy druhů rodu *Rhodococcus* často sestávají z lineárních chromosomů a plasmidů (např. kmen *Rhodococcus jostii* RHA1 má všechny čtyři známé replikony lineární; McLeod *et al.*, 2006). Nicméně byly popsány případy, kdy některé z replikonů, a to jak chromosomy (*Rhodococcus erythropolis* X5; Deegan *et al.*, 2019), (*Rhodococcus* sp. WAY2; Garrido-Sanz *et al.*, 2020), tak i plasmidy (*Rhodococcus* sp. WAY2; Garrido-Sanz *et al.*, 2020), zaujímají pro bakterie běžnější cirkulární konformaci. Co se týče zastoupení G+C párů, genomová DNA rhodokoků jako u většiny aktinobakterií obsahuje poměrně velké množství G+C, a to až 70,4 % u genomové DNA kmene *Rhodococcus aethrivorans* BCP-1 (Cappelletti *et al.*, 2013).

2.4 Aplikace metod molekulární biologie a rekombinantní DNA u rodu *Rhodococcus*

2.4.1 Konstrukce standardních rekombinantních systémů

Možnosti využití metod molekulární biologie a rekombinantní DNA byly u rhodokoků studovány již od konce 80. let 20. století, kdy byl zkonstruován první kyvadlový (*shuttle*) vektor pMVS301 replikující se jak v *Escherichia coli*, tak v *Rhodococcus* sp. H13A. Jako recipientní buňky schopné vytvářet stabilní transformované klony fungovaly i další druhy rodu *Rhodococcus*, konkrétně *R. erythropolis*, *R. globerulus* a *R. equi* (Singer a Finnerty, 1988). Jedním z příkladů využití rekombinantních technik u rodu *Rhodococcus* je konstrukce kmene *R. erythropolis* CCM 2595 (pSRKB*phe-cat*) nesoucího multikopiový plasmid (na základě vektoru pSRK21) s naklonovanými vlastními geny pro degrační dráhu fenolu. Při kultivaci kmene bylo dosaženo až o 50 % vyšší efektivity degradace fenolu z průmyslové odpadní vody (Veselý *et al.*, 2003; Zídková *et al.*, 2013). V poslední době byl optimalizován i BioBrick™ kompatibilní systém umožňující snadnější a rychlejší přípravu nových rekombinantních kmenů založených na zástupcích rodu *Rhodococcus* jakožto hostitelích (Ellinger a Schmidt-Dannert, 2017).

2.4.2 Metody editace genomů

Recentně vyzkoušenou metodou pro nadprodukcí konkrétního metabolitu u bakterií rodu *Rhodococcus* je i editace genomu technikou CRISPR/Cas9, pomocí níž byl připraven rekombinantní systém *Rhodococcus ruber* THY pro efektivní bioprodukcí akrylamidu, neboť vyřazením strukturního genu *amiE* se zvýšila jak výtěžnost procesu tvorby akrylamidu, tak i jeho čistota. (Liang *et al.*, 2020).

2.4.3 Transgenní organismy

O zástupcích rodu *Rhodococcus* je v poslední době uvažováno i jako o producentech biologicky významných organických látek, které nejsou schopné jen za pomoci své vlastní enzymatické výbavy syntetizovat, nicméně je možné jejich enzymatické výbavy při této syntéze využít.

Například kmen *Rhodococcus ruber* Chol-4 za normálních okolností úspěšně degraduje steroidní látky (Fernández de Las Heras *et al.*, 2009). Mutantní kmen *Rhodococcus ruber* Chol-4 ($\Delta kshB$ - $\Delta kshD1,2,3$) byl při ztrátě své katabolické schopnosti pro metabolizování steroidní látky 4-androstendionu způsobené mutacemi genů příslušných metabolických drah schopen za přispění genu *17 β -HSDcl* pro 17-ketosteroidreduktázu izolovaného z houby *Cochliobolus*

lunatus produkovat a akumulovat testosteron ze steroidního prekurzoru přijímaného z média (Guevara *et al.*, 2019).

Navíc, i samotný rod *Rhodococcus* se může stát zdrojem genu pro jiné transgenní organismy, jimiž jsou rekombinantní kmeny *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 a *Saccharomyces cerevisiae* HDL nesoucí strukturální gen *l-pheDH* blíže nespecifikovaného kmene *Rhodococcus jostii* připravené speciálně pro bioprodukcí S-adenosyl-methioninu z podstatně levnějších prekurzorů D- a L-methioninu (Liu *et al.*, 2019), nebo o transgenní adenoviry nesoucí strukturální gen *vapA* druhu *Rhodococcus hoagii* uvažované jako vektory v rámci vakcíny proti onemocnění dobytka způsobeným tímto patogenním rhodokokem (Giles *et al.*, 2016).

3 TRANSKRIPCE

3.1 Bakteriální RNA polymeráza

3.1.1 Podjednotky bakteriální RNA polymerázy a jejich funkce

DNA-dependentní RNA polymerázy jsou enzymy zodpovědné za přepis genetické informace z DNA do RNA, tj. transkripci (Chamberlin a Berg, 1962). Enzymové jádro bakteriální RNA polymerázy se skládá ze dvou podjednotek α a po jedné z podjednotek β , β' a ω (Burgess, 1969). Za afinitu enzymu k promotoru při iniciaci transkripce odpovídají podjednotky (faktory) σ , které společně s jádrem enzymu tvoří kompletní holoenzym schopný iniciace transkripce (Burgess, 1969; Burgess *et al.*, 1969). U grampozitivních bakterií byly navíc popsány ještě další podjednotky, a to podjednotky δ a ϵ (Keller *et al.*, 2014; Pero *et al.*, 1975).

Dimer podjednotek α má strukturní funkci a je klíčový pro správné sestavení enzymového jádra bakteriální RNA polymerázy, neboť se přímo na něj váží podjednotky β a β' , přičemž za tuto interakci zodpovídá N-terminální doména podjednotky α (Zhang a Darst, 1998). Jelikož do katalytického místa bakteriální RNA polymerázy nezasahují žádné aminokyseliny podjednotek α , podjednotky α se katalýzy syntézy RNA přímo neúčastní (Zhang *et al.*, 1999). Podjednotky α mohou mít funkci při rozpoznávání promotoru, a to v případě přítomnosti tzv. UP elementu. Interakce C-konců α podjednotek s UP elementem zvyšuje transkripci z daného promotoru více než třistanásobně (Estrem *et al.*, 1998, Estrem *et al.*, 1999). Vlastní aktivní centrum syntézy RNA je tvořeno podjednotkami β a β' , jejichž aminokyselinové zbytky interagují s dvojmocnými kationty hořčíku a zinku fungujícími jako kofaktor při syntéze RNA (Zhang *et al.*, 1999).

Podjednotka ω , která v polymeráze interaguje s katalytickou podjednotkou β' , se podílí na správném sestavování aktivního centra a udržování stability RNA polymerázy (Minakhin *et al.*, 2001). Experimenty s delecí genu *rpoZ*, který ω podjednotku kóduje, bylo totiž zjištěno, že její absence snižuje jak schopnost růstu mutantního organismu v důsledku nižší stability komplexu RNA polymerázy, tak i transkripční specifitu RNA polymerázy určenou faktory sigma. Nejedná se však o mutaci, která by růst úplně znemožňovala, takto mutované organismy jen nejsou adaptabilní vůči stresorům (Weiss *et al.*, 2017).

Podjednotka δ v případě své přítomnosti usnadňuje uvolnění komplexu RNA polymerázy po navázání interakce se slabým promotorem nebo v intergenových oblastech, čímž dále zvyšuje specifitu a efektivitu transkripce (López de Saro *et al.*, 1995). δ podjednotka RNA polymerázy navíc interaguje i s buněčnými proteiny Held, čímž zvyšuje rychlost recyklace

komplexu RNA polymerázy po ukončení transkripce a snižuje tak interval nutný pro znovupoužití daného komplexu k transkripci (Wiedermannová *et al.*, 2014).

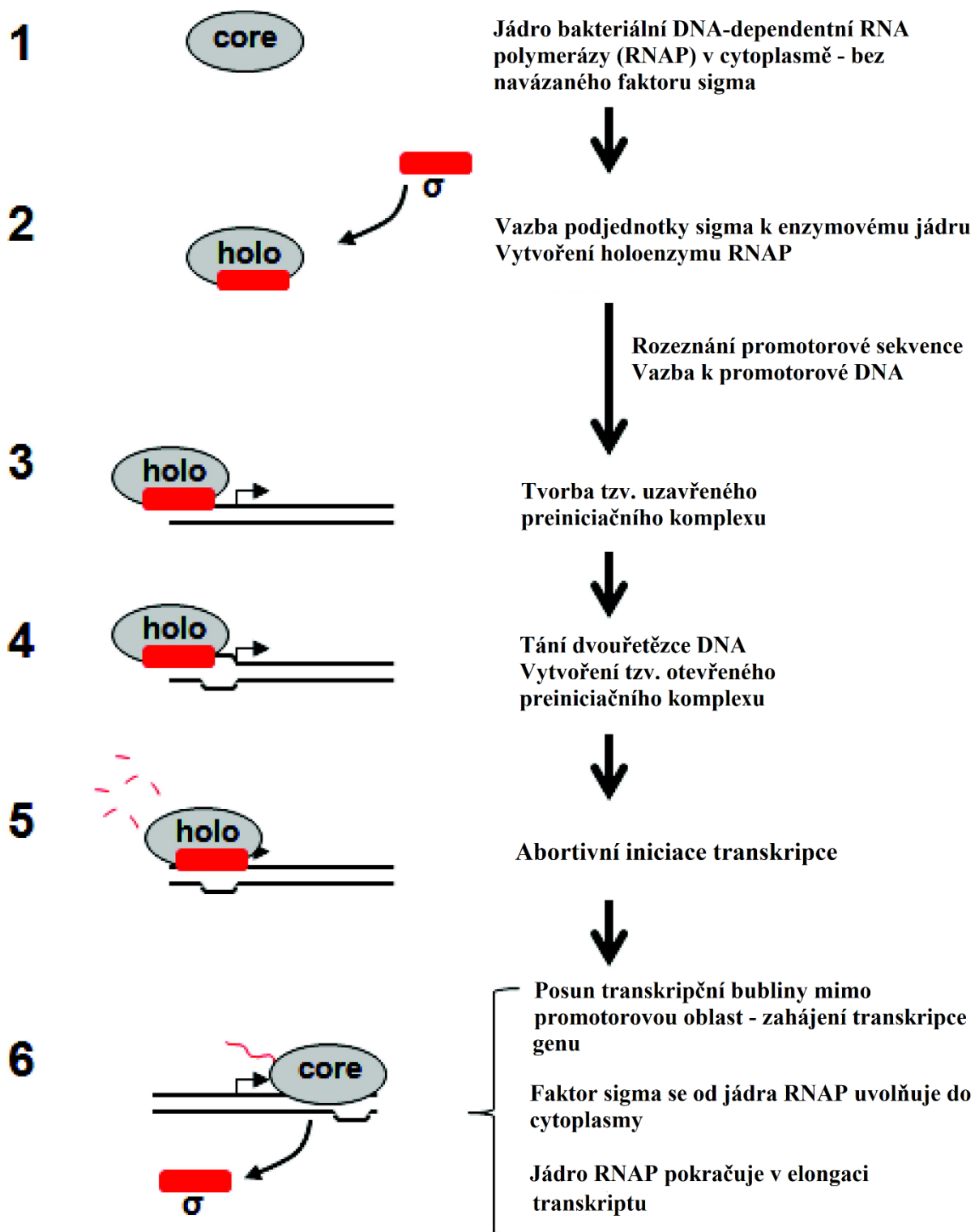
Delece genu *rpoY*, který kóduje podjednotku ϵ bakteriální RNA polymerázy, neovlivňuje přežívání mutantního organismu a není pro katalytickou funkci ani stabilitu RNA polymerázy esenciální. Vzhledem k absenci viditelné fenotypové změny při takovéto deleci není role podjednotky ϵ zatím známa (Keller *et al.*, 2014).

Faktory σ jsou podjednotky DNA-dependentní RNA polymerázy rozšířené u všech druhů bakterií a jsou esenciální podjednotkou pro iniciaci transkripce. Bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy bez jejich přítomnosti dokonce nejsou iniciace transkripce vůbec schopny, a to ani té nespecifické v intergenových oblastech (Burgess *et al.*, 1969; Gribskov a Burgess, 1986).

Při iniciaci transkripce plní faktory sigma dvě důležité funkce (Obr. 1), a to navedení komplexu DNA-dependentní RNA polymerázy na konkrétní promotor pomocí specifické interakce DNA v promotorové oblasti s vlastními specifickými doménami a narušení interakcí mezi komplementárními vlákny DNA umožňující oddělení obou těchto vláken od sebe, tzv. tání dvouřetězce DNA (Davis *et al.*, 2017).

Studiemi DNA-dependentních RNA polymeráz u bakterií bylo zjištěno, že konkrétní faktor sigma reversibilně navázaný na RNAP vede k transkripci odpovídajících σ -dependentních genů a že jeho záměnou za jiný faktor sigma dochází ke změně skupiny přepisovaných genů. Pro soubor konkrétních genů, jejichž transkripci svou specifitou k promotorovým oblastem daný faktor sigma iniciuje, byl zaveden název regulon (Losick a Pero, 1981).

Faktory sigma lze na základě jejich konstituce, tj. přítomnosti jednotlivých konzervovaných domén a mechanismu jejich působení na řízení genové exprese, rozdělit do dvou základních skupin, a to na rodiny σ^{70} a σ^{54} . Jelikož se faktory σ^{54} u aktinobakterií, a tedy ani u rhodokoků, nevyskytují (Gumerov *et al.*, 2020), budeme se již dále zabývat jen faktory sigma z rodiny σ^{70} , které lze ještě rozdělit do čtyř dalších skupin, a to podle přítomnosti různých konzervovaných domén (Obr. 2; Feklístov *et al.*, 2014).



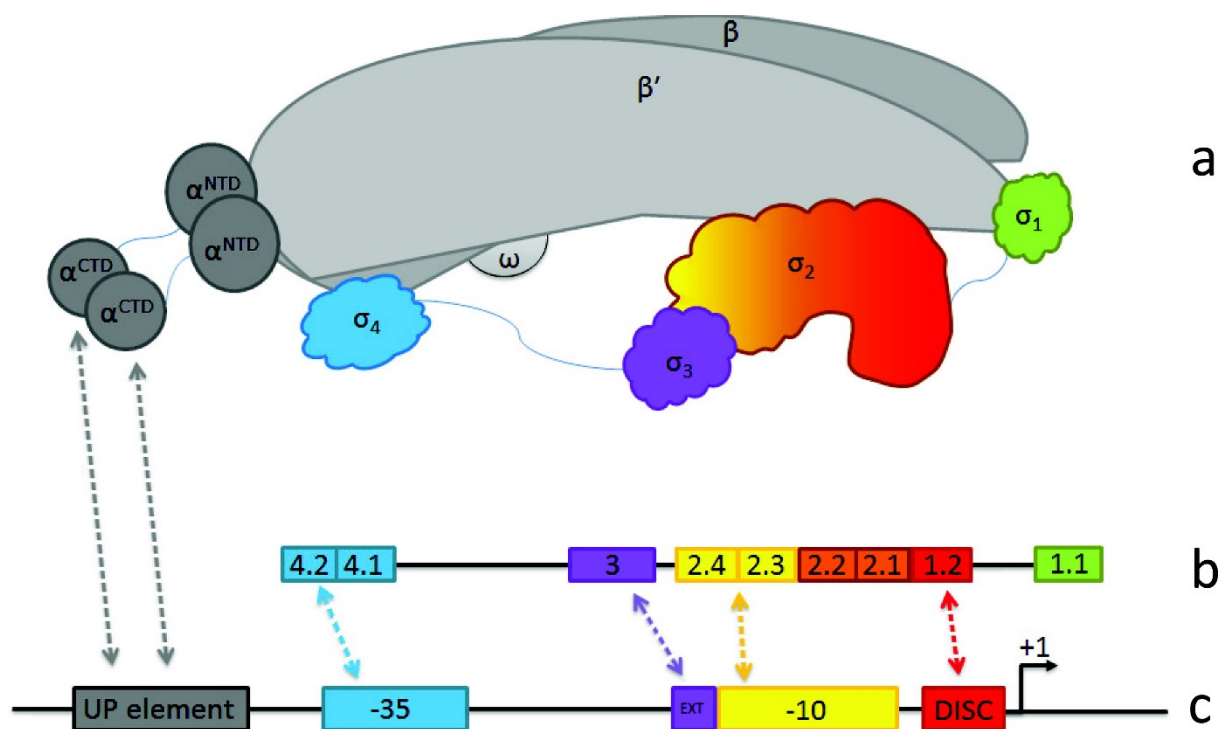
Obrázek 1: Schéma funkce faktoru sigma během iniciace transkripce. core – jádro bakteriální RNAP, holo – kompletní holoenzym bakteriální RNAP (převzato z Davis *et al.*, 2017 a upraveno)

3.1.2 Podjednotky DNA-dependentní RNA polymerázy a jejich interakce s promotory

Promotor je sekvence DNA, jejíž rozeznání holoenzymem RNAP je klíčové pro iniciaci transkripce. Pro jeho rozpoznání jsou důležité konzervované sekvence DNA, s nimiž interagují C-konce podjednotek α a podjednotky σ RNAP (Burgess *et al.*, 1969; Estrem *et al.*, 1999).

Kromě UP elementu v oblasti -60 až -40 před transkripčním startem jsou dalšími konzervovanými sekvencemi bakteriálního promotoru, které již interagují přímo s faktory sigma, oblasti kolem nukleotidů v pozicích -35 a -10 před transkripčním startem. Tyto konzervované sekvence jsou důležité právě pro interakci s faktory sigma rodiny σ^{70} (Feklístov *et al.*, 2014). Konvenční sekvence standardní promotorové oblasti -35 u modelového organismu *Escherichia coli* je TTGACA, přičemž nejkonzervovanější jsou první tři nukleotidové báze TTG. Promotorová oblast kolem nukleotidu v pozici -10 (Pribnowův box) má u stejného modelového organismu konvenční sekvenci TATAAT, zatímco nukleotidová sekvence mezi těmito promotorovými oblastmi, tzv. mezerník, je konzervována jen ohledně své velikosti, a to na 16 až 18 nukleotidů, a nikoli primární nukleotidovou strukturou (Harley a Reynolds, 1987; Hawley a McClure, 1983).

Na rozeznání promotoru konkrétním faktorem sigma mohou mít vliv i krátké dvou až třínukleotidové sekvence DNA, které leží poblíž -10 oblasti a nazývají se -10 rozšiřující motiv a diskriminátor (Obr. 2), přičemž všechny motivy rozeznávané v rámci promotorových sekvencí se vyskytují na netemplátovém vlákně (Feklístov *et al.*, 2014).



Obrázek 2: Modelová struktura bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy a interakcí jejích jednotlivých domén s promotory. Šipky znázorňují interakce proteinových struktur s konkrétními promotorovými sekvencemi, a – schéma bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy s navázanou podjednotkou σ^{70} , b – schéma konzervovaných domén modelového faktoru σ^{70} 1. skupiny (v orientaci od C-konce, kde je doména 4.2, k N-konci, kde se nachází doména 1.1) a c – schéma řetězce DNA nesoucího promotorovou sekvenci, kde EXT představuje -10 rozšiřující motiv a DISC diskriminátor (převzato z Davis *et al.*, 2017 a upraveno)

3.2 Faktory sigma u rodu *Rhodococcus*

Počet kódovaných faktorů sigma je u druhů rodu *Rhodococcus* značně variabilní, avšak v podstatě koreluje s velikostí jejich genomů, takže s rostoucí velikostí genomu roste i počet kódovaných faktorů sigma (Tabulka 2). Oprávněnost této hypotézy není příliš dotčena ani skutečností, že celkové počty faktorů sigma u rhodokoků se často liší podle svých zdrojů, což souvisí s tím, jak podrobně jsou deponované sekvence genomů rhodokoků jednotlivými autory anotovány. Například z databáze MiST3.0 (Gumerov *et al.*, 2020) plyne rozmezí počtu faktorů sigma 10 až 36, zatímco recentní publikace autorů Pátek *et al.*, (2021) uvádí rozmezí od 12 do 34). Většina z těchto faktorů sigma pravděpodobně má takzvanou extracytoplasmatickou funkci (ECF). Díky nim jsou zástupci rodu *Rhodococcus* schopni efektivně modulovat metabolickou odpověď na různé typy environmentálních stresů (Pátek *et al.*, 2021).

Tabulka 2: Velikost genomu u zástupců rodu *Rhodococcus* a počet kódovaných faktorů sigma

| Kmen | Sekvence genomu (GenBank Acc. No.) | Velikost genomu (Mpb) | Počet faktorů sigma |
|--|------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>Rhodococcus</i> sp. PBTS 1 | GCF_001620025.1 | 4,25 | 10 |
| <i>Rhodococcus</i> sp. WMMA185 | GCF_001767395.1 | 4,44 | 17 |
| <i>Rhodococcus hoagii</i> 103S | GCF_000196695.1 | 5,04 | 20 |
| <i>Rhodococcus fascians</i> D188 | GCF_001620305.1 | 5,50 | 14 |
| <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> SB3094 | GCF_000511305.1 | 5,59 | 17 |
| <i>Rhodococcus aetherivorans</i> IcdP1 | GCF_000982715.1 | 5,92 | 18 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> CCM2595 | GCF_000454045.1 | 6,37 | 19 |
| <i>Rhodococcus</i> sp. YL-1 | GCF_001942025.1 | 7,60 | 23 |
| <i>Rhodococcus opacus</i> B4 | GCF_000010805.1 | 8,84 | 34 |
| <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 | GCF_000014565.1 | 9,70 | 36 |

Zpracováno dle MiST3.0 (Gumerov *et al.*, 2020)

3.2.1 Modelové organismy pro hledání strukturních či funkčních homologií

S ohledem na skutečnost, že regulace exprese genů kódujících faktory sigma u rhodokoků není často známa, není zatím popsána ani komplexní síť regulačních mechanismů, které u rhodokoků modulují transkripci a tím i fyziologické odpovědi na různé podmínky v okolním prostředí.

Z analýz genů v sekvencích genomů v databázích je zřejmé, že faktory sigma u rhodokoků vykazují největší strukturní podobnost s faktory sigma *Mycobacterium tuberculosis* (Pátek *et al.*, 2021). Jelikož soubor jejich faktorů sigma i jejich transkripční regulační síť jsou relativně dobře prozkoumány (Manganelli, 2014), je nasnadě, že tento rhodokokům příbuzný organismus je vhodným modelem pro srovnávací analýzu mykobakteriálních faktorů sigma s jejich homology u rhodokoků, a to jak s ohledem na jejich samotnou funkci, tak i při analýze konvenčních promotorových sekvencí rozeznávaných jednotlivými faktory sigma a s nimi souvisejících regulonů.

U rhodokoků je však nutné počítat i s tím, že se u nich vyskytují i zcela unikátní faktory sigma a že jen jednoduché srovnání jejich regulační sítě na základě porovnání s modelovým organismem není možné. Není však vyloučeno, že mnoho atributů bude obdobných a již známé

regulační sítě u příbuzných modelových organismů, k nimž patří zástupci rodů *Mycobacterium* a *Corynebacterium*, poslouží jako vhodné analogie.

3.2.2 Primární faktory σ^A u rodu *Rhodococcus*

Přestože primární faktory sigma σ^A patří do první skupiny faktorů rodiny σ^{70} , která je charakterizovaná přítomností domény $\sigma^{1.1}$, u anotovaných σ^A rhodokoků není zatím tato funkční doména $\sigma^{1.1}$ definována. Jelikož však až 150 aminokyselin dlouhé N-koncové sekvence předcházející funkční doménu $\sigma^{1.2}$, která již popisována je, jsou u většiny faktorů σ^A rhodokoků vysoce konzervované, což svědčí o důležitosti jejího prostorového uspořádání, lze předpokládat, že tato oblast plní funkci domény $\sigma^{1.1}$, tj. zabránění navázání volného faktoru sigma přímo na promotorovou sekvenci DNA. Spolu s doménou $\sigma^{1.2}$ jsou již v rámci anotací také popsány i všechny další konzervované domény typické pro první podskupinu faktorů rodiny σ^{70} , tj. σ^2 , σ^3 i σ^4 (Gumerov *et al.*, 2020; Schwartz *et al.*, 2008).

Velikost σ^A je mezi rhodokoky variabilní, nicméně i v rámci genomu jednoho kmene se v anotovaných sekvencích může vyskytnout více potenciálních genů kódujících primární faktor sigma. To lze dokumentovat na příkladu dvou anotovaných σ^A u kmene *Rhodococcus* sp. 66b – jeden o velikosti 479 aminokyselin (GenBank Acc. No.: OQM79024.1) a druhý menší (GenBank Acc. No.: OQM78523.1) tvořený 430 aminokyselinovými zbytky. Nejmenšími anotovanými primárními faktory sigma jsou dle databáze GenBank σ^A (GenBank Acc. No.: CRK53085.1) kmene *Rhodococcus* sp. RD6.2 s 323 aminokyselinami ve své struktuře a σ^A (GenBank Acc. No.: PBI95377.1) kmene *Rhodococcus erythropolis* ACN1 tvořený 341 aminokyselinovými zbytky. S ohledem na jejich nízkou sekvenční homologii se standardními faktory σ^A popsanými u jiných rhodokoků determinovanou pomocí programu BLASTP (NCBI), malou velikost, která je zapříčiněná hlavně zkrácením aminokyselinové sekvence před funkční doménou $\sigma^{1.2}$, a také přítomnost většího standardního faktoru σ^A u těch samých organismů (GenBank Acc. No.: CRK53072.1 pro *Rhodococcus* sp. RD6.2 a GenBank Acc. No. PBI97546.1 pro *Rhodococcus erythropolis* ACN1), je do značné míry zpochybnitelné, že by mezi faktory σ^A byla u zástupců rodu *Rhodococcus* až taková délková variabilita. Spodním limitem pro počet aminokyselin ve struktuře faktoru σ^A je tak u dosud anotovaných genomů zástupců rodu *Rhodococcus* spíše hodnota 430 aminokyselinových zbytků zjištěná u kmenů *Rhodococcus erythropolis* ACN1 (GenBank Acc. No. PBI97546.1), *Rhodococcus qingshengii* CS98 (GenBank Acc. No.: BCF83082.1) či *Rhodococcus* sp. 66b (GenBank Acc. No.:

OQM78523.1). Analýza těchto faktorů sigma založená na informacích dostupných v rámci databází naznačuje, že nekritická důvěra v tyto údaje může vést k falešným závěrům.

Faktor σ^A se u rhodokoků uplatňuje zejména při expresi tzv. vegetativních (*housekeeping*) genů během exponenciální fáze růstu a jeho regulon je patrně nejširší mezi všemi faktory sigma, které jsou u těchto organismů přítomné, což samozřejmě platí i u příbuzných modelových organismů rodu *Mycobacterium* a *Corynebacterium* (Manganelli, 2014; Pátek a Nešvera, 2011; Pátek *et al.* 2021).

Přestože jde o esenciální faktor sigma, byly připraveny mutantní kmeny odvozené od kmene *Rhodococcus ruber* TH nesoucí sice funkční, ale modifikovaný gen *sigA*, u kterých vzrostla rychlost vybraných katalytických reakcí. Příprava mutantů v *sigA* tak našla potenciální využití při konstrukci nových biotechnologicky významných kmenů, u nichž modifikovaný gen *sigA* umožňoval rychlejší řízení genové exprese při odpovědi na stres (Ma a Yu, 2012). U kmene *Rhodococcus ruber* TH byla na základě analýzy exprese reportérových genů za různými promotory rovněž zjištěna konvenční sekvence promotoru pro tento vegetativní faktor sigma, a to TTGNNN pro -35 oblast promotoru a (T/C)GNNA(A/C)AAT pro rozšířený motiv -10 oblasti promotoru. Na základě této znalosti byly dokonce připraveny modifikované promotory *PamiM* strukturního genu kódujícího aminodeoxychorismátsyntázu, z nichž probíhala transkripce téměř osmkrát častěji než z jejich přirozeně se vyskytujících homologů, což je další možný způsob, jak připravovat efektivní biotechnologicky významné kmeny rhodokoků (Jiao *et al.*, 2018).

3.2.3 Faktory obecné stresové odpovědi σ^B u rodu *Rhodococcus*

Faktory σ^B jsou řazeny do druhé skupiny faktorů σ^{70} a v anotacích jsou u nich rozeznávány všechny domény charakteristické pro druhou skupinu, tj. $\sigma^{1,2}$, σ^2 , σ^3 a σ^4 (Gumerov *et al.*, 2020). Stejně jako u primárního faktoru σ^A platí, že ani faktor σ^B není u rhodokoků dosud příliš popsán, ale je podrobněji charakterizován, a to s ohledem na strukturu i funkci, u příbuzných organismů rodu *Mycobacterium* či *Corynebacterium* (Manganelli, 2014; Pátek a Nešvera, 2011). Bylo zjištěno, že faktory σ^B u dosud zkoumaných rhodokoků vykazují ze všech známých faktorů sigma největší sekvenční aminokyselinovou identitu s odpovídajícími faktory σ^B u kmenů *Mycobacterium tuberculosis* (tabulka 3) a patří k nejkonzervovanějším faktorům sigma u rhodokoků (Pátek *et al.*, 2021).

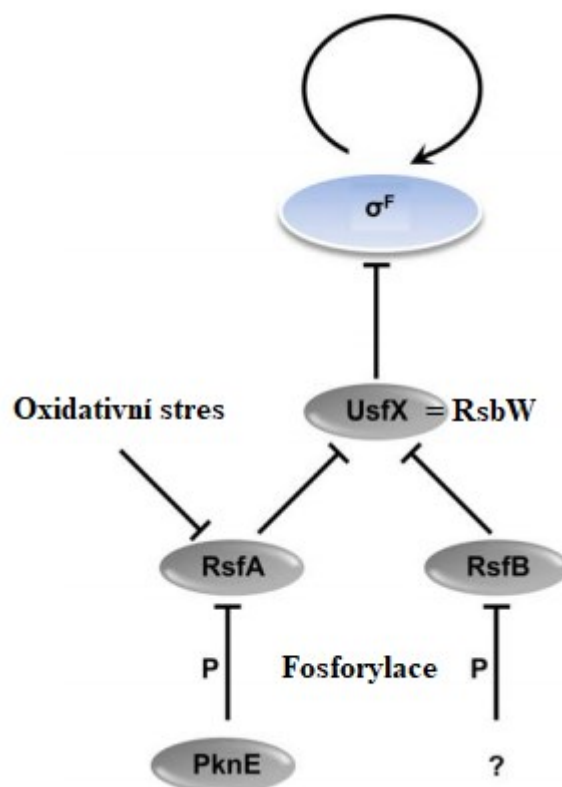
Přestože jsou konkrétní dopady exprese genů *sigB* kódujících faktory σ^B u zástupců rodu *Rhodococcus* dosud většinou neznámé, bylo již zjištěno, že se stejně jako u modelových organismů rodu *Mycobacterium* a *Corynebacterium* jedná o faktory sigma, jejichž exprese

souvisí s řízením genové exprese za stresových podmínek nebo za přechodu z fáze exponenciálního růstu do fáze stacionární. Zatímco primární faktor σ^A byl u kmene *Rhodococcus opacus* B4 exprimován v podstatě kontinuálně, tj. v exponenciální nebo stacionární fázi či při vystavení stresovým podmínkám, např. při expozici organickým rozpouštědlům, zvýšená exprese genu *sigB* byla zjištěna teprve po vystavení organickým rozpouštědlům nebo při přechodu rostoucí kultury do stacionární fáze, přičemž mutanti v genu *sigB* vykazovali i sníženou rezistenci proti účinkům těchto rozpouštědel (Kita *et al.*, 2009).

Rhodococcus jostii RHA1 je příkladem kmene, u kterého bylo objeveno více potenciálních faktorů sigma patřících do druhé skupiny faktorů sigma rodiny σ^{70} , jeden (GenBank Acc. No.: ABG98585.1) o počtu 323 aminokyselinových zbytků, druhý (GenBank Acc. No.: ABG98595.1), který má 457 aminokyselinových zbytků, je velice podobný faktorům σ^A u jiných druhů rhodokoků a je považován za základní faktor sigma u *R. jostii* RHA1, a třetí (σ^{B1} – GenBank Acc. No.: WP_011594615.1) o počtu 520 aminokyselinových zbytků. Participace nejdelšího z nich na regulaci transkripce již byla experimentálně potvrzena při reakci na stres způsobený teplotou, takže se jedná o největší známý faktor obecné stresové odpovědi u rhodokoků, který počtem aminokyselin dokonce převyšuje všechny známé primární faktory sigma u rhodokoků (Ekpanyaskun, 2006; Gumerov *et al.*, 2020).

3.2.4 Faktory σ^F u rodu *Rhodococcus*

Faktory σ^F jsou příkladem faktorů sigma z tzv. 3. skupiny faktorů sigma rodiny σ^{70} , které se vyskytují u zástupců rodu *Rhodococcus* či *Mycobacterium*, nikoliv však u dalšího příbuzného rodu *Corynebacterium* (Pátek a Nešvera, 2011; Pátek *et al.*, 2021). Jsou u nich rozeznávány konzervované domény σ^2 , σ^3 a σ^4 a jejich účast na řízení genové exprese je regulována i prostřednictvím vazby k faktorům anti-sigma, které se pro faktory σ^F nacházejí volně v cytoplasmě, přičemž funkci faktoru anti-sigma dále ovlivňují jejich antagonisté, tzv. faktory anti-anti-sigma, kterých je u *Mycobacterium tuberculosis* až šest. Kromě samotných faktorů anti-sigma a anti-anti-sigma jsou součástí regulační kaskády i proteinkinázy fosforylující faktory anti-anti-sigma, čímž je inaktivují, neboť za tohoto stavu se nejsou schopny vázat na faktor anti-sigma, který pak může svou vazbou se σ^F blokovat transkripci ze σ^F -dependentních promotorů. Za opačné situace, tj. když jsou faktory anti-anti-sigma defosforylované, váží se na faktor anti-sigma, což umožní uvolnit σ^F do cytoplasmy a zahájit transkripci ze σ^F -dependentních promotorů (Manganelli, 2014; Obr. 3).



Obrázek 3: Schéma regulace σ^F u druhu *Mycobacterium tuberculosis*. PknE – proteinkináza E; RsfA, RsfB – faktory anti-anti-sigma; UsfX/RsbW – faktor anti-sigma; inhibiční efekt je znázorněn šipkami ve tvaru „T“, zatímco ostrá šipka označuje autoregulační efekt σ^F (převzato z Manganelli, 2014 a upraveno)

Větší komplexitu regulace faktorů σ^F , a to nejen z hlediska počtu faktorů anti-anti-sigma, naznačuje recentní studie popisující nový faktor anti-sigma Rv1364c u *Mycobacterium tuberculosis*, který ke své funkci nepotřebuje antagonistu v podobě faktoru anti-anti-sigma, neboť součástí jeho proteinové struktury je autoregulační doména. V regulační kaskádě faktoru σ^F byla navíc prokázána role proteinkinázy D, která výše zmíněný faktor anti-sigma Rv1364c i faktor σ^F fosforyluje. Fosforylace obou těchto proteinů proteinkinázou D za podmínek osmotického stresu znemožňuje jejich vazbu k sobě a tím aktivuje transkripci ze σ^F -dependentních promotorů, přičemž fosforylace faktoru σ^F ovlivňuje i to, jaké promotory v rámci svého regulonu σ^F primárně rozeznává (Misra *et al.*, 2019). Dle databáze GenBank a srovnání v programu NCBI BLASTP mají tyto proteiny své strukturní homology i u rhodokoků, takže je velmi pravděpodobné, že se regulace faktorů σ^F pomocí těchto homologních proteinů vyskytuje i u nich.

Funkce faktorů ze skupiny σ^F byla u rhodokoků potvrzena při stresové odpovědi na vysychání, tj. za nízké vodní aktivity v prostředí. Bylo zjištěno, že u *Rhodococcus jostii* RHA1

byly při přežívání za minimální vlhkosti exprimovány geny *sigF1* a *sigF3*, které kódují odpovídající faktory σ^{F1} a σ^{F3} . I u faktorů σ^F totiž platí, že v konkrétním genomu bývá více orthologů téhož strukturního genu kódujícího σ^F , díky čemuž lze předpokládat, že regulace exprese σ^F -dependentních stresových genů je ještě daleko komplexnější než u modelového organismu *Mycobacterium tuberculosis* (LeBlanc *et al.*, 2008). Kromě výše zmíněné reakce na vysychání se σ^{F1} uplatňuje u *Rhodococcus jostii* RHA1 i při osmotickém stresu, který rovněž souvisí s horší dostupností vody pro buňku (Ekpanyaskun, 2006), zatímco faktor σ^{F3} byl exprimován po vystavení tohoto kmene fluorovaným organickým kyselinám s alifatickými řetězci, které mají detergentní účinky (Weathers *et al.*, 2015).

3.2.5 Faktory sigma s extracytoplasmatickou funkcí u rodu *Rhodococcus*

Faktory sigma s extracytoplasmatickou funkcí (ECF) tvoří největší množinu faktorů sigma u zástupců rodu *Rhodococcus*, přičemž jen *Rhodococcus jostii* RHA1 jich kóduje dle databáze MiST3.0 více než 30. Takové množství ECF faktorů sigma nenajdeme ani u zástupců příbuzného modelového rodu *Corynebacterium*, kteří disponují nejvýše pěti, ani u kmenů *Mycobacterium tuberculosis*, které disponují celkem deseti, takže některé z ECF faktorů sigma u rhodokoků jsou pro ně naprosto jedinečné (Manganelli, 2014; Pátek a Nešvera, 2011). To však nic nemění na tom, že ty, které unikátní nejsou, mohou být jak strukturně, tak i funkčně velmi podobné svým homologům objeveným a popsáným u jiných zástupců skupiny Mycolata, přičemž, jak je patrné z Tabulky 3, při srovnání ECF faktorů sigma různých druhů rodu *Rhodococcus* s odpovídajícími faktory sigma *Mycobacterium tuberculosis* jsou si mezirodově strukturně nejpodobnější faktory σ^E a σ^H (Pátek *et al.*, 2021).

Tabulka 3: Aminokyselinová identita (v %) základních faktorů σ vybraných zástupců rodu *Rhodococcus* vůči odpovídajícím faktorům σ *Mycobacterium tuberculosis*

| Kmen | σ^A | σ^B | σ^F | σ^H | σ^E | σ^D | σ^M | σ^K | σ^G | σ^J |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> CCM2595 | 79 | 84 | 60 | 82 | 86 | 64 | 53 | 60 | 63 | 54 |
| <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 | 77 | 85 | 62 | 88 | 79 | 66 | 52 | 54 | 63 | 54 |
| <i>Rhodococcus opacus</i> PD630 | 77 | 85 | 65 | 82 | 79 | 62 | 51 | 53 | 65 | 59 |
| <i>Rhodococcus equi</i> 103S | 75 | 85 | 61 | 80 | 85 | 84 | 70 | 69 | 71 | 65 |
| <i>Rhodococcus fascians</i> D188 | 76 | 83 | 59 | 85 | 82 | 79 | 60 | 53 | 69 | 54 |

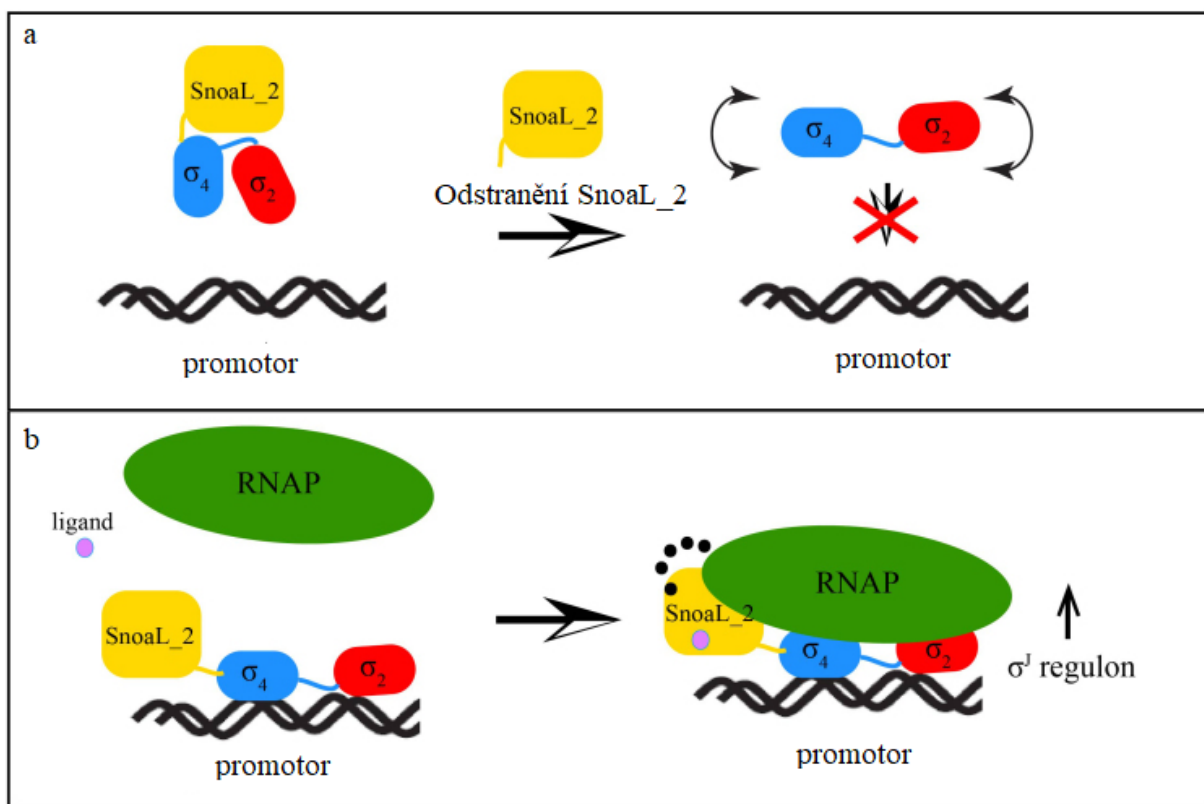
(Pátek *et al.*, 2021)

ECF faktory sigma u rhodokoků lze z hlediska proteinové struktury rozdělit do několika různých podskupin, přičemž do první z nich patří σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K a σ^M nesoucí konzervované domény typické pro čtvrtou skupinu faktorů rodiny σ^{70} , tj. σ^2 a σ^4 nebo jejich část. Aktivita těchto faktorů sigma je s výjimkou σ^C pravděpodobně regulována vazbou k příslušným faktorům anti-sigma, což by odpovídalo stavu známému u modelového organismu *Mycobacterium tuberculosis* (Manganelli, 2014).

Na základě analogie s modelovými organismy *Mycobacterium tuberculosis* a *Corynebacterium glutamicum* lze predikovat funkce faktorů σ^E a σ^H . U těchto modelových organismů se oba tyto faktory účastní odpovědi na teplotní šok a σ^E dále ovlivňuje reakci na povrchový stres (Manganelli, 2014; Pátek a Nešvera, 2011).

Do další podskupiny lze zařadit faktory sigma σ^G a σ^J , které kromě charakteristických domén σ^2 a σ^4 obsahují další C-koncovou doménu SnoaL_2, u níž je na základě studií faktoru σ^J modelového organismu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv předpokládána její autoregulační funkce pro aktivitu daného faktoru sigma (Goutam *et al.*, 2017). Hypotézu o možnosti autoregulace faktorů σ^G i σ^J podporuje rovněž fakt, že u těchto faktorů sigma nebyla potvrzena regulace vlastními faktory anti-sigma, přestože u σ^G *Mycobacterium tuberculosis* byla alespoň předpokládána (Manganelli, 2014). Co se týče vlastní domény SnoaL_2, řadí se k tzv. NTF-2-like rodině proteinů a je u ní předpokládána interakce s ligandem, čímž s vysokou pravděpodobností moduluje transkripční aktivitu ECF faktorů sigma z této podskupiny. A nejen to, po odstranění SnoaL_2 domény nebyly takovéto faktory σ^J vůbec schopny vazby k σ^J -dependentním promotorům, což naznačuje, že je její přítomnost z hlediska funkční proteinové struktury dokonce esenciální (Obr. 4). Ačkoli lze v databázi MiST3.0 nalézt i strukturně podobnou doménu SnoaL_4 u nepojmenovaného ECF faktoru kmene *Rhodococcus opacus* B4, je otázkou, zda opět nejde o doménu SnoaL_2, neboť v rámci databáze GenBank je u strukturně

zcela identického faktoru sigma σ^G (GenBank Acc. No.: BAH53704.1) u *Rhodococcus opacus* B4 tato doména označována právě jako SnoaL_2. Rozdíly v záznamech mohou být dány tím, že zástupci NTF-2-like rodiny proteinů nejsou příliš konzervovány ohledně své sekvence či její délky, ale jsou si podobné svou terciární strukturou. Zároveň však není ani vyloučeno, že následné jasné odlišení SnoaL_2 a SnoaL_4 domén v rámci NTF-2-like usnadní základní determinaci faktorů σ^G a σ^J (Eberhardt *et al.*, 2013; Finn *et al.*, 2016; Goutam *et al.*, 2017). Jelikož však interakce ani jedné z těchto domén s ligandem dosud kvůli absenci relevantních krystalografických struktur potvrzena nebyla, zůstává tento určující znak stále jen v teoretické rovině (Goutam *et al.*, 2017).



Obrázek 4: Schéma potenciální regulace aktivity faktoru σ^J pomocí jeho C-koncové domény SnoaL_2 u *Mycobacterium tuberculosis*. a – faktor σ^J není schopen bez SnoaL_2 domény vazby k promotorové sekvenci; oboustranné šipky naznačují, že se k promotorové sekvenci nemůže vázat ani v žádné jiné orientaci než σ^4 doména k -35 oblasti promotoru a σ^2 doména k -10 oblasti promotoru; b – faktor sigma s přítomnou SnoaL_2 doménou se ve správné orientaci váže k promotoru, po navázání ligandu je umožněna vazba k jádru RNAP a dochází k transkripci ze σ^J -dependentních promotorů (převzato z Goutam *et al.*, 2017 a upraveno)

Důležitost jiné C-koncové domény, a to domény TPR nacházející se u faktorů σ^I u rhodokoků, lze rovněž předpokládat, přestože žádné relevantní údaje o roli domény TPR na autoregulaci aktivity σ^I u rhodokoků nebyly dosud publikovány. Její role však byla prokázána u modelového organismu *Streptomyces venezuelae*, a to zjištěním, že TPR doména je zcela esenciální pro aktivitu daného faktoru sigma a dokonce i její minimální zkrácení vede k jeho nefunkčnosti, přičemž se předpokládá, že TPR doména je důležitá pro interakce faktoru sigma s dalšími proteiny (Liu *et al.*, 2018).

Role konkrétních ECF na řízení genové exprese u rhodokoků, jakož i regulace exprese vlastních strukturních *sig* genů kódujících ECF, jsou zatím publikovány poměrně zřídka, ale již víme, že u kmene *Rhodococcus jostii* RHA1 platí, že se jeho faktor σ^{J3} účastní odpovědi na osmotický stres (Ekpanyaskun, 2006) a faktor σ^G byl ve větší míře přítomen v buňkách při nedostatku zdrojů uhlíku, přestože nebyl pro přežívání kmene za těchto podmínek rozhodující, neboť životaschopnost $\Delta sigG$ mutantů za stejných podmínek nebyla významně ovlivněna (Patrauchan *et al.*, 2012).

3.2.6 Ostatní proteiny anotované jako faktory sigma

U rhodokoků jsou v databázi MiST3.0 popsány i extrémně krátké faktory σ , a to například faktor sigma o délce pouhých 67 aminokyselinových zbytků (GenBank Acc. No.: WP_011597055.1) u kmene *Rhodococcus jostii* RHA1 nebo faktor sigma ještě o 1 aminokyselinový zbytek kratší (GenBank Acc. No.: WP_080512515.1) u *Rhodococcus opacus* B4, které obsahují pouze konzervovanou doménu $\sigma^{4.2}$ či alespoň její část. Jejich možné přímé zapojení do procesu iniciace transkripce je však diskutabilní, neboť takový faktor sigma z principu nemůže nijak interagovat s -10 konzervovanou promotorovou oblastí (Davis *et al.*, 2017).

Další skupinou potenciálních faktorů sigma, kterou lze v rámci databáze MiST3.0 rozlišit, jsou ty obsahující doménu zf-HC2 (například GenBank Acc. No.: WP_011594337.1 u kmene *Rhodococcus jostii* RHA1). Tato doména je u modelového rodu *Mycobacterium* předpokládána jen ve strukturách faktorů anti-sigma, avšak její role není dosud popsána (Finn *et al.*, 2016). U faktorů sigma, jejichž součástí je doména zf-HC2, není nalezena žádná z domén σ^2 nebo σ^4 , takže i zde je diskutabilní, zda tyto proteiny vůbec patří mezi faktory sigma.

4 ZÁVĚR

Kmeny rodu *Rhodococcus* jsou charakteristické velkým genomem nesoucím ohromné množství genů pro anabolické i katabolické dráhy významné v biotechnologických aplikacích. Pro efektivní využití jejich biotechnologického potenciálu je však třeba znát mechanismy regulace exprese těchto průmyslově významných genů, protože metabolismus každého organismu řídí transkripční regulační síť, jejíž základní složkou jsou strukturální geny kódující faktory sigma exprimované v závislosti na specifických podmínkách prostředí.

Bakterie při svém růstu v jakémkoliv prostředí totiž čelí stresovým podmínkám, jimž se musí permanentně přizpůsobovat. Odpovědi na obecné stesy (oxidativní, teplotní, desikační a povrchový) jsou řízeny hlavními stresovými faktory sigma, které, jak vyplývá z dostupných publikačních i databázových dat, jsou vysoce konzervované u všech příbuzných mikroorganismů a vyskytují se napříč bakteriálními rody. Ve specifických prostředích, v nichž například přežívají právě zástupci rodu *Rhodococcus*, však přibývají další zcela specifické stresory, což u těchto bakterií značně zvyšuje nároky na genovou výbavu a efektivní modulaci její exprese. Během evoluce se tak selektovaly strukturální geny kódující i zcela unikátní faktory sigma umožňující právě tuto striktní transkripční regulaci genové exprese.

Rod *Rhodococcus* patří mezi bakterie s velkým počtem faktorů sigma. Tento počet je navíc značně variabilní a v podstatě koreluje s velikostí genomu konkrétního kmene, a to tak, že s rostoucím genomem se zvyšuje i množství kódovaných faktorů sigma.

Publikačních zdrojů zabývajících se faktory sigma u kmenů rodu *Rhodococcus* je zatím velmi málo, ale mnoho informací lze získat analýzou velkého množství dat deponovaných v molekulárně-biologických databázích (např. GenBank, MiST 3.0). Takové analýzy ukazují, že faktory sigma u rhodokoků jsou sekvenčně a strukturálně nejpodobnější faktorům sigma u *Mycobacterium tuberculosis*, z nichž největší mezirodovou podobnost vykazují faktory σ^B , σ^E a σ^H . Genomy rhodokoků však nesou i několik orthologů strukturálních genů kódujících tentýž faktor sigma, a to včetně primárního faktoru σ^A , čímž se liší od příbuzných modelových organismů *Mycobacterium tuberculosis* a *Corynebacterium glutamicum*.

Funkce jednotlivých faktorů sigma u rhodokoků jsou většinou stanoveny jen na základě jejich strukturálních homologií a analogií s podrobně popsány faktory sigma u příbuzných bakterií skupiny Mycolata. Fyziologickými experimenty byla zatím prokázána jen role σ^A (vegetativní faktor sigma), σ^B (faktor obecné stresové odpovědi uplatňující se při přechodu do stacionární fáze růstu i za podmínek teplotního stresu), σ^F (desikační, oxidativní a povrchový stres), σ^G (hladovění při nedostatku zdrojů uhlíku) a σ^J (osmotický stres).

PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Barry, C.E., Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A., Yuan, Y., 1998. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* 37: 143 – 179.
- Bell, K.S., Philp, J.C., Aw, D.W., Christofi, N., 1998. The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol* 85: 195 – 210.
- Bukliarevich, H. A., Charniauskaya M. I., Akhremchuk A. E., Valentovich L. N., Titok M. A.. 2019. Effect of the structural and regulatory heat shock proteins on hydrocarbon degradation by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap. *Microbiology* 88: 573 – 579.
- Burgess, R.R., 1969. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem* 244: 6168 – 6176.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., Bautz, E.K., 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221: 43 – 46.
- Cappelletti, M., Di Gennaro, P., D'Ursi, P., Orro, A., Mezzelani, A., Landini, M., Fedi, S., Frascari, D., Presentato, A., Zannoni, D., Milanesi, L., 2013. Genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain BCP1, a biodegrader of alkanes and chlorinated compounds. *Genome Announc* 1: e00657-13.
- Caro, A., Boltes, K., Letón, P., García-Calvo, E., 2008. Description of by-product inhibition effects on biodesulfurization of dibenzothiophene in biphasic media. *Biodegradation* 19: 599 – 611.
- de Carvalho, C.C.C.R., da Fonseca, M.M.R., 2005. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *FEMS Microbiol Ecol* 51: 389 – 399.
- 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.
- Delegan, Y., Valentovich, L., Petrikov, K., Vetrova, A., Akhremchuk, A., Akimov, V., 2019. Complete Genome Sequence of *Rhodococcus erythropolis* X5, a Psychrotrophic Hydrocarbon-Degrading Biosurfactant-Producing Bacterium. *Microbiol Resour Announc* 8: e01234-19.
- Eberhardt, R.Y., Chang, Y., Bateman, A., Murzin, A.G., Axelrod, H.L., Hwang, W.C., Aravind, L., 2013. Filling out the structural map of the NTF2-like superfamily. *BMC Bioinformatics* 14: 327
- Ellinger, J., Schmidt-Dannert, C., 2017. Construction of a BioBrick™ compatible vector system for *Rhodococcus*. *Plasmid* 90: 1 – 4.
- 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.
- Estrem, S.T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z.W., Niu, W., Ebright, R.H., Gourse, R.L., 1999. Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev* 13: 2134 – 2147.
- Ekpanyaskun, P., 2006. Transcriptomic analysis of *Rhodococcus* sp. RHA1 responses to heat shock and osmotic stress. University of British Columbia: Disertation thesis.
- 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.
- Fernández de Las Heras, L., García Fernández, E., María Navarro Llorens, J., Perera, J., Drzyzga, O., 2009. Morphological, physiological, and molecular characterization of a newly isolated steroid-degrading actinomycete, identified as *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *Curr Microbiol* 59: 548 – 553.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44: D279 – D285.
- Firriencieli, A., Presentato, A., Favoino, G., Marabottini, R., Allevato, E., Stazi, S.R., Scarascia Mugnozza, G., Harfouche, A., Petruccioli, M., Turner, R.J., Zannoni, D., Cappelletti, M., 2019. Identification of resistance genes and response to arsenic in *Rhodococcus aetherivorans* BCP1. *Front Microbiol* 10: 1 – 13.
- Garrido-Sanz, D., Sansegundo-Lobato, P., Redondo-Nieto, M., Suman, J., Cajthaml, T., Blanco-Romero, E., Martin, M., Uhlik, O., Rivilla, R., 2020. Analysis of the biodegradative and adaptive potential of the novel polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. WAY2 revealed by its complete genome sequence. *Microb Genom* 6: e000363.
- Giles, C., Ndi, O., Barton, M.D., Vanniasinkam, T., 2016. An adenoviral vector based vaccine for *Rhodococcus equi*. *PLoS One* 11: e0152149.

- Goethals, K., Vereecke, D., Jaziri, M., Van Montagu, M., Holsters, M., 2001. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annu Rev Phytopathol* 39: 27 – 52.
- Goodfellow, M., Alderson, G., 1977. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the “rhodochrous” complex. *J Gen Microbiol* 100: 99 – 122.
- Goutam, K., Gupta, A.K., Gopal, B., 2017. The fused SnoaL_2 domain in the *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor σ J modulates promoter recognition. *Nucleic Acids Res* 45: 9760 – 9772.
- 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.
- Guevara, G., Olortegui Flores, Y., Fernández de Las Heras, L., Perera, J., Navarro Llorens, J.M., 2019. Metabolic engineering of *Rhodococcus ruber* Chol-4: A cell factory for testosterone production. *PLoS One* 14: e0220492.
- Gumerov, V.M., Ortega, D.R., Adebali, O., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., 2020. MiST 3.0: an updated microbial signal transduction database with an emphasis on chemosensory systems. *Nucleic Acids Res* 48: D459 – D464.
- Harley, C.B., Reynolds, R.P., 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15: 2343 – 2361.
- Hawley, D.K., McClure, W.R., 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 11: 2237 – 2255.
- Henson, W.R., Hsu, F.-F., Dantas, G., Moon, T.S., Foston, M., 2018. Lipid metabolism of phenol-tolerant *Rhodococcus opacus* strains for lignin bioconversion. *Biotechnol Biofuels* 11: 339.
- Hetzler, S., Bröker, D., Steinbüchel, A., 2013. Saccharification of cellulose by recombinant *Rhodococcus opacus* PD630 strains. *Appl Environ Microbiol* 79: 5159 – 5166.
- Hu, X., Li, D., Qiao, Y., Song, Q., Guan, Z., Qiu, K., Cao, J., Huang, L., 2020. Salt tolerance mechanism of a hydrocarbon-degrading strain: Salt tolerance mediated by accumulated betaine in cells. *J Hazard Mater* 392: 122326.
- Chaudhary, D.K., Kim, J., 2018. *Rhodococcus olei* sp. nov., with the ability to degrade petroleum oil, isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 68: 1749 – 1756.
- Chamberlin, M., Berg, P., 1962. Deoxyribo nucleic acid-directed synthesis of ribonucleic acid by an enzyme from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 81 – 94.
- Cheng, Y., Zang, H., Wang, H., Li, D., Li, C., 2018. Global transcriptomic analysis of *Rhodococcus erythropolis* D310-1 in responding to chlorimuron-ethyl. *Ecotoxicol Environ Saf* 157: 111 – 120.
- Jiao, S., Li, F., Yu, H., Shen, Z., 2020. Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 1001–1012.
- Jiao, S., Yu, H., Shen, Z., 2018. Core element characterization of *Rhodococcus promoters* and development of a promoter-RBS mini-pool with different activity levels for efficient gene expression. *N Biotechnol* 44: 1001 – 1012.
- Kämpfer, P., Dott, W., Martin, K., Glaeser, S.P., 2014. *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 755 – 761.
- 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.
- Khairy, H., Meinert, C., Wübbeler, J.H., Poehlein, A., Daniel, R., Voigt, B., Riedel, K., Steinbüchel, A., 2016. Genome and proteome analysis of *Rhodococcus erythropolis* MI2: elucidation of the 4,4'-dithiodibutyric acid catabolism. *PLoS One* 11: e0167539.
- Kita A, Takiguchi N, Kato J., 2009. Cloning and characterization of *sigA* and *sigB* genes from *Rhodococcus opacus* strain B4: involvement of *sigB* in organic solvent tolerance. *J Environ Biotechnol* 9(1): 43 – 50.
- Klatte, S., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., 1994. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44: 769 – 773.
- Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H., 1992. Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue. *Biochemistry* 31: 9000 – 9007.
- Kolomytseva, M.P., Solianikova, I.P., Golovlev, E.L., Golovleva, L.A., 2005. Heterogeneity of *Rhodococcus opacus* 1CP as a response to stress induced by chlorophenols. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 41: 541 – 546.

- LeBlanc, J.C., Gonçalves, E.R., Mohn, W.W., 2008.** Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Environ Microbiol* 74: 2627 – 2636.
- Lechevalier, H.A. 1989.** Nocardioform Actinomycetes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 4: 2348 – 2361.
- Li, X., He, Y., Zhang, L., Xu, Z., Ben, H., Gaffrey, M.J., Yang, Y., Yang, S., Yuan, J.S., Qian, W.-J., Yang, B., 2019.** Discovery of potential pathways for biological conversion of poplar wood into lipids by co-fermentation of *Rhodococci* strains. *Biotechnol Biofuels* 12: 60.
- Li, Y., Wang, H., Hua, F., Su, M., Zhao, Y., 2014.** Trans-membrane transport of fluoranthene by *Rhodococcus* sp. BAP-1 and optimization of uptake process. *Bioresour Technol* 155: 213 – 219.
- Liang, Y., Jiao, S., Wang, M., Yu, H., Shen, Z., 2020.** A CRISPR/Cas9-based genome editing system for *Rhodococcus ruber* TH. *Metab Eng* 57: 13 – 22.
- Liu, Q., Pinto, D., Mascher, T., 2018.** Characterization of the widely distributed novel ECF42 group of extracytoplasmic function σ factors in *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol* 200: e00437-18.
- Liu, W., Tang, D., Shi, R., Lian, J., Huang, L., Cai, J., Xu, Z., 2019.** Efficient production of S-adenosyl-l-methionine from dl-methionine in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 116: 3312 – 3323.
- López de Saro, F.J., Woody, A.Y., Helmann, J.D., 1995.** Structural analysis of the *Bacillus subtilis* delta factor: a protein polyanion which displaces RNA from RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 252: 189 – 202.
- Losick, R., Pero, J., 1981.** Cascades of sigma factors. *Cell* 25: 582 – 584.
- Luong, T.M., Ponamoreva, O.N., Nechaeva, I.A., Petrikov, K.V., Delegan, Y.A., Surin, A.K., Linklater, D., Filonov, A.E., 2018.** Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature. *World J Microbiol Biotechnol* 34: 20.
- Ma, Y., Yu, H., 2012.** Engineering of *Rhodococcus* cell catalysts for tolerance improvement by sigma factor mutation and active plasmid partition. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39: 1421 – 1430.
- Majidzadeh, M., Fatahi-Bafghi, M., 2018.** Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37: 2045 – 2062.
- Sekundární citace: **Yanagawa, R., Honda, E., 1976.** Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. *Infect Immun* 13: 1293 – 1295.
- Malarczyk, E., Pazzioch-Czochra, M., 2000.** Multiple respiratory bursts as a response to veratrate stress in *Rhodococcus erythropolis* cells. *Cell Biol Int* 24: 515 – 527.
- Manganelli, R., 2014.** Sigma factors: key molecules in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence. *Microbiol Spectr* 2: 2.1.02.
- Maniyam, M.N., Ibrahim, A.L., Cass, A.E.G., 2020.** Decolourization and biodegradation of azo dye methyl red by *Rhodococcus* strain UCC 0016. *Environ Technol* 41: 71 – 85.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., Kren, V., 2009.** Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int* 35: 162 – 177.
- Martínková, L., Pátek, M., Veselá A. B., Kaplan O, Uhnáková B., Nešvera J., 2010.** Catabolism of Nitriles in *Rhodococcus*. *Biology of Rhodococcus*, edited by Héctor M. Alvarez, Microbiology Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer. 171 – 206.
- Masai, E., Yamada, A., Healy, J.M., Hatta, T., Kimbara, K., Fukuda, M., Yano, K., 1995.** Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol* 61: 2079 – 2085.
- McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W.L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R.D., Yang, G., Stott, J.M., Schein, J.E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A.S., Marra, M.A., Jones, S.J.M., Holt, R., Brinkman, F.S.L., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J.E., Mohn, W.W., Eltis, L.D., 2006.** The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15582 – 15587.
- Mejha, O.K., Head, I.M., Sherry, A., McCann, C.M., Leary, P., Jones, D.M., Gray, N.D., 2019.** Beyond N and P: The impact of Ni on crude oil biodegradation. *Chemosphere* 237: 124545.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebright, 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.

- Misra, R., Menon, D., Arora, G., Virmani, R., Gaur, M., Naz, S., Jaisinghani, N., Bhaduri, A., Bothra, A., Maji, A., Singhal, A., Karwal, P., Hentschker, C., Becher, D., Rao, V., Nandicoori, V.K., Gandotra, S., Singh, Y., 2019. Tuning the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigF through the multidomain regulator Rv1364c and osmosensory kinase protein kinase D. *J Bacteriol* 201: e00725-18.
- Nagasawa, T., Mathew, C.D., Mauger, J., Yamada, H., 1988. Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Appl Environ Microbiol* 54: 1766 – 1769
- Nagasawa, T., Hitoshi S., Hideaki Y., 1993. The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *App Microbiol Biotechnol* 40: 189 – 195.
- Pátek, M., Grulich, M., Nešvera, J., 2021. Stress response in *Rhodococcus* strains. *Biotechnol Adv*: 107698.
- Pátek, M., Nešvera, J., 2011. Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* 154: 101 – 113.
- Patrauchan, M.A., Miyazawa, D., LeBlanc, J.C., Aiga, C., Florizone, C., Dosanjh, M., Davies, J., Eltis, L.D., Mohn, W.W., 2012. Proteomic analysis of survival of *Rhodococcus jostii* RHA1 during carbon starvation. *Appl Environ Microbiol* 78: 6714 – 6725.
- Perelomov, L.V., Sarkar, B., Sizova, O.I., Chilachava, K.B., Shvikin, A.Y., Perelomova, I.V., Atroshchenko, Y.M., 2018. Zinc and lead detoxifying abilities of humic substances relevant to environmental bacterial species. *Ecotoxicol Environ Saf* 151: 178 – 183.
- 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.
- Prescott, J.F., 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 4: 20 – 34. Sekundární citace: Magnusson, H. 1923. Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein Neuer Eitererreger beim Pferd. *Arch Wiss Prakt Tierheilkd* 50: 22 – 37.
- Puglisi, E., Cahill, M.J., Lessard, P.A., Capri, E., Sinskey, A.J., Archer, J.A.C., Boccazzi, P., 2010. Transcriptional response of *Rhodococcus aetherivorans* I24 to polychlorinated biphenyl-contaminated sediments. *Microb Ecol* 60: 505 – 515.
- Rainey, F.A., Klatte, S., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 1995. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int J Syst Bacteriol* 45: 32 – 36.
- Rosner, B.M., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Schink, B., 1997. Acetylene degradation by new isolates of aerobic bacteria and comparison of acetylene hydratase enzymes. *FEMS Microbiol Lett* 148: 175 – 180.
- Sazykin, I., Makarenko, M., Khmelevtsova, L., Seliverstova, E., Rakin, A., Sazykina, M., 2019. Cyclohexane, naphthalene, and diesel fuel increase oxidative stress, CYP153, *sodA*, and *recA* gene expression in *Rhodococcus erythropolis*. *Microbiologyopen* 8: e00855.
- 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.
- Singer, M.E., Finnerty, W.R., 1988. Construction of an *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vector and plasmid transformation in *Rhodococcus* spp. *J Bacteriol* 170: 638 – 645.
- Sivan, A., Szanto, M., Pavlov, V., 2006. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 346 – 352.
- Sutcliffe, I.C., 1998. Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74: 49 – 58.
- Thanapimmetha, A., Suwaleerat, T., Saisriyoot, M., Chisti, Y., Srinophakun, P., 2017. Production of carotenoids and lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 in batch and fed-batch culture. *Bioprocess Biosyst Eng* 40: 133 – 143.
- Tian, X.-J., Liu, X.-Y., Liu, H., Wang, S.-J., Zhou, N.-Y., 2013. Biodegradation of 3-nitrotoluene by *Rhodococcus* sp. strain ZWL3NT. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 9217 – 9223.
- Vázquez-Boland, J.A., Scotti, M., Meijer, W.G., 2020. Conservation of *Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow and Alderson 1977 and rejection of *Rhodococcus hoagii* (Morse 1912) Kämpfer et al. 2014. *Int J Syst Evol Microbiol* 70: 3572 – 3576.

- Veselý, M., Pátek, M., Nešvera, J., Čejková, A., Masák, J., Jirků, V., 2003. Host-vector system for phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis* based on *Corynebacterium* plasmids. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 523 – 527.
- Weathers, T.S., Higgins, C.P., Sharp, J.O., 2015. Enhanced biofilm production by a toluene-degrading *Rhodococcus* observed after exposure to perfluoroalkyl acids. *Environ. Sci. Technol.* 49: 5458 – 5466.
- Weiss, A., Moore, B.D., Tremblay, M.H.J., Chaput, D., Kremer, A., Shaw, L.N., 2017. The ω subunit governs RNA polymerase stability and transcriptional specificity in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 199: e00459-16.
- Wiedermannová, J., Sudzinová, P., Koval', T., Rabatinová, A., Šanderova, H., Ramaniuk, O., Rittich, Š., Dohnálek, J., Fu, Z., Halada, P., Lewis, P., Krásny, L., 2014. Characterization of HelD, an interacting partner of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 42: 5151 – 5163.
- Woods, N., Murrell J., 1989. The metabolism of propane in *Rhodococcus rhodochrous* PNKb1. *Microbiology-Sgm* 135: 2335 – 2344.
- Yoneda, A., Henson, W.R., Goldner, N.K., Park, K.J., Forsberg, K.J., Kim, S.J., Pesesky, M.W., Foston, M., Dantas, G., Moon, T.S., 2016. Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Res* 44: gkw055.
- Yoon, J.H., Lee, J.S., Shin, Y.K., Park, Y.H., Lee, S.T., 1997. Reclassification of *Nocardioides simplex* ATCC 13260, ATCC 19565, and ATCC 19566 as *Rhodococcus erythropolis*. *Int J Syst Bacteriol* 47: 904 – 907.
- 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.
- Zhang, G., Darst, S.A., 1998. Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit amino-terminal domain. *Science* 281: 262 – 266.
- Zheng, Y.-T., Toyofuku, M., Nomura, N., Shigeto, S., 2013. Correlation of carotenoid accumulation with aggregation and biofilm development in *Rhodococcus* sp. SD-74. *Anal Chem* 85: 7295 – 7301.
- Zídková, L., Szőköl J., Rucká L., Pátek M., Nešvera J., 2013. Biodegradation of phenol using recombinant plasmid-carrying *Rhodococcus erythropolis* strains. *Int Biodeterior* 84: 179.