

6. ZÁVĚR

Studium teplotně regulovaných promotorů *Corynebacterium glutamicum* zahrnovalo tyto přístupy: a/ izolaci a charakterizaci promotorů genů kódujících proteiny teplotního šoku, které byly definovány na základě známé sekvence genomu *C. glutamicum* a jejich testování v různých reportérových systémech b/ vyhledávání promotorů reagujících na zvýšenou teplotu v připravené promotorové knihovně *C. glutamicum*, c/ detailní analýzu mezigenové oblasti cg1934-cg1935 z níž je přepisována nekódující RNA, která se zřejmě účastní regulace odpovědi *C. glutamicum* vůči teplotnímu šoku. V jednotlivých směrech bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Při použití mnohokopiového *promoter-probe* vektoru pET2 (reportérový gen *cat*) bylo zjištěno, že aktivita promotorů genů *clpB*, *clpC* a *sigE* výrazně vzrůstá po teplotním šoku. Aktivita promotoru P-*sigE* vzrůstá (5x) též s přechodem kultury buněk do stacionární fáze růstu. Pozitivní efekt teplotního šoku na aktivitu promotorů P-*clpB*, P-*clpC* a P-*sigE* byl potvrzen i v integrativním systému pRIM2 (reportérový gen *cat*), kde jsou testované promotory přítomny v buňce jen v jedné kopii.
2. Metodou *primer extension* (PEX) byly lokalizovány transkripční počátky genů *clpB* a *sigE*. Transkripční počátek genu *clpB* při 30 °C odpovídá adeninu, který je zároveň součástí iniciačního kodonu ATG, zatímco po teplotním šoku (40 °C, 60 min.) odpovídá thyminu ve vzdálenosti 189 bp od translačního startu genu *clpB*. Dále byly v oblasti promotorů genu *clpB* nalezeny sekvence HAIR, jenž hrají úlohu při negativní regulaci buněčné odpovědi vůči teplotnímu šoku. Transkripční počátek genu *sigE* byl stanoven na adeninu, který je součástí iniciačního kodonu ATG genu *sigE*. V oblasti promotoru genu *sigE* byly nalezeny obrácené repetice IR1, IR2 a IR3, u nichž lze předpokládat účast při regulaci aktivity promotoru P-*sigE* v závislosti na stresových podmínkách.
3. Klonováním *Sau3AI*-fragmentů chromosomu *C. glutamicum* ATCC13023 o velikosti 150 – 500 bp do *promoter-probe* vektoru pET2 byla sestrojena promotorová knihovna *C. glutamicum* a použita pro vyhledávání klonů vykazujících na půdě s chloramfenikolem větší nárůst při zvýšené teplotě. Takto byl získán klon PT11, v němž byla prokázána promotorová aktivita fragmentu DNA obsahujícího oblast mezi geny cg1934 a cg1935, která je výrazně zvýšena po působení teplotního šoku (40 °C, 60 min.). Tento fragment vykazuje promotorovou aktivitu pouze pokud je orientován (vzhledem k reportérovému genu) ve směru opačném proti směru transkripce genu cg1935. Toto zjištění vedlo k předpokladu, že se jedná o promotor genu pro malou nekódující antisense RNA

(ncRNA).

4. Metodou PEX byl v buňkách *C. glutamicum* rostoucích při 30 °C určen transkripční počátek této ncRNA, označené ArnA (antisense RNA) 21 bp před translačním počátkem genu cg1935, přepisovaného v opačném směru. Po teplotním šoku (40 °C, 60 min.) byl zjištěn další transkripční počátek 19 bp před translačním počátkem genu cg1935. Metodou 3' RACE byly přesně stanoveny 3' konce ArnA RNA. Z těchto výsledků vyplývá, že za standardních podmínek je v mezigenové oblasti cg1934-cg1935 syntetizována antisense ncRNA dlouhá 129 nt (označená ArnA1). Během teplotního šoku je navíc syntetizována další ncRNA o délce 131 nt (označená ArnA2). Jedná se o první popsany případ malé nekódující antisense RNA kódované chromosomem *C. glutamicum*.
5. Metodou PEX byl zjištěn transkripční počátek genu cg1935, který kóduje transkripční regulátor typu GntR. Z jeho lokalizace je zřejmé, že dochází k překryvu 5' konců gntR-mRNA a ArnA RNA. ArnA RNA tedy zřejmě působí jako regulátor exprese genu *gntR* antisense mechanismem.