

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavla Dvořáková

Funkce sigma faktorů RNA polymerasy v *Corynebacterium glutamicum*

Functions of sigma factors of RNA polymerase in *Corynebacterium glutamicum*

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Miroslav Pátek, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 5. 2015

Podpis.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost během zpracování této bakalářské práce. Také děkuji své rodině za velkou podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Cílem této práce bylo charakterizovat funkce sigma faktorů bakterie *Corynebacterium glutamicum* a analyzovat sekvence promotorů rozeznávaných jednotlivými sigma faktory. Faktory sigma (σ) jsou podjednotky RNA polymerasy, které zajišťují rozpoznání sekvence specifické promotorové oblasti genu a umožňují tak zahájit jeho transkripci. Genom *C. glutamicum* nese geny, které kódují primární sigma faktor σ^A a šest alternativních sigma faktorů, σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M , jejichž exprese se mění v závislosti na růstových podmínkách a v reakci na podněty z okolního prostředí. Regulace exprese genů na úrovni transkripce je jedním z mechanismů adaptace buňky na změny životních podmínek. V závěru práce je sestavena regulační síť sigma faktorů, která je jádrem komplexní regulační sítě řídící všechny děje v buňce *C. glutamicum*.

Klíčová slova: sigma faktor (SF), RNA polymerasa, *Corynebacterium glutamicum*, transkripce, promotor

Abstract

The aim of this thesis was to characterize the function of sigma factors of the bacterium *Corynebacterium glutamicum* and to analyze the promoter sequences which are recognized by individual sigma factors. Sigma (σ) factors are the subunits of RNA polymerase, which allow recognizing the sequences of specific promoter regions of the gene and initiating its transcription. The *C. glutamicum* genome carries genes encoding the primary sigma factor σ^A and six alternative sigma factors, σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H and σ^M , whose expression is changed depending on the growth conditions and in response to the stimuli from the surrounding environment. Regulation of gene expression at the level of transcription is one of the mechanisms of the adaptation of cells to changes of living conditions. At the conclusion of this work, a model of the regulatory network of sigma factors, which is a core of the complex regulatory network controlling all processes in the cell, is proposed.

Key words: sigma factor (SF), RNA polymerase, *Corynebacterium glutamicum*, transcription, promoter

Obsah

1. Úvod	1
2. RNA polymerasa u bakterií	2
2.1. Úloha sigma faktorů v bakteriální transkripci	2
2.2. Promotory	3
3. Regulace exprese a funkcí sigma faktorů	4
3.1. Regulace na úrovni transkripce	4
3.2. Posttranslační regulace	5
4. <i>Escherichia coli</i>	6
4.1. Sigma faktory <i>E. coli</i>	6
4.1.1. Sigma faktor RpoD (σ^{70} , σ^D)	7
4.1.2. Sigma faktor RpoS (σ^{38} , σ^S)	7
4.1.3. Sigma faktor RpoH (σ^{32} , σ^H)	8
4.1.4. Sigma faktor RpoF (σ^{28} , σ^F)	8
4.1.5. Sigma faktor RpoE (σ^{24} , σ^E)	8
4.1.6. Sigma faktor FecI (σ^{19} , σ^{FecI})	9
4.1.7. Sigma faktor RpoN (σ^{54} , σ^N)	9
5. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	10
5.1. Historie	10
5.1.1. Objev producenta kyseliny L-glutamové	10
5.1.2. Pokroky ve výzkumu <i>C. glutamicum</i>	10
5.2. Charakteristika	11
5.3. Sigma faktory <i>C. glutamicum</i>	13
5.3.1. Sigma faktor SigA (σ^A)	14
5.3.2. Sigma faktor SigB (σ^B)	15
5.3.3. Sigma faktor SigC (σ^C)	16
5.3.4. Sigma faktor SigD (σ^D)	16
5.3.5. Sigma faktor SigE (σ^E)	17
5.3.6. Sigma faktor SigH (σ^H)	17
5.3.7. Sigma faktor SigM (σ^M)	19
5.4. Regulační síť sigma faktorů <i>C. glutamicum</i>	20
6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
6.1. Charakteristika	21

6.2. Sigma faktory <i>M. tuberculosis</i>	22
7. Závěr	24
Seznam zkratek	25
Seznam použité literatury.....	26

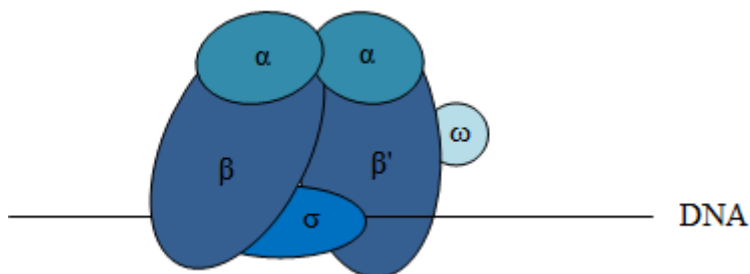
1. Úvod

Bakterie se vyvíjely miliony let a mají proto mnoho způsobů, jak se adaptovat na změny podmínek v prostředí. Využívají k tomu, mimo jiné, mechanismy na úrovni regulace transkripce. Mezi tyto mechanismy patří funkce alternativních sigma faktorů RNA polymerasy, které aktivují expresi různých skupin genů tak, aby se buňka vyrovnala s nově působícími vnějšími i vnitřními faktory. Alternativní sigma faktory působí na expresi genů v součinnosti, vzájemně ovlivňují svoji expresi a funkci a tvoří tak propojenou regulační síť. Tuto síť lze považovat za jádro komplexní regulační sítě, která je podstatou dokonalé adaptace bakteriální buňky na její životní prostředí a jeho změny.

U bakterie *Corynebacterium glutamicum* je známo sedm sigma faktorů, stejně jako u modelového organismu bakterie *Escherichia coli*. Vlastnosti a funkce sigma faktorů z *C. glutamicum* nejsou zdaleka tak známy, jako u jiných modelových bakterií, ale některé základní rysy těchto regulátorů byly již u *C. glutamicum* popsány. Podobnosti a odlišnosti genetické determinace a vlastností a funkcí sigma faktorů u různých bakterií jsou dokladem pozoruhodné mnohotvárnosti regulačních mechanismů, které řídí život buněk.

2. RNA polymerasa u bakterií

Bakteriální DNA-dependentní RNA polymerasa je enzymový komplex složený z několika podjednotek (obr. 1). Obvykle se skládá ze dvou identických α podjednotek a z jedné podjednotky β , β' , σ a ω (Murakami *et al.*, 2002). Tento multi-komplex ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) je schopný transkripce templátu DNA do RNA. Na začátku procesu se naváže sigma faktor (SF) do katalytického jádra enzymu a rozpozná sekvenční motivy promotoru. U bakterií jsou SF specifické pro určitou třídu promotorů v genomu a umožňují přepínání exprese velkých skupin genů (regulonů) (Feklistov a Darst, 2011). Za těchto podmínek může být zahájen proces transkripce specifického genu (Iyer a Aravind, 2012).



Obr. 1: Bakteriální RNA polymerasa. Enzym pro přepis sekvence DNA je tvořen dvěma α podjednotkami, dále podjednotku β , β' a ω . Transkripce genů je zahájena po navázání σ podjednotky do jádra enzymového komplexu a nasednutí vzniklého holoenzymu na promotor (upraveno podle: Cramer, 2002).

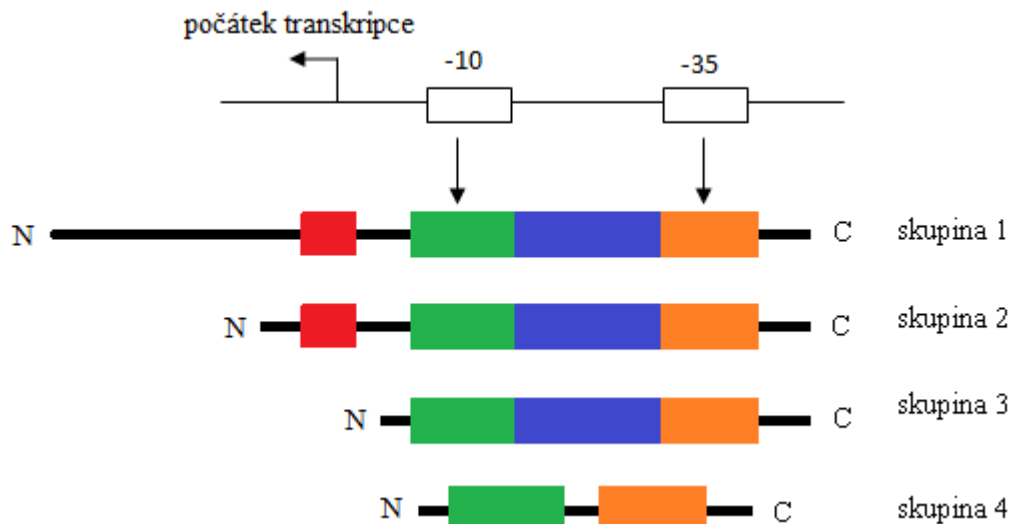
2.1. Úloha sigma faktorů v bakteriální transkripci

Iniciace transkripce je jedním z klíčových stupňů regulace genové exprese a SF vykonávají důležitou roli v tomto procesu. RNA polymerasa je hlavním enzymem transkripce a SF jsou nedílnou součástí enzymového komplexu RNA polymerasy, který rozpoznává specifický promotor a zahajuje transkripci závislých genů. Každý promotor má specifický vztah k sigma faktorům (Murakami *et al.*, 2002).

Druhy bakterií obsahují proměnlivý počet sigma faktorů, které mohou ovlivnit transkripci velkých skupin genů (regulonů). Každý SF specificky rozpoznává promotor určitého genu v reakci na podněty z okolního prostředí nebo na proteinové regulátory uvnitř buňky. Bakterie vlastní vždy jeden SF pro přepis vegetativních genů a rozdílný počet alternativních sigma faktorů, které splňují svůj účel v reakci na různorodé stresové podněty (Gruber a Gross, 2003).

Sigma faktory lze rozdělit do dvou fylogeneticky odlišných rodin, odvozených od modelového organismu *Escherichia coli*. Rodina σ^{54} je závislá na transkripčním aktivátoru,

který pro svou aktivaci vyžaduje ATP (Weiss *et al.*, 1991). Tyto SF se nevyskytují u mnoha druhů bakterií. Rodina σ^{70} , byla naopak prokázána ve všech genomech bakterií. Sigma faktory typu σ^{70} se zařazují do skupin na základě jejich sekvence, struktury a specifických fyziologických funkcí (obr. 2).



Obr. 2: Schéma domén čtyř skupin sigma faktorů z rodiny σ^{70} (Gruber a Gross, 2003). Čtyři základní skupiny sigma faktorů se liší přítomností domén a funkcí. První skupina, kam patří sigma faktory, které se podílejí na přepisu vegetativních genů, obsahují čtyři domény a mají nejdelší N-koncovou část proteinu. Druhá skupina se od první liší pouze délkou N-koncové části proteinu a patří sem sigma faktor, které zastupují roli primárního sigma faktoru. U třetí skupiny se vyskytují pouze tři domény a do této skupiny se řadí např. sigma faktor sporulace nebo flagelárního systému. Do čtvrté skupiny, obsahující pouze dvě domény, patří ECF sigma faktory. Na obrázku jsou naznačeny oblasti -10 a -35, které jsou klíčovými sekvenčními motivy promotorů. Svislé šipky označují domény, které se vážou na klíčové oblasti promotoru (upraveno podle: Rodrigue *et al.*, 2006).

2.2. Promotory

Promotory jsou specifické sekvence DNA v nekódující regulační oblasti, které jsou rozeznávány holoenzymem RNA polymerasy ($\alpha_2\beta\beta'\omega + \sigma$). Prostřednictvím σ podjednotky je určena specificita pro rozpoznání daného promotoru holoenzymem a následně je zahájena transkripce genu. RNA polymerasa se váže na promotor, který je charakterizován sekvenčními elementy -35 až -10 (čísla vyjadřují počet nukleotidů od místa počátku transkripce). Sekvence promotoru je spolu s transkripčními regulátory rozhodující pro to, jak často bude docházet k iniciaci transkripce. Pokud je známa frekvence iniciace transkripce DNA, lze určit, jak je daný promotor silný. Síla promotoru je závislá na afinitě oblasti promotoru k RNA polymerase. Silné promotory mají sekvence hexamerů v oblastech -35 a -10 podobné konsensus sekvenci. Obecně, čím více se sekvence těchto klíčových oblastí odlišuje od této konsensus sekvence, tím je promotor slabší.

Sekvence různých tříd promotorů si jsou v některých případech velice podobné (např. promotory rozpoznávány σ^H a σ^M u *C. glutamicum*). Příklady takových promotorů byly popsány i u modelového organismu bakterie *Escherichia coli* (Wade *et al.*, 2006). V regulační oblasti genu nebo operonu tedy existuje jeden nebo více promotorů, které mohou být rozpoznávány RNA polymerasou se stejnými nebo různými SF - tzv. překrývající se specifitostí sigma faktorů. Tyto duální promotory přispívají ke komplexní transkripci genů a jsou zároveň kontrolními mechanismy pro jejich úspěšnou transkripci (Nonaka *et al.*, 2006). Transkripce ze dvou či více promotorů nastává v reakci sigma faktorů na variaci stimulů z intracelulárního i extracelulárního prostředí. Komplexní genová exprese závisí na mechanismu rozpoznávání promotorů odlišnými SF, na integraci působení vnějších a vnitřních podnětů i DNA-vazebných proteinů a také na růstových podmínkách.

Detailně popsané promotory jsou efektivním elementem pro práci v oblasti metabolického inženýrství. Promotory z *C. glutamicum* hrají důležitou roli v molekulárním šlechtění nových kmenů produkujících aminokyseliny a jsou využívány i v průmyslové výrobě aminokyselin (Nešvera *et al.*, 2012).

3. Regulace exprese a funkcí sigma faktorů

Buňka je schopná přežít a adaptovat se na změny podmínek v životním prostředí, protože dokáže řídit genovou expresi. U bakterií jsou vyvinuté mechanismy pro řízení regulace genové exprese v několika úrovních. Základními úrovněmi jsou transkripce, translace a posttranskripční či posttranslační úpravy.

Regulaci genové exprese na úrovni transkripce zajišťují, kromě transkripčních regulátorů, zejména sigma faktory, které umožňují zahájit transkripci po rozpoznání promotorové sekvence. Iniciací transkripce je hlavní regulační krok v genové expresi u bakterií. Regulační mechanismy umožňují, že dochází k efektivnímu využití vzniklých proteinů a buňka se vyrovná s různými nedostatky prostředí (Browning, *et al.*, 2004).

3.1. Regulace na úrovni transkripce

Aby byla genová exprese koordinována a úroveň transkripce genů za různých podmínek vždy odpovídala potřebám buňky, existuje více mechanismů regulace genové exprese, které se vzájemně doplňují. Genovou expresi ovlivňují různé transkripční regulátory, např. represory a aktivátory nebo antisense RNA, které zde však nebudou popisovány. Předmětem mého zájmu jsou obzvláště sigma faktory.

Podstatnými aspekty regulace genové exprese na úrovni sigma faktorů je především koncentrace sigma faktorů, množství sigma faktorů, které jsou ve vazbě s anti-sigma faktory (viz dále), afinita sigma faktorů k RNA polymerase a fyziologický stav buňky. Na základě těchto skutečností SF kompetují o jádro RNA polymerasy v reakci na změny v prostředí (Farewell *et al.*, 1992). Jakmile se zvýší aktivita jednoho SF, nepřímým působením dojde k potlačení vazby jiného SF k RNA polymerase a transkripce genů, které byly závislé právě na tomto SF, neproběhne. Takto se reguluje exprese dočasně nepotřebných genů (Mauri a Klumpp, 2014).

Zásadním regulátorem genové exprese na úrovni transkripce jsou tedy sigma podjednotky RNA polymerasy, které mají většinou více variant alternativních sigma faktorů. Každý SF ovlivňuje transkripci různých skupin genů (Treviño-Quintanilla *et al.*, 2013). Tento mechanismus je účinný pro koordinaci exprese jednotlivých sad genů potřebných pro adaptivní reakce (Österberg *et al.*, 2011).

Těmito interakcemi se utváří složitá regulační síť. Buňka má tedy mnoho způsobů jak ovlivnit genovou expresi, které jí umožňují přizpůsobit se různým podmínkám a náhlým změnám v životním prostředí.

3.2. Posttranslační regulace

Regulaci buněčných procesů mohou ovlivňovat nejen interakce mezi SF, ale existují i antagonisté sigma faktorů, kterými jsou anti-sigma faktory kontrolující dostupnost alternativních sigma faktorů (Österberg *et al.*, 2011). Anti-sigma faktory se reverzibilně vážou na SF a udržují je v neaktivním stavu do té doby, než dojde ke stimulaci stresovým signálem. Tento komplex anti-sigma+SF blokuje transkripci, jelikož dojde ke změně konformace RNA polymerasy nebo je zabráněno vazbě SF do jádra RNA polymerasy (Busche *et al.*, 2012).

Anti-sigma faktory zahajují svou aktivitu za přítomnosti signálu z vnějšího nebo vnitřního prostředí (Brown *et al.*, 1995). V buňce se vyskytují dvě třídy anti-sigma faktorů. Jsou to cytoplazmatické anti-sigma faktory a anti-sigma faktory s vnitřní vazbou na membránu (Treviño-Quintanilla *et al.*, 2013). Cytoplazmatické anti-sigma faktory jsou regulovány např. fosforylací a ostatními vnitřními regulátory. Anti-sigma faktory, které jsou vázány na membránu, jsou aktivovány interakcí s extracytoplazmatickými proteiny nebo malými molekulami tzv. efektory (transmembránové regulátory) (Helmann, 1999). V reakci na stresové podněty je spuštěna kaskáda proteolytických dějů, která vede k vyvázání anti-sigma faktoru z komplexu anti-sigma+SF a anti-sigma faktor je následně degradován prostřednictvím proteolytických enzymů. Poté se uvolněný SF váže do jádra RNA

polymerasy a vyvolává stresovou odpověď transkripcí dependentních genů účastnících se reakce na daný stres.

Zapojují se i jiné regulační proteiny, které podporují využívání alternativních sigma faktorů místo vegetativního SigA (Österberg *et al.*, 2011). Také existují anti-anti-sigma faktory, které regulují aktivitu anti-sigma faktorů.

Těmito mechanismy se jednoduše zabrání transkripci prozatím nepotřebných genů nebo ve stresových situacích nevznikají produkty, které by zbytečně odebíraly energii, jež je potřeba, aby se buňka vyrovnala se stresem. Vazba anti-sigma faktoru na SF a uvolnění SF při stresovém signálu urychlují reakci na stres, protože SF se nemusí syntetizovat, ale stává se aktivním v okamžiku působení stresového signálu.

4. *Escherichia coli*

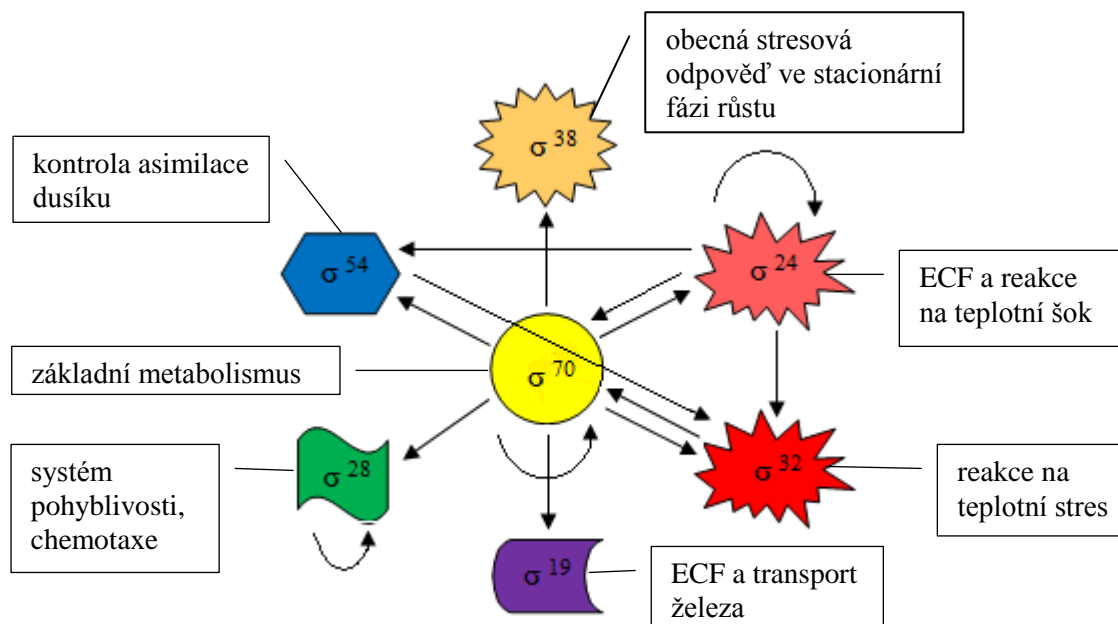
E. coli je bakteriální modelový organismus pro genové inženýrství, klinické studie i biotechnologii, proto je to nejlépe prostudovaný mikroorganismus. Také SF jsou nejlépe popsány právě u *E. coli*, a proto zde uvádím jejich vlastnosti pro porovnání s *C. glutamicum*.

Tento organismus je gramnegativní bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, do které patří i patogenní rody mikroorganismů. Disponuje fakultativně anaerobním metabolismem. Má tyčinkovitý tvar a je schopna pohybu za pomoci bičků.

E. coli se vyskytuje ve střevní mikroflóře teplokrevných živočichů, tedy i člověka. Lidskému organismu obvykle neškodí, je součástí přirozené střevní mikroflóry. Oproti *C. glutamicum* se odlišuje výskytem v těle organismů, což se projevuje i na zastoupení sigma faktorů.

4.1. Sigma faktory *E. coli*

U *E. coli* byl popsán hlavní sigma faktor σ^{70} , který rozpoznává promotorové oblasti většiny genů přepisovaných v exponenciální fázi růstu. V *E. coli* se vyskytují i alternativní SF, které aktivují expresi genů v důsledku reakce na různé podněty a podmínky prostředí (Maeda *et al.*, 2000). Je známo šest alternativních sigma faktorů, a to σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} , σ^{19} a σ^{54} (číslo značí molekulovou hmotnost v kDa, ale sigma faktory jsou někdy označovány i podle písmena z názvu příslušného genu). Faktory σ^{32} , σ^{24} patří ke skupině sigma faktorů s extracytoplazmatickou funkcí (ECF, 4. skupina dle Gruber a Gross, 2003). Sigma faktory vzájemně ovlivňují transkripci svých genů a tvoří tak regulační síť (obr. 3).



Obr. 3: Schéma regulační sítě sigma faktorů *Escherichia coli*. Šipky znázorňují, které sigma faktory ovlivňují transkripci genů pro jiné sigma faktory. Exprese genů *rpoD* (σ^{70}), *rpoE* (σ^{28}) a *rpoF* (σ^{24}) je řízena autoregulací (upraveno podle: Treviño-Quintanilla *et al.*, 2013).

4.1.1. Sigma faktor RpoD (σ^{70} , σ^D)

Transkripce genů nezbytných pro funkci organismu v exponenciální fázi růstu je zahajována z promotorů, které rozpoznává σ^{70} , kódovaný genem *rpoD*. Jsou to zejména geny pro replikaci DNA, příjem substrátu, biosyntézu buněčné stěny nebo produkci ribosomů (Maeda *et al.*, 2000). Zjistilo se, že anti-sigma faktor Rsd (Trevino-Quintanilla *et al.*, 2013) reguluje funkci σ^{70} ve stacionární fázi růstu. (Jishage a Ishihama, 1998). Promotorů řízených σ^{70} je znám již velký počet (přes 2000). Byla navržena konsensus sekvence σ^{70} -dependentního promotoru pro oblasti -10 (TATAAT) a -35 (TTGACA) (Browning *et al.*, 2004). U *C. glutamicum* příslušné funkce plní σ^A , ale oblast jejich vysoké podobnosti (80 %) zahrnuje méně než polovinu jejich aminokyselinových sekvencí (podle programu BLAST, dostupné z: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

4.1.2. Sigma faktor RpoS (σ^{38} , σ^S)

Sigma faktor σ^{38} , kódovaný genem *rpoS*, je aktivován v přechodné fázi z exponenciální do stacionární fáze růstu, řídí transkripci genů při hladovění a účastní se stresové odpovědi na stresové podněty jako např. oxidativní stres, změna osmolarity, kyselá pH, změna teploty. Ovlivňuje rychlost růstu v závislosti na živinách (Patten *et al.*, 2004).

U σ^{38} byla nalezena sekvenční homologie se σ^{70} (Gaal *et al.*, 2001). Za neoptimálních podmínek zastupuje roli σ^{70} , takže je schopen prepisovat i vegetativní geny. Bylo zjištěno, že až 10 % genů je pod přímou či nepřímou kontrolou σ^{38} (Typas *et al.*, 2006).

σ^{38} hraje významnou roli v regulační síti sigma faktorů (Weber *et al.*, 2005). Tento SF je hlavním regulátorem obecné stresové reakce, přičemž většinou dochází ke zpomalení růstu a buňka má udržovací metabolismus. Jistá podobnost funkcí se vyskytuje u sigma faktoru σ^B u *C. glutamicum*, který sdílí se σ^{38} asi 40% identitu (BLAST).

4.1.3. Sigma faktor RpoH (σ^{32} , σ^H)

Při tepelném šoku, ale také při oxidativním stresu je aktivní σ^{32} , kódovaný genem *rpoH* (Díaz-Acosta *et al.*, 2006) a patří mezi sigma faktory typu ECF. Buňka se díky tomuto SF vyrovnává s poškozením, které nastává působením extrémních podmínek (Koo *et al.*, 2009). Produkty genů aktivovaných σ^{32} jsou zejména chaperony, proteasy nebo enzymy pro opravu DNA (Díaz-Acosta *et al.*, 2006). Gen *rpoH* má vyšší úroveň exprese než další SF reagující na teplotní šok (σ^{24}), je hlavním sigma faktorem pro teplotní šok a jeho promotor je rozpoznáván dalšími SF (Dong *et al.*, 2010; obr. 3). Tento SF se svou funkcí podobá σ^H z *C. glutamicum*, ale jeho aminokyselinová sekvence má malou míru podobnosti. Shoduje se více se σ^A a σ^B z *C. glutamicum*, ale i tak pouze 30 % (BLAST).

4.1.4. Sigma faktor RpoF (σ^{28} , σ^F)

Když má bakterie nedostatek živin, aktivuje se σ^{28} , kódovaný genem *rpoF*. Je také odpovědný za přepis genů flagelárního systému. Ovlivňuje syntézu bičíku nebo chemotaxi a tím pohyblivost buňky (Arnosti a Chamberlin, 1989). *C. glutamicum* takový SF postrádá.

4.1.5. Sigma faktor RpoE (σ^{24} , σ^E)

Sigma faktor σ^{24} typu ECF, řídí stresovou odpověď v reakci na signály působící z vnějšku cytoplazmatické membrány (Egler *et al.*, 2005). Je kódován genem *rpoE* (Missiakas *et al.*, 1997). Podílí se na transkripci genů především při náhlých tepelných změnách a také při nahromadění nesprávně sbalených proteinů v periplazmatickém prostoru (Gibson *et al.*, 2010). Jeho funkce spočívá v expresi proteinů, které udržují integritu periplazmatické a vnější části membrány (Egler *et al.*, 2005). Zprostředkovává opětovný návrat membránových proteinů do správné konformace a podporuje syntézu stavebních jednotek buněčné stěny (Gibson *et al.*, 2010).

Regulaci σ^{24} zajišťuje integrální transmembránový protein RseA, který je anti-sigma faktorem σ^{24} (Ades, 1999). Funkčně je σ^{24} blízký σ^E z *C. glutamicum*, avšak jejich stupeň identity aminokyselinové sekvence je nízký (28 %) (BLAST).

4.1.6. Sigma faktor FecI (σ^{19} , σ^{FecI})

Sigma faktor σ^{19} , kódovaný genem *fecI*, je zapojen do transkripční regulace genů s extracytoplasmatickou funkcí. Transkript genu *fecI* byl poprvé popsán jako protein, který reguluje expresi genů podílejících se na systému dopravy citronanu železitého (Hussein *et al.*, 1981). Zjistilo se však, že citronan železitý zahajuje transdukci signálu pro přepis genu *fecI* a je tedy součástí signalizační kaskády, které se účastní tři proteiny postupující od povrchu buňky a pokračující do cytoplasmy (Enz *et al.*, 2003). Tento mechanismus se aktivuje při nedostatku železa v buňce (Mahren a Braun, 2003). Analogický SF se u *C. glutamicum* nevyskytuje.

4.1.7. Sigma faktor RpoN (σ^{54} , σ^{N})

Tento sigma faktor zastupuje zcela jinou třídu SF s výraznou sekvenční odlišností. Mechanismus jeho aktivace, oproti ostatním, vyžaduje aktivátor v podobě ATP (Bose *et al.*, 2008). Další ze zásadních odlišností je umístění promotorových motivů v oblasti -24 (GG) a -12 (TGC) (Buck *et al.*, 2000).

Sigma faktor σ^{54} , kódovaný genem *rpoN*, zahajuje transkripci rozpoznáním promotoru genů, které jsou zapojené do různých fyziologických procesů spojených s metabolismem dusíku včetně jeho fixace (Buck *et al.*, 2000). Sigma faktor tohoto typu nebyl u *C. glutamicum* nalezen (Pátek a Nešvera, 2011).

Tab. 1: Přehled sigma faktorů u *Escherichia coli* (Abee, 1999)

Sigma faktor	Gen	Funkce	-35 oblast promotoru ¹	-10 oblast promotoru ¹
σ^{70}	<i>rpoD</i>	základní metabolismus	TTGACA	TATAAT
σ^{54}	<i>rpoN</i>	kontrola asimilace dusíku	CTGGNAC	TTGCA
σ^{38}	<i>rpoS</i>	obecná stresová odpověď ve stacionární fázi růstu	CCGGCG	CTATACT
σ^{32}	<i>rpoH</i>	cytoplazmatický teplotní šok	CTTGAA	CCCCATNT
σ^{28}	<i>rpoF</i>	systém pohyblivosti, chemotaxe	CTAAA	GCCGATAA
σ^{24}	<i>rpoE</i>	ECF a teplotní šok	GAAGTT	TCTGAT
σ^{19}	<i>fecI</i>	ECF a transport železa	GAAAAT	TGTCCT

¹ Stupeň konzervovanosti jednotlivých nukleotidů v oblastech -35 a -10 promotorů rozeznávaných příslušným sigma faktorem zde není uveden, může se ale výrazně lišit.

5. *Corynebacterium glutamicum*

5.1. Historie

5.1.1. Objev producenta kyseliny L-glutamové

Mezi čtyři základní chutě, sladkou, slanou, kyselou a hořkou, které běžně rozeznáváme, byla zařazena pátá chuť pod názvem *umami* (překlad z japonštiny: chutný, delikátní). Tato chuť byla charakterizována jako chuť glutamátu, což je sůl kyseliny glutamové. L-glutamát je již dlouho oblíbeným ochucovadlem potravy v Asii a byl původně vyráběn extrakcí z rostlinných proteinů. V roce 1957 se japonským vědcům podařilo objevit přírodního producenta kyseliny L-glutamové (Kinoshita *et al.*, 1957), kterým je bakterie *Corynebacterium glutamicum*. Fermentační produkce L-glutamátu s použitím kultur *C. glutamicum* nahradila původní technologicky náročnou izolaci L-glutamové kyseliny z rostlinných proteinů. L-glutamovou kyselinu produkuje bakterie, při limitaci růstu biotinem (Cao *et al.*, 2014). Získaný glutamát je biotechnologicky zpracováván jako přísada do různých potravinových výrobků. V současné době je žádaným ochucovadlem po celém světě.

5.1.2. Pokroky ve výzkumu *C. glutamicum*

Brzy se ukázalo, že modifikované buňky *C. glutamicum* mohou produkovat i řadu dalších aminokyselin. V 50. – 80. letech 20. století se při šlechtění nových producentů aminokyselin uplatňovaly metody klasické genetiky, kterými jsou např. náhodná mutageneze nebo selekce. Roku 1983 byl poprvé zveřejněn postup izolace plazmidové DNA z *C. glutamicum* a vědci začali s experimenty konstrukce vektorů a následně genetickými přenosy, zejména transformací a konjugací. Tím byla zahájena éra genetického inženýrství u *C. glutamicum*.

S rozvojem metod molekulární biologie se mohla bakterie začít zkoumat na úrovni genomu. V roce 2000 byla stanovena úplná sekvence genomu bakterie *C. glutamicum* a začaly se rozvíjet metody na úrovni genomu: transkriptomika, proteomika a metabolomika. Po dokončení sekvence genomu došlo také k rozvoji genetických manipulací a hledání dalších možností využití této bakterie. Cílem bylo vytvořit takové kmeny, které by byly schopné zpracovávat jiné organické látky než běžné zdroje uhlíku (Buschke *et al.*, 2013). Zkoumání bakterie *C. glutamicum* bylo zacíleno také na produkty, které by byly získávány ekonomicky výhodnou biotechnologií a dále na použití alternativních zdrojů jako substrátů pro výživu bakterie (Wieschalka *et al.*, 2012). Byl zahájen také výzkum, který by pomohl z hlediska ekologického, protože se zjistilo, že bakterie degradují aromatické sloučeniny (Woo *et al.*, 2014), tudíž by mohly být využity při degradaci xenobiotik a dalších organických látek.

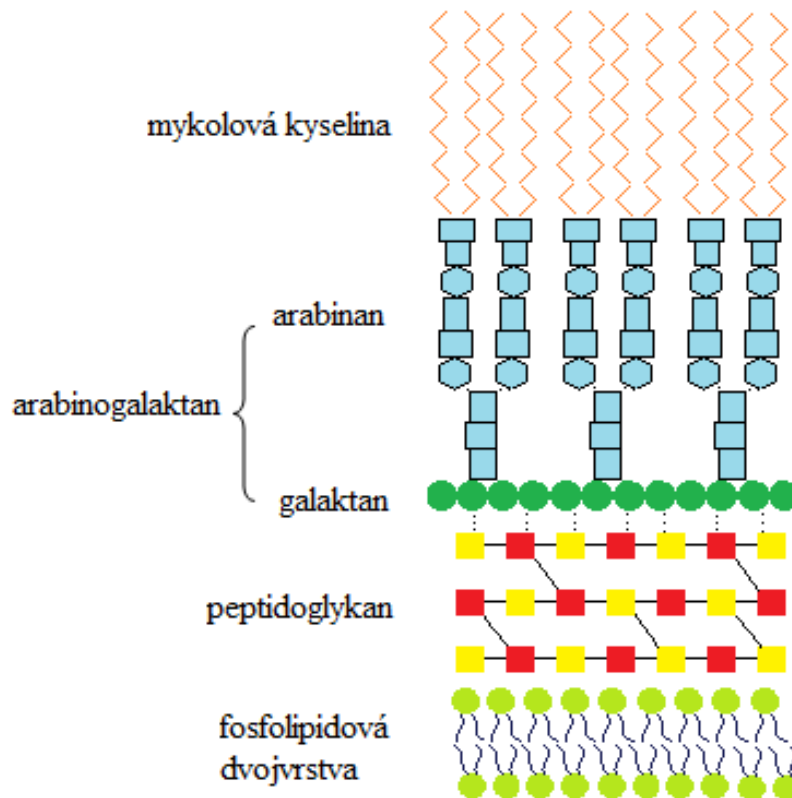
Techniky komplexního výzkumu, jako je sekvenování kompletního transkriptomu (Pfeifer-Sancar 2013), procházejí v současné době u *C. glutamicum* rychlým vývojem a poskytují obrovská množství dat a poznatků. Tento pokrok umožňuje zkoumat bakterie na úrovni různých regulačních sítí a odhalovat funkce, které byly dosud neznámé. Propojování regulačních sítí různého typu vede postupně ke komplexnímu popisu celého organismu, který je konečným cílem systémové biologie. Praktické použití aminokyselin bylo impulzem pro studium bakterie *C. glutamicum* a získané poznatky nyní umožňují stále širší uplatnění tohoto organismu v biotechnologii.

5.2. Charakteristika

Corynebacterium glutamicum je gram-pozitivní bakterie, která se vyskytuje v půdě. Je to organismus aerobní až fakultativně anaerobní, má tyčinkovitý tvar, tvoří nepravidelné shluky a není uzpůsoben k aktivnímu pohybu (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Náleží do kmene *Actinobacteria*, řád *Actinomycetales* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Tento řád zahrnuje také rody *Mycobacterium*, *Streptomyces* a *Rhodococcus*, které jsou rovněž zajímavými, intenzivně studovanými a průmyslově využitelnými organismy. Mykobakterie jsou zkoumány kvůli jejich patogenitě a streptomycety jsou významní producenti antibiotik (Kirby *et al.*, 1975). Některé druhy korynebakterií jsou také nebezpečné zvířecí nebo i lidské, patogeny. *C. glutamicum* je nepatogenní druh, který je označován jako GRAS (*generally recognized as safe*, obecně uznán jako bezpečný). Je proto vhodným organismem pro výrobu produktů pro potravinářské, medicínské a krmivářské využití. V biotechnologii se uplatňuje i pro snadnou kultivaci a vlastnosti výhodné pro laboratorní práci (Wieschalka *et al.*, 2012).

Corynebacterium glutamicum se vyznačuje stavbou buněčné stěny typickou pro členy skupiny *Mycolata* (obr. 4) obsahující mykolové kyseliny, které tvoří silnou ochrannou bariéru před nežádoucími či toxickými látkami (Alderwick *et al.*, 2007, Puech *et al.*, 2001). Buněčná stěna je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, který je kovalentně spojen s arabinogalaktanem a také obsahuje mykolové kyseliny, které tvoří vnější, poměrně hydrofobní vrstvu a mají velmi dlouhý řetězec, u *Corynebacterium* 20-60 uhlíků, u *Mycobacterium* 60-90 uhlíků (Burkovski *et al.*, 2013).



Obr. 4: Schéma buněčné stěny bakterií skupiny *Mycolata*. Obrázek představuje buněčnou stěnu s obsahem mykolových kyselin, které jsou typické pro rody *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia* nebo *Rhodococcus*. Bakterie, obsahující tento zvláštní typ buněčné stěny s komplexem rozvětvených mastných hydroxykyselin, které mohou obsahovat i funkční skupiny např. keto-, methoxy-, esterové skupiny či cyklopropanový kruh, se řadí mezi grampozitivní bakterie (Minnikin *et al.*, 1984). Gramovým barvením je však nelze obarvit. Používá se Ziehl-Neelsenovo acidobazické barvení. Je značně odlišná od buněčné stěny grampozitivních bakterií, která je tvořena pouze silnou vrstvou peptidoglykanu. Přítomností vnitřní a vnější vrstvy a prostorem analogickým periplazmatickému prostoru připomíná buněčnou stěnu gramnegativních bakterií.

U typového kmene *C. glutamicum* ATCC13032 byla určena a analyzována kompletní sekvence genomu, což umožnilo lépe porozumět molekulární biologii a fyziologii tohoto organismu. Bakterie obsahuje jeden kruhový chromozom o velikosti 3,28 Mbp (Kalinowski *et al.*, 2003). Anotace genomu a později i sekvenování transkriptomu (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013) přispěly také k lokalizaci mnoha promotorů.

C. glutamicum se v biotechnologii uplatňuje zvláště při produkci aminokyselin, zejména L-glutamátu a L-lysinu (Ohnishi *et al.*, 2002). V laboratořích byly dále vyvinuty kmeny, které produkují i další aminokyseliny, např. L-valin (Blombach *et al.*, 2007; Holátko *et al.*, 2009), L-leucin, L-alanin nebo kyselinu L-asparagovou (Park *et al.*, 2010). Dalšími biotechnologickými produkty jsou vitamíny, např. pantothenát (Hüser *et al.*, 2005), ethanol (Inui *et al.*, 2004) nebo kadaverin (Becker *et al.*, 2012). Zjistilo se, že za nedostatku kyslíku

buňka sice zpomaluje růst, ale je schopna využít organické látky procesem fermentace. Degradací uhlíkatých sloučenin, jako jsou např. glukosa, sacharosa či acetát, vznikají produkty jako pyruvát, laktát, sukcinát, 2-ketoglutarát nebo 2-ketoisovalerát (Wieschalka *et al.*, 2012). Produkty *C. glutamicum* mají rozsáhlé využití ve farmaceutickém, kosmetickém nebo potravinářském průmyslu a získávání těchto produktů z bakterie je žádoucí také z ekonomických důvodů. Bakterie *C. glutamicum* je významná i z ekologického hlediska pro svou schopnost degradace aromatických sloučenin např. fenolu či katecholu (Woo *et al.*, 2014). V posledních letech se usiluje o modifikaci bakteriálního kmene, který by utilizoval další organické látky jako glycerol nebo takové substráty, které patří mezi alternativní zdroje, např. celulóza, celobiosa a škrob (Buschke *et al.*, 2013).

Zájem o studium *C. glutamicum* je stále udržován z důvodů biotechnologických, ale také proto, že se tato bakterie stala modelovým organismem pro jiné korynebakterie i další druhy aktinomycet (Vertes *et al.*, 2005). Mezi tyto příbuzné druhy, které jsou významné z hlediska medicínského, patří *C. diphtheriae* nebo *M. tuberculosis*. Pracuje se na vytvoření rekombinantních kmenů, s modifikovaným metabolismem, pro získání vyššího výnosu žádaných metabolických produktů. Tohoto lze mimo jiné dosáhnout zmenšením genomu, odstraněním genů, které nejsou nutné k životu buňky v laboratorních podmínkách (Uthan *et al.*, 2015).

5.3. Sigma faktory *C. glutamicum*

Chromosom *C. glutamicum* nese sedm genů kódujících SF: σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M (Pátek a Nešvera, 2011). Do první skupiny sigma faktorů (Gruber a Gross, 2003; obr. 2) patří u *C. glutamicum* σ^A , který je primárním sigma faktorem pro transkripci genů označovaných jako vegetativní geny (*housekeeping genes*). Druhou skupinu zastupuje u *C. glutamicum* σ^B , který je sekvenčně podobný primárnímu sigma faktoru. Je hlavním regulátorem stresových reakcí ve stacionární fázi (Ehira *et al.*, 2008). Ostatní alternativní SF u této bakterie (σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M) se od prvních dvou skupin liší jak v počtu domén (obr. 2), tak při řízení transkripce. Patří do čtvrté skupiny sigma faktorů. Tyto SF jsou ovlivňovány extracelulárními vjemy, mají tzv. extracytoplazmatickou funkci (ECF) a zajišťují ochranu před vnějšími vlivy, např. chrání před účinky, které by mohly narušit biosyntézu buněčné stěny a jsou důležité pro transportní funkce (Gruber a Gross, 2003). Promotory rozpoznávají sigma faktory σ^E , σ^H , σ^M mají velmi silně konzervovány jádra oblastí -35 (GGAA) a -10 (GTT) jak u *C. glutamicum* tak u *M. tuberculosis*. U *C. glutamicum* neexistuje zástupce třetí skupiny sigma faktorů (Pátek a Nešvera, 2011).

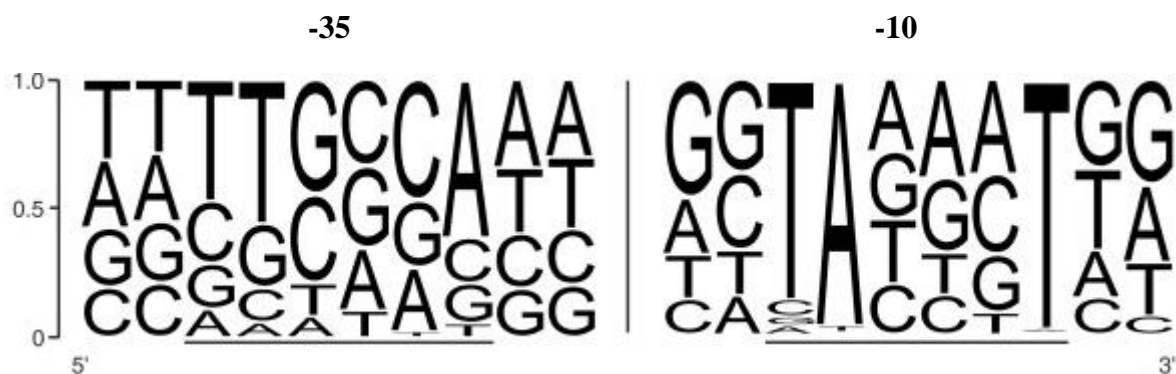
5.3.1. Sigma faktor SigA (σ^A)

Hlavním sigma faktorem u *C. glutamicum* je σ^A , jehož zásadní funkcí je řízení transkripce genů, které zajišťují všechny základní metabolické děje v buňce. Proto bývá σ^A označován jako vegetativní SF.

Gen *sigA* je vysoce exprimován v průběhu exponenciální fáze růstu, ale různé stresové faktory, jako je např. tepelný šok nebo stres z nedostatku určitých látek, vedou k regulaci transkripce genu *sigA*. Také při přechodu z exponenciální fáze do stacionární fáze růstu dochází ke snížení transkripce *sigA* (Larisch *et al.*, 2007). Když se buňka dostane do těchto nepříznivých nebo stresových podmínek, spouští se transkripce genů alternativních sigma faktorů. Tento esenciální gen nemůže být inaktivován, tudíž hlubší zkoumání a porovnávání závislosti funkce konkrétního promotoru na σ^A není snadné (Pátek a Nešvera, 2011).

Za promotory rozeznávány σ^A jsou většinou považovány ty promotory, které řídí transkripci genů aktivních v exponenciální fázi růstu. Tyto promotory byly u *C. glutamicum* zkoumány jako první. V první širší analýze promotorů vegetativních genů bylo lokalizováno 33 promotorů (Pátek *et al.*, 1996). Analýzou jejich sekvencí byly nalezeny oblasti -10 a -35, podobné těm, které byly nalezeny u *E. coli* (Browning *et al.*, 2004) a dalších bakterií -10 (TGNTATAATNG) (klíčový hexamer promotoru je podtržený) a -35 (TTGA/CCA). Tato definice konsensus sekvence předpokládaných promotorů řízených σ^A se příliš nezměnila ani po analýze většího počtu těchto promotorů (Pátek a Nešvera, 2003).

Velký počet σ^A -dependentních promotorů byl definován pomocí sekvenování transkriptomu *C. glutamicum* (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Toto sekvenování s použitím nové vysokoúčinné technologie (*high-throughput*) odhalilo přes 2000 počátků transkripce, které odpovídaly poloze předpokládaných σ^A -dependentních promotorů (obr. 5) v oblasti -10 (TAnnnT) a -35 (ttgnca) (písmeno „n“ znamená, že na daném místě v promotorové oblasti byly nalezeny všechny typy nukleotidů a nelze jednoznačně určit, který z nich se vyskytuje s největší pravděpodobností, malé písmeno nukleotidu značí 40–70% pravděpodobnost výskytu a velké písmeno značí více než 70% pravděpodobnost výskytu).



Obr. 5: Frekvence výskytu jednotlivých nukleotidů v oblastech -35 a -10 u σ^A -dependentních promotorů *C. glutamicum*. Nukleotidy mají různou velikost písma, která odpovídá frekvenci výskytu daného nukleotidu v konkrétní pozici. Jsou zobrazeny rozšířené oblasti -35 a -10, podtržené jsou klíčové hexamery promotorů. Na základě této frekvence výskytu byla odvozena konsensus sekvence -10 (TAnnT) a -35 (ttgnca) (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

5.3.2. Sigma faktor SigB (σ^B)

Tento SF hraje významnou roli ve schopnosti buněk *C. glutamicum* přizpůsobit se různorodým změnám okolních podmínek. Je indukován např. při osmotickém nebo při oxidativním stresu. Jeho aktivita se projevuje i v reakci na látky jako je kyselina mléčná, různé soli a ethanol (Jakob *et al.*, 2007). Také je aktivní při chladovém a tepelném stresu (Barreiro *et al.*, 2013). Hladina transkriptu σ^B se také zvyšuje, když má buňka nedostatek kyslíku. Za těchto podmínek dochází k regulaci exprese genů, které ovlivňují metabolismus glukosy. Buňka produkuje mnoho organických kyselin a dosahuje zvýšené spotřeby glukosy (Ehira *et al.*, 2008). Transkripce genu *sigB* je tedy zvýšená při odpovědi na různorodý stres.

Za určitých podmínek σ^B v buňce převažuje a částečně nahrazuje funkci σ^A , vzhledem k tomu, že σ^B patří do druhé skupiny sigma faktorů, kam jsou zařazeny SF, které se nejvíce podobají faktoru σ^A . V malé míře se uplatňuje také v aerobní fázi exponenciálního růstu, tudíž je zodpovědný i za přepis vegetativních genů (Ehira *et al.*, 2008). Geny energetického metabolismu, které aktivuje σ^B v této fázi, jsou zapojeny do glykolýzy a pentosafosfátové dráhy. Ke zvýšené expresi genu *sigB* dochází však převážně při přechodu z exponenciální fáze do stacionární fáze růstu (Larisch *et al.*, 2007). σ^B může být nazýván záložním sigma faktorem pro nepříznivé podmínky, stres a pomalý růst ve stacionární fázi. V této funkční roli se σ^B *C. glutamicum* podobá σ^{38} z *E. coli*, který také zastává roli při ochraně před určitými stresy a nutričními nedostatky (Gaal *et al.*, 2001).

Bylo lokalizováno třináct σ^B -dependentních promotorů, obsahující sekvence v oblasti -10 promotoru, které jsou nerozeznatelné od konsensus sekvence σ^A -dependentních promotorů. Některé nukleotidy v -10 hexameru jsou značně konzervované, více než 80% (Pátek *et al.*,

2013). V oblasti -35 je míra konzervovanosti naopak velmi nízká. Zjistilo se, že promotor genu *sigB* je řízen sigma faktory σ^H (Ehira *et al.*, 2009) a σ^E (Pátek *et al.*, 2013).

5.3.3. Sigma faktor SigC (σ^C)

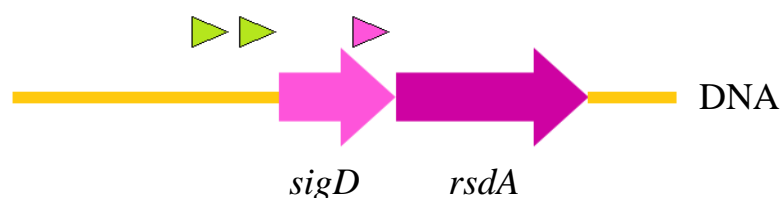
O tomto sigma faktoru prozatím víme pouze základní informace. Našel se kódující gen, takže jeho existence v genomu *C. glutamicum* byla prokázána, avšak dalším výzkumem se dosud nikdo nezabýval (Pátek a Nešvera, 2011).

5.3.4. Sigma faktor SigD (σ^D)

Předpokládá se, že σ^D je zapojen do transkripce genů, které pomáhají buňce adaptovat se na mikroaerobní prostředí (Ikeda *et al.*, 2009). Geny přepisované za účasti σ^D totiž kódují proteiny důležité pro přenos kyslíku a zlepšují tak proces buněčného dýchání. Díky aktivitě σ^D patrně vznikají také proteiny se schopností přenosu elektronů, které jsou potřebné pro metabolické reakce např. ferredoxin (Ikeda *et al.*, 2009).

Nejnovější poznatky ukazují, že gen *sigD* kódující tento SF a gen *rsdA*, který pravděpodobně kóduje příslušný anti-sigma faktor, tvoří operon a jsou přepisovány v jednom transkriptu (Dostálová *et al.*, 2015; obr. 6). Tento operon je přepisován z vegetativního promotoru. Operon ale obsahuje také interní promotor, ze kterého je přepisován pouze gen *rsdA*. Jeho sekvence se nepochybně podobá žádné sekvenci promotorů dosud popsáných u *C. glutamicum*. Výsledky nedávných experimentů prokazují, že transkripce genu *rsdA* je řízena σ^D -dependentním promotorem (Dostálová *et al.*, 2015; obr. 6). Uspořádání a řízení transkripce genů pro σ^D a pro příslušný anti-sigma faktor RsdA je tedy podobné jako u genů *sigH* a *rshA*, které řídí funkci σ^H (viz dále). Mechanismy regulace exprese genu pro σ^D ani funkce jím řízených genů nebyly dosud popsány. Promotor genu *rsdA* je zatím jediným známým

σ^D -dependentním promotorem se sekvenčními motivy v oblasti -35 (TGTAAC) a -10 (CTCGAT) (Dostálová *et al.*, 2015).



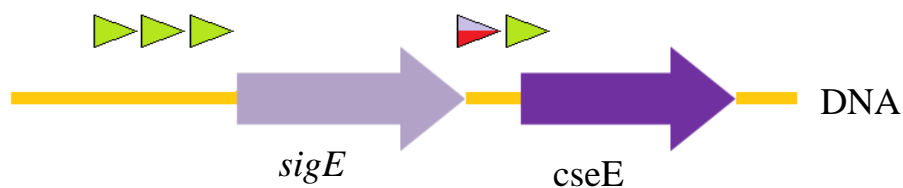
Obr. 6: Schéma operonu genů *sigD* a *rsdA*. Zelené trojúhelníky označují σ^A -dependentní promotory a růžový trojúhelník značí σ^D -dependentní promotor (upraveno podle: Dostálová *et al.*, 2015).

5.3.5. Sigma faktor SigE (σ^E)

Sigma faktor σ^E se účastní transkripce genů, díky kterým se buňka dokáže vyrovnat s povrchovým stresem nebo s tepelným a oxidativním stresem (Park *et al.*, 2008). Řadí se mezi sigma faktory typu ECF. Jeho aktivita se uplatňuje i v adaptaci buňky na vysokou koncentraci různých chemických látek např. kyseliny mléčné (Jakob *et al.*, 2007). Také byla prokázána zvýšená citlivost vůči SDS, lysozymu a EDTA v σ^E -deficientním kmeni (Park *et al.*, 2008), takže funkce σ^E přispívá k odolnosti k těmto látkám. σ^E spouští také expresi genů, které zabraňují průniku určitých látek přes buněčnou stěnu, a proto buňka není citlivá např. k antibiotikům, jako je penicilin nebo vankomycin. Ovlivňuje expresi genů potřebných při pomalém růstu, v důsledku nedostatku živin a minerálních látek, např. N nebo Mg (Park *et al.*, 2008).

Aktivitu σ^E ovlivňuje anti-sigma faktor CseE jako postranslační regulátor. Bylo prokázáno, že anti-sigma faktor CseE se může vázat na protein σ^E a tím ho inaktivovat. Protein CseE tedy působí jako typický anti-sigma faktor (Park *et al.*, 2008). Nedávné výsledky prokazují, že geny *sigE* a *cseE* jsou přepisovány v jednom transkriptu a tvoří operon (obr. 7), podobně jako je to u genů *sigH+rshA* a *sigD+rdsA* (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013, Dostálová *et al.*, 2015). Operon je přepisován ze tří promotorů, které jsou σ^A - nebo σ^B -dependentní. Operon také obsahuje interní promotory před genem *cseE*, které jsou σ^E -, σ^H - i σ^A -dependentní. Tímto uspořádáním je transkripce genu *sigE* opět analogická transkripční organizaci genů pro σ^H a σ^D .

Konsensus sekvence σ^E -dependentního promotoru v oblastech -35 (GGAAGT) a -10 (CGTT) se podobá σ^H - a σ^M -dependentním promotorům (Park *et al.*, 2008).



Obr. 7: Schéma operonu genů *sigE* a *cseE*. Zelené trojúhelníky označují σ^A -dependentní promotory a červeno-šedý trojúhelník značí σ^E - a σ^H -dependentní promotor (upraveno podle: Dostálová *et al.*, 2015).

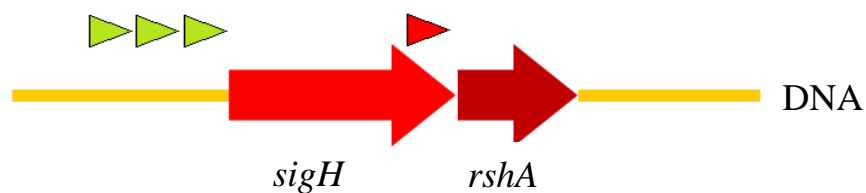
5.3.6. Sigma faktor SigH (σ^H)

Sigma faktor σ^H z *C. glutamicum* vykazuje strukturální charakteristiky sigma faktorů typu ECF, tudíž náleží také do čtvrté skupiny sigma faktorů (Kim *et al.*, 2005). Zjistilo se, že σ^H je produkován i v různých druzích bakterií, které tvoří spory (Schmid *et al.*, 2012).

σ^H je nezbytný pro přežití při vysoké teplotě, kdy po tepelném šoku spouští expresi genů pro ATP-dependentní proteasu Clp, chaperony a další regulátory odpovědi na tepelný šok. Bylo nalezeno 45 σ^H -dependentních promotorů (Busche *et al.*, 2012). Regulon σ^H obsahuje geny regulátorů stresové odpovědi ClgR (Engels *et al.*, 2004), WhcE (Kim *et al.*, 2005), HspR (Barreiro *et al.*, 2009), SufR (Ehira *et al.*, 2009), WhcA (Choi *et al.*, 2009) a dále geny pro reduktasy nebo dehydrogenasy (Busche *et al.*, 2012). Je také nepostradatelný při oxidativním stresu. Faktor σ^H je aktivní i při odpovědi na stresové podmínky na počátku stacionární fáze růstu (Kim *et al.*, 2005).

Sigma faktor σ^H u *C. glutamicum* je zapojen nejen do vlastní regulace (Kim *et al.*, 2005), ale také do transkripce genů pro σ^B (Ehira *et al.*, 2008) a σ^M (Nakunst *et al.*, 2007). Promotorová sekvence rozpoznávaná σ^H byla nalezena i u genu *sigA* (Toyoda, 2015). Tento stresový SF je tedy schopen nepřímou ovlivňovat i přepis vegetativních genů stejně jako u *E. coli*, kde σ^{32} ovlivňuje produkci σ^{70} . Předpokládá se, že promotory rozeznávané σ^H jsou rozeznávané dalšími SF, např. σ^M , i když jejich aktivita nedosahuje tak vysoké úrovně (Pátek a Nešvera, 2011). Usuzuje se, že σ^H zaujímá ústřední roli v regulační síti sigma faktorů a kontroluje jejich koordinované reakce na různé stresové podmínky. Tento SF je tedy potenciálním kandidátem na funkci globálního regulátoru transkripce. Dosud jediným definovaným globálním regulátorem u *C. glutamicum* je protein GlxR (Schröder a Tauch, 2010).

Gen *sigH* je přepisován ve společném transkriptu s genem pro anti-sigma faktor RshA. Operon obsahuje vegetativní promotor pro přepis *sigH* a interní σ^H -dependentní promotor před genem *rshA* (obr. 8). Regulace aktivity σ^H , ovlivněná anti-sigma faktorem RshA, nastává posttranslačně (Busche *et al.*, 2012).



Obr. 8: Schéma operonu genů *sigH* a *rshA*. Zelené trojúhelníky označují σ^A -dependentní promotory a červený trojúhelník značí σ^H -dependentní promotor (upraveno podle: Busche *et al.*, 2012 a Dostálová *et al.*, 2015).

Byla navržena konsensus sekvence promotorů rozpoznávaných faktorem σ^H pro oblasti -35 (GGGAAGA) a -10 (C/TGTTGAA) (Ehira *et al.*, 2009). Konzervovanost σ^H -dependentního promotoru genu *rshA* je značně vysoká i u jiných druhů rodu *Corynebacterium* (obr. 9).

	-35	-10
<i>C. glutamicum</i>	CATCGT GGAA GAAAAACAGCTCCGAGGAAT	GTT AAAGGAAGT
<i>C. efficiens</i>	CACCGT GGAA GAAAAACAGCTACGTGGGAT	GTT GAAGGAAGT
<i>C. glucuronolyticum</i>	CACAGG GGAA GAAAACAACTACGAAAGGC	GTT AAAGGAAGT
<i>C. lipophiloflavum</i>	CATCGG GGAA GAAAAACAGCTCCGCGTGTT	GTT GAAAGATGT
<i>C. matruchotii</i>	CACCGG GGAA GAAAAACAGTTGCGAGAAAAC	GTT AAAAGATGT
<i>C. diphtheriae</i>	CATCGT GGAA GAAAAACAGTTGCGTGAGGC	GTT GAAAGACGT
<i>C. kroppenstedtii</i>	CACCGC GGAA GAAAAAAGCTGCGGGAAGC	GTT AAAAGAAGT
<i>C. striatum</i>	CACCGT GGAA GAAAATTGCTACGCGTTGC	GTT GAAGGACGT
<i>C. pseudogenitalium</i>	CACCGG GGAA GAAAAATGCTCCGGAAGC	GTT GAAAGACGT
<i>C. ulcerans</i>	CATCGG GGAA GAAAACAACTCAGAGAAGC	GTT GAAAGACGT
<i>C. pseudotuberculosis</i>	CACCGG GGAA GAAAACAACTCAGAGAAGC	GTT GAAAGACGT
<i>C. aurimucosum</i>	CACCGC GGAA GAAAATTGCTTCGCGCGGC	GTT GAAGGACGT
<i>C. ammoniagenes</i>	CATAGG GGAA GAAAATTACTGCGAAAGGC	GTT GAAGGATGT
<i>C. accolens</i>	CACCGT GGAA GAAAAATGCTCCGCAAGGC	GTT GAAGGACGT
<i>C. tuberculostearicum</i>	CACCGG GGAA GAAAATTGCTCCGGAAGC	GTT GAAAGACGT

Obr. 9: Klíčové sekvence σ^H -dependentního promotoru genu *rshA* u různých druhů rodu *Corynebacterium*. Zvýrazněné sekvence v oblasti -35 a -10 se vyskytují ve všech těchto kmenech.

5.3.7. Sigma faktor SigM (σ^M)

Sigma faktor σ^M patří také do čtvrté skupiny mezi sigma faktory typu ECF. Přepisuje geny, které pomáhají buňce vyrovnat se s teplotním šokem nebo se účastní odpovědi na disulfidický a oxidativní stres. Součástí σ^M regulonu jsou klastry genů *suf*, které kódují Fe-S proteiny a *trx*, které kódují thioredoxin a thioredoxin reduktasy. U genů *suf* byl nalezen σ^A -dependentní promotor, z čehož vyplývá, že produkty tohoto genu jsou potřebné i v exponenciální fázi růstu. Do regulonu σ^M patří také geny pro chaperony.

Promotory genů, rozpoznávané σ^M , obsahují konsensus sekvenci, která je charakterizována hexamery -35 gGGAAT a -10 hexamer C/TGTTGA/G (Nakunst *et al.*, 2007). Téměř identickou promotorovou sekvenci rozpoznává i σ^H , tudíž RNAP+ σ^H a RNAP+ σ^M mohou rozpoznávat stejné promotory.

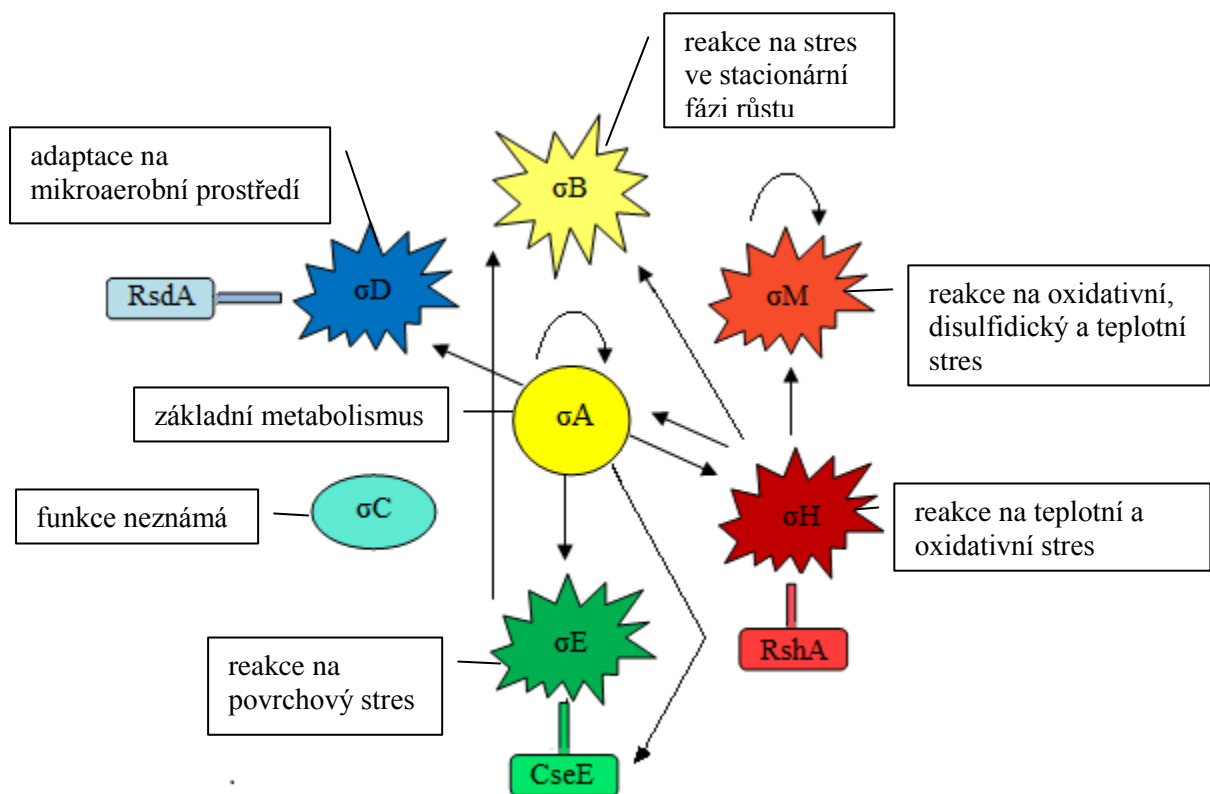
Tab. 2: Přehled sigma faktorů u *C. glutamicum*

Sigma faktor	Funkce	-35 oblast promotoru ¹	-10 oblast promotoru ¹
σ^A	základní metabolismus	TTGNCA ²	TANNNT ²
σ^B	záložní sigma faktor – stacionární fáze růstu	CGGCAA ³	TANAAT ³
σ^C	funkce není známa	sekvence není známá	sekvence není známá
σ^D	adaptace na mikroaerobní prostředí	TGTAAC ^{4,5}	CTCGAT ^{4,5}
σ^E	povrchový stres, teplotní šok, nutriční nedostatek	GGAAC ^{4,5}	CGTT ^{4,5}
σ^H	teplotní šok, oxidativní stres, potencionální globální regulátor	GGAATA ⁶	C/TGTTGAA ⁶
σ^M	změna teploty, oxidativní a disulfidický stres	GGAAT ⁷	C/TGTTGA/G ⁷

¹ Stupeň konzervovanosti jednotlivých nukleotidů v oblastech -35 a -10 promotorů rozeznávaných příslušným sigma faktorem zde není uveden, může se ale výrazně lišit; ² Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013; ³ Ehira *et al.*, 2008; ⁴ Sekvence oblastí -10 a -35 jediných známých promotorů řízených σ^D a σ^E ; ⁵ Dostálová *et al.*, 2015; ⁶ Ehira *et al.*, 2009; ⁷ Nakunst *et al.*, 2007

5.4. Regulační síť sigma faktorů *C. glutamicum*

Výzkum sigma faktorů *C. glutamicum* pomocí metod *in vitro* a *in vivo* umožnil základní pochopení vzájemné regulace jednotlivých sigma faktorů a anti-sigma faktorů, což umožnilo sestavení názorného schématu regulační sítě (obr. 10). Tento obrázek je vytvořen na základě současných publikovaných i nepublikovaných výsledků (Pátek, nepublikováno) a představuje velmi zjednodušené základní schéma regulační sítě sigma faktorů. Do regulace transkripce a dalších mechanismů řízení funkce sigma faktorů je pravděpodobně zapojena řada transkripčních regulátorů a dalších regulačních prvků (např. regulačních RNA).



Obr. 10: Schéma regulační sítě sigma faktorů *C. glutamicum*. Šipky znázorňují, které sigma faktory ovlivňují expresi genů pro ostatní sigma faktory. Anti-sigma faktory RsdA, RshA a CseE se vážou na příslušné sigma faktory a zajišťují posttranslační regulaci. Exprese genů pro σ^A a σ^M je částečně řízena autoregulací.

6. *Mycobacterium tuberculosis*

Rody *Mycobacterium* a *Corynebacterium* si jsou geneticky blízké. Navíc *Mycobacterium tuberculosis* je nejprobádanějším příbuzným druhem a názvy sigma faktorů u druhů rodu *Corynebacterium* jsou odvozeny právě od názvů sigma faktorů mykobakterií. Proto zde uvádím, pro porovnání, základní informace o sigma faktorech *M. tuberculosis*.

6.1. Charakteristika

Mezi rody *Mycobacterium* a *Corynebacterium* jsou rozdíly ve způsobu života, ale přesto se jisté funkce sigma faktorů podobají. Podstatný rozdíl spočívá v tom, že *M. tuberculosis* patří k patogenním mikroorganismům. Schopnost infekce a adaptační mechanismy vyžadují komplexní genetickou odpověď, a to pravděpodobně vede k tomu, že se u tohoto druhu uplatňuje větší počet sigma faktorů. U *M. tuberculosis* bylo rozpoznáno třináct sigma faktorů, které patří do fylogenetické skupiny σ^{70} . Genom *M. tuberculosis* je

největší z obligátních lidských intracelulárních patogenů, obsahuje mnoho regulačních proteinů a anti-sigma faktorů, tudíž regulace genové exprese je pravděpodobně mnohem složitější než u *C. glutamicum* (Rodrigue *et al.*, 2006).

6.2. Sigma faktory *M. tuberculosis*

Hlavní sigma faktor SigA (σ^A) pro přepis genů základního metabolismu bakterie představuje stejný typ vegetativního sigma faktoru jako σ^A u *C. glutamicum*. Byla určena konsensus sekvence promotorů rozpoznávaných σ^A u *M. tuberculosis* (Agarwal a Tyagi, 2006) v oblasti -35 (TTGACT) a -10 (TAGACT), která se podobá konsensus sekvenci σ^A -dependentních promotorů u *C. glutamicum* (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013) v oblasti -35 (TTGNCA) a -10 (TANNNT).

Sigma faktor SigB (σ^B) má obdobné funkce jako σ^B u *C. glutamicum*. Je zodpovědný za obecnou stresovou odpověď během působení stresových vlivů ve stacionární fázi růstu (Hu a Coates, 1999). Regulace transkripce genu *sigB* u *M. tuberculosis* (Raman *et al.*, 2001) je analogická k regulaci genu *sigB* u *C. glutamicum*, kde je tento gen přepisován z jednoho promotoru rozpoznávaného RNAP+ σ^H po tepelném šoku a RNAP+ σ^E při povrchovém stresu (Manganelli *et al.*, 2002). U *M. tuberculosis* je přepis genu *sigB* ovlivňován navíc RNAP+ σ^F a RNAP+ σ^I (Lee *et al.*, 2007).

U *M. tuberculosis* je sigma faktor SigD (σ^D), oproti σ^D u *C. glutamicum*, více prozkoumán. Jejich funkce však nejsou pravděpodobně stejné. σ^D u *M. tuberculosis* reaguje zejména na nutriční nedostatky. Produkty σ^D -dependentních genů se podílí také na optimálním růstu v počátku infekce, na správném sbalování proteinů, biosyntéze ATP, opravě DNA a účastní se bakteriální virulence (Raman *et al.*, 2004). Není tedy známa funkční podobnost, ale byla prokázána sekvenční podobnost σ^D -dependentních promotorů u těchto dvou bakteriálních druhů. Jediný analyzovaný σ^D -dependentní promotor genu pro anti-sigma faktor RsdA u *C. glutamicum* obsahuje hexamer v oblasti -35 (TGTAAC), který je totožný se sekvencí σ^D -dependentních promotorů v oblasti -35 u *M. tuberculosis* (Raman *et al.*, 2004). Anti-sigma faktor RsdA byl nalezen i u *M. tuberculosis*.

Gen pro σ^E je aktivován při povrchovém stresu, působením antibiotik, při oxidativním stresu nebo v reakci na teplotní šok. Podílí se na udržování integrity membránových kompartmentů (Manganelli *et al.*, 2001). Patří mezi sigma faktory typu ECF stejně jako σ^E u *C. glutamicum*. σ^E mykobakterií se oproti *C. glutamicum* účastní přepisu genů podílejících se na virulenci (Manganelli *et al.*, 2001). Sigma faktor σ^E je regulován anti-sigma faktorem RseA, který je přepisován ve společném transkriptu s genem pro σ^E (Dona *et al.*, 2008). U *C.*

glutamicum se gen pro anti-sigma faktor CseE také nachází ve stejném operonu jako gen pro σ^E . Rozdílem je, že u *M. tuberculosis* není před genem pro anti-sigma faktor σ^E -dependentní promotor, jako tomu je u *C. glutamicum*. Konsensus sekvence promotoru rozpoznávaného σ^E v oblasti -35 (GGAACY) je u *M. tuberculosis* velice podobná konsensus sekvenci promotoru σ^H v oblasti -35 (GGAAYA) a jádro oblasti -10 (cGTT) je u σ^E - i σ^H -dependentních promotorů totožné (Song *et al.*, 2008). Promotorové oblasti -35 a -10 σ^E - a σ^H -dependentních promotorů u *M. tuberculosis* se obecně podobají promotorovým oblastem rozpoznávaných σ^E , σ^H , σ^M u *C. glutamicum*.

Gen pro σ^H je u *M. tuberculosis* indukován po tepelném šoku nebo oxidativním stresu (Manganelli *et al.*, 2002), tudíž i u tohoto sigma faktoru se objevuje funkční analogie jako u *C. glutamicum*. Posttranslační regulaci aktivity σ^H zajišťuje anti-sigma faktor RshA (Song *et al.*, 2003), který je přepisován ve společném transkriptu s genem *sigH*, ale σ^H -dependentní promotor se nenachází před genem pro anti-sigma faktor, jako v případě genu *rshA* u *C. glutamicum*. Konsensus sekvence promotorů rozpoznávaných σ^H u *M. tuberculosis* v oblasti -35 (GGAAYA) a -10 (cGTT) (Raman *et al.*, 2001) se shodují se σ^H -dependentními promotory u *C. glutamicum*.

Sigma faktor σ^M hraje u *M. tuberculosis* roli ve stacionární fázi růstu zejména při teplotním šoku a také při oxidativním stresu. Uplatňuje se při dlouhodobé adaptaci na změny v prostředí (Agarwal *et al.*, 2006). Tento SF má sice podobné funkce jako σ^M u *C. glutamicum*, ale aminokyselinová sekvence je shodná pouze z 39 % (BLAST).

Sigma faktor σ^C u *M. tuberculosis* se pravděpodobně účastní zejména přepisu genů pro virulenci (Abdul-Majid *et al.*, 2008). Existence σ^C u *C. glutamicum* byla prokázána, ale prozatím nebyla zkoumána jeho funkce. Sekvenční podobnost σ^C *M. tuberculosis* a *C. glutamicum* je pouze 49 % (BLAST).

Ostatní sigma faktory *M. tuberculosis*, σ^F , σ^G , σ^I , σ^J , σ^K a σ^L nebyly u *C. glutamicum* nalezeny. Některé se účastní přepisu genů pro virulenci nebo slouží k regulaci exprese dalších genů, které se u *C. glutamicum* nevyskytují, z důvodu rozdílného životního prostředí.

7. Závěr

Bakterie *C. glutamicum* je významným producentem aminokyselin a v poslední době i řady dalších látek významných pro potravinářský, farmaceutický, kosmetický a chemický průmysl. Detailně popsaný genom, transkriptom i proteom *C. glutamicum*, velký počet popsaných regulátorů a dobrá znalost metabolismu činí z této bakterie modelový druh pro jiné korynebakterie a další příbuzné druhy ze skupiny *Mycolata*. Z těchto důvodů zájem o tuto bakterii, z biotechnologického i teoretického hlediska, neustále roste. Informace o sedmi sigma faktorech *C. glutamicum*, které patří do specifické skupiny regulátorů řídících, jako podjednotky RNA polymerasy, transkripci velkých skupin genů za specifických podmínek přispívají ke zlepšení znalosti metabolismu a fyziologie bakterie zvláště za podmínek působení různých stresových faktorů. Při studiu *C. glutamicum* byly charakterizovány vlastnosti jednotlivých sigma faktorů, podařilo se objevit některé geny, které patří do konkrétních regulonů, byly lokalizovány příslušné promotory a byla navržena konsensus sekvence jednotlivých tříd promotorů. Poznatky o některých sigma faktorech, např. σC a σD jsou však zatím minimální. Vytvoření modelu základní regulační sítě řízené sigma faktory a znalost konsensus sekvencí specifických promotorů přispívají ke komplexnímu popisu tohoto organismu, a také k možnostem účelné mutagenese promotorů a modulace genové exprese, což lze uplatnit v biotechnologických aplikacích.

U modelového organismu *E. coli* v porovnání s *C. glutamicum*, je sice přítomen stejný počet sigma faktorů jako u *C. glutamicum*, ale některé funkce sigma faktorů se zásadně liší. Hlavním důvodem těchto odlišností je pravděpodobně prostředí, ve kterém se bakterie vyskytuje, a tím i odlišný životní styl, který ovlivňuje zastoupení jednotlivých typů sigma faktorů, reagujících na rozdílné stresové odpovědi nebo zajišťujících odlišné funkce.

Bakterie *M. tuberculosis*, která je vzhledem k *C. glutamicum* nejlépe prozkoumaným zástupcem geneticky nejbližšího rodu, se liší větším genomem (4,4 vs. 3,3 Mbp), v zastoupení počtu sigma faktorů (13 vs. 7), a také v množství regulačních genů. Vysoký počet sigma faktorů a dalších transkripčních regulátorů souvisí pravděpodobně se skutečností, že *M. tuberculosis* je patogenní organismus, který se vyrovnává s hostitelským prostředím, v němž dochází ke složitým interakcím. Odlišné, ale i podobné vlastnosti a funkce sigma faktorů u různých druhů bakterií, jsou dokladem toho, že evoluce bakterií je doprovázena divergencí sekvencí i funkcí genů, která vytváří mnohotvárnost v bakteriálních druzích. Studium regulačních mechanismů sigma faktorů posouvá výzkum od základních znalostí funkcí bakteriálního metabolismu ke komplexnímu poznání, které je cílem systémové biologie, a které umožní využívat bakterie jako *C. glutamicum* se zvýšenou produkční schopností v biotechnologických procesech.

Seznam zkratek

A – adenin

ATP – adenosin trifosfát

C - cytosin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECF – sigma faktor s extracytoplazmatickou funkcí (*extracytoplazmatic function*)

EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

G – guanin

GRAS - obecně uznán jako bezpečný (*generally recognized as safe*)

kDa – kilodalton

Mbp – mega páry bází (*mega base pair*)

RNA – ribonukleová kyselina

RNAP – RNA polymerasa

SDS – dodecylsíran sodný (*sodium dodecyl sulfate*)

SF – sigma faktor

T - thymin

Seznam použité literatury

- Abdul-Majid, K. -B.; Ly, L. H.; Converse, P. J.; Geiman, D. E.; McMurray, D. N.; Bishai, W. R. (2008) Altered cellular infiltration and cytokine levels during early *Mycobacterium tuberculosis* sigC mutant infection are associated with late-stage disease attenuation and milder immunopathology in mice. *BMC Microbiology*, 8, 151.
- Abee, T. (1999) Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 65-91.
- Ades, S. E.; Connolly, L. E.; Alba, B. M.; Gross, C. A. (1999) The *Escherichia coli* sigma E-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes*, 13, 2449-2461.
- Agarwal, N.; Tyagi, A. K. (2006) Mycobacterial transcriptional signals: requirements for recognition by RNA polymerase and optimal transcriptional activity. *Nucleic Acids Research*, 34, 4245-4257.
- Agarwal, N.; Woolwine, S. C.; Tyagi, S.; Bishai, W. R.; Shukla, J. K.; Gopal, B. (2006) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor SigM by assessment of virulence and identification of SigM-dependent genes. *Infection and Immunity*, 75, 452-461.
- Alderwick, L. J.; Seidel, M.; Birch, H. L.; Sahm, H.; Eggeling, L.; Besra, G. S. (2007) Identification of a novel arabinofuranosyltransferase AftB involved in a terminal step of cell wall arabinan biosynthesis in *Corynebacteriaceae*, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 14729-14740.
- Arnosti, D. N. a M. J. Chamberlin. (1989) Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 830-834.
- Barreiro, C.; Nakunst, D.; Huser, A. T.; Paz, H. D.; Kalinowski, J.; Martin, J. F. (2013) Microarray studies reveal a 'differential response' to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 159, 1218-1218.
- Becker, J.; Wittmann, C.; Becker, J.; Kind, S.; Wittmann, C. (2012) Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 151-191.
- Blombach, B.; Schreiner, M. E.; Holatko, J.; Bartek, T.; Oldiges, M.; Eikmanns, B. J. (2007) L-Valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2079-2084.
- Bose, D.; Pape, T.; Burrows, P. C.; Rappas, M.; Wigneshweraraj, S. R.; Buck, M.; Zhang, X.; Dutnall, R. (2008) Organization of an activator-bound RNA polymerase holoenzyme. *Molecular Cell*, 32, 337-346.
- Brown, K. L.; Hughes, K. T.; Paget, M. (1995) The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Molecular Microbiology*, 16, 1-7.
- Browning, D. F.; Busby, S. J. W.; Szybalski, W.; Dove, S. L.; Hochschild, A. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 297-310.
- Buck, M.; Gallegos, M. -T.; Studholme, D. J.; Guo, Y.; Gralla, J. D. (2000) The bacterial enhancer-dependent sigma 54 (sigma N) transcription factor. *Journal of Bacteriology*, 182, 4129-4136.

- Burkovski, A. (2013) Cell envelope of Corynebacteria: Structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiology*, 2013, 1-11.
- Busche, T.; Šilar, R.; Pičmanová, M.; Pátek, M.; Kalinowski, J. (2012) Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics*, 13, 445.
- Buschke, N.; Schäfer, R.; Becker, J.; Wittmann, C.; Chen, H.; Chen, H.; Agrimi, G.; Pisano, I.; Palmieri, L.; Cirino, P. C. (2013) Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications – Optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies: *Escherichia coli* as a Platform Organism. *Bioresource Technology*, 135, 591-604.
- Cao, Y.; Duan, Z.; Shi, Z. (2013) Effect of biotin on transcription levels of key enzymes and glutamate efflux in glutamate fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 461-468.
- Cramer, P. (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 89-97.
- Díaz-Acosta, A.; Sandoval, M. L.; Delgado-Olivares, L.; Membrillo-Hernández, J. (2006) Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology*, 185, 429-438.
- Dona, V.; Rodrigue, S.; Dainese, E.; Palu, G.; Gaudreau, L.; Manganelli, R.; Provvedi, R. (2008) Evidence of Complex Transcriptional, Translational, and Posttranslational Regulation of the Extracytoplasmic Function Sigma Factor E in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 190, 5963-5971.
- Dong, T.; Yu, R.; Schellhorn, H. (2010) Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 79, 375-386.
- Dostálová, H.; Busche, T.; Holátko, J.; Rucká, L.; Nešvera, J.; Kalinowski, J. and Pátek, M. (2015) In vitro and in vivo approaches to untangle the regulatory knots controlled by sigma factors of RNA polymerase in *Corynebacterium glutamicum*. *CeBiTec Symposium: Bioinformatics for Biotechnology and Biomedicine*, Abstract Book p. 60.
- Egler, M.; Grosse, C.; Grass, G.; Nies, D. H. (2005) Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187, 2297-2307.
- 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. *Journal of Bacteriology*, 191, 2964-2972.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5146-5152.
- Enz, S.; Mahren, S.; Menzel, C.; Braun, V. (2003) Analysis of the ferric citrate transport gene promoter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185, 2387-2391.
- Farewell, A.; Kvint, K.; Nyström, T. (1998) Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Molecular Microbiology*, 29, 1039-1051.
- Feklistov, A.; Darst, S. A. (2011) Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase σ subunit. *Cell*, 147, 1257-1269.

- Gaal, T.; Ross, W.; Estrem, S. T.; Nguyen, L. H.; Burgess R. R.; Gourse R. L. (2001) Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Molecular Microbiology*, 42, 939-954.
- Gibson, J. L.; Lombardo, M.-J.; Thornton, P. C.; Hu, K. H.; Galhardo, R. S.; Beadle, B.; Habib, A.; Magner, D. B.; Frost, L. S.; Herman, C.; Hastings, P. J.; Rosenberg, S. M. (2010) The σ^E stress response is required for stress-induced mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 77, 415-430.
- Gruber, T. M.; Gross, C. A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, 57, 441-466.
- Helmann, J. D. (1999) Anti-sigma factors. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 135-141.
- Holátko, J.; Elišáková, V.; Prouza, M.; Sobotka, M.; Nešvera, J.; Pátek, M.; Wittmann, C.; Figge, R. M. (2009) Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *Journal of Biotechnology*, 139, 163-193.
- Hu, J. M.; Coates, A. R. M. (1999) Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 181, 469-476.
- Hüser, A. T.; Chassagnole, C.; Lindley, N. D.; Merkamm, M.; Guyonvarch, A.; Elisakova, V.; Patek, M.; Kalinowski, J.; Brune, I.; Puhler, A.; Tauch, A. (2005) Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3255-3268.
- Hussein, S.; Hantke, K.; Braun, V. (1981) Citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K-12. *European Journal of Biochemistry*, 117, 431-437.
- 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 Microbiology Letters*, 290, 32-38.
- Ikeda, M.; Baba M.; Tsukamoto, N.; Komatsu T.; Mitsuhashi S.; Takeno S. (2009) Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 2806-2808.
- Inui, M.; Kawaguchi, H.; Murakami, S.; Vertès, A. A.; Yukawa, H. (2004) Metabolic engineering of *iCorynebacterium glutamicum/i* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 8, 243-254.
- Iyer, L. M.; Aravind, L. (2012) Insights from the architecture of the bacterial transcription apparatus. *Journal of Structural Biology*, 179, 299-319.
- 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. *Journal of Bacteriology*, 189.
- Jishage, M.; Ishihama, A. (1998) A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major subunit of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 4953-4958.
- 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. *Journal of Biotechnology*, 104, 5-25.

Kim, T-H.; Kim, H-J.; Park, J-S.; Kim, Y.; Kim, P.; Lee, H-S. (2005) Functional analysis of sigH expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 1542-1547.

Kinoshita, S.; Udaka, S.; Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*, 3, 193-205.

Koo, B-M.; Rhodius, V. A.; Campbell, E. A.; Gross, C. A. (2009) Dissection of recognition determinants of *Escherichia coli* σ 32 suggests a composite -10 region with an 'extended -10' motif and a core -10 element. *Molecular Microbiology*, 72, 815-829.

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-H.; Karakousis, P. C.; Bishai, W. R. (2007) Roles of SigB and SigF in the *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor network. *Journal of Bacteriology*, 190, 699-707.

Maeda, H.; Nobuyuki, F.; Ishihama J. (2000) Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 28, 3497-3503.

Mahren, S.; Braun, V. (2003) The FecI extracytoplasmic-function sigma factor of *Escherichia coli* interacts with the beta' subunit of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*, 185, 1796-1802.

Manganelli, R.; Voskuil, M. I.; Schoolnik, G. K.; Dubnau, E.; Gomez, M.; Smith, I. (2002) Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigmaH in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Molecular Microbiology*, 45, 365-374.

Manganelli, R.; Voskuil, M. I.; Schoolnik, G. K.; Smith, I. (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor σ E: role in global gene expression and survival in macrophages. *Molecular Microbiology*, 41, 423-437.

Mauri, M.; Klumpp, S. (2014) A model for sigma factor competition in bacterial cells. *PLoS Computational Biology*, 10.

Minnikin, D. E.; Minnikin, S. M.; Parlett, J. H.; Goodfellow, M.; Magnusson, M. (1984) Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. *Archives of Microbiology*, 139, 225-231.

Missiakas, D.; Mayer, M. P.; Lemaire, M.; Georgopoulos, C.; Raina, S. (1997) Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Molecular Microbiology*, 24, 355-371.

Murakami, K. S.; Dutnall, R.; Weber, P. C. (2002) Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, 296, 1285-1290.

Nakunst, D.; Larisch, C.; Hüser, A. T.; Tauch, A.; Puhler, 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. *Journal of Bacteriology*, 189, 4696-4707.

- Nešvera, J.; Pátek, M.; Holátko, J. (2012) Analysis of *Corynebacterium glutamicum* promoters and their applications. *Subcell Biochemistry*, 64, 203-221.
- Nonaka, G.; Raivio, T.; Hengge, R. (2006) Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ_{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes*, 20, 1776-1789.
- Ohnishi, J.; Mitsuhashi, S.; Hayashi, M. (2002) A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 217-223.
- Österberg, S.; Peso-Santos, T. del; Shingler, V. (2011) Regulation of alternative sigma factor use. *Annual Review of Microbiology*, 65, 37-55.
- Park, J. H.; Lee, S. Y. (2010) Metabolic pathways and fermentative production of L-aspartate family amino acids. *Biotechnology Journal*, 5, 560-577.
- Park, S-D.; Youn, J-W.; Kim, Y-J.; Lee, S-M.; Kim, Y.; Lee, H-S. (2008) *Corynebacterium glutamicum* E is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE. *Microbiology*, 154, 915-923.
- Pátek, M.; Eikmanns, B. J.; Patek, J.; Sahn, H.; Vertès, A. A.; Inui, M.; Yukawa, H. (1996) Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology*, 142, 1-49.
- Pátek, M.; Holátko, J.; Busche, T.; Kalinowski, J.; Nešvera, J. (2013) *Corynebacterium glutamicum* promoters: a practical approach. *Microbial Biotechnology*, 6, 103-117.
- Pátek, M.; Nešvera, J. (2011) Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 154, 51-88.
- Pátek, M.; Nešvera, J.; Guyonvarch, A.; Reyes, O.; Leblon, G. (2003) Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of biotechnology*, 104, 311-323.
- Patten, C. L.; Kirchhof, M. G.; Schertzberg, M. R.; Morton, R. A.; Schellhorn, H. E. (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Genetics and Genomics*, 272, 580-591.
- Pfeifer-Sancar, K.; Mentz, A.; Rückert, C.; Kalinowski, J.; V. F.; Polen, T. (2013) Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *BMC Genomics*, 14, 173-216.
- Puech, V.; Chami, M.; Lemassu, A.; Lanéelle M. A.; Schiffler, B.; Gounon, P.; Bayan, N.; Benz, R.; Daffé, M. (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology*, 147, 1365-82.
- Raman, S.; Hazra, R.; Dascher, C. C.; Husson, R. N. (2004) Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence. *Journal of Bacteriology*, 186, 6605-6616.
- Raman, S.; Puyang, X.; Cheng, T. -Y.; Young, D. C.; Moody, D. B.; Husson, R. N. (2006) *Mycobacterium tuberculosis* SigM positively regulates Esx secreted protein and nonribosomal peptide synthetase genes and down regulates virulence-associated surface lipid synthesis. *Journal of Bacteriology*, 188, 8460-8468.

- Raman, S.; Song, T.; Puyang, X.; Bardarov, S.; Jacobs, W. R.; Husson, R. N. (2001) The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 183, 6119-6125.
- Rodrigue, S.; Provvedi, R.; Jacques, P-É.; Gaudreau, L.; Manganelli, R. (2006) The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 926-941.
- Schröder, J.; Tauch, A. (2010) Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 685-738.
- Schmid, S.; Bevilacqua, C.; Coq, A-M. C-L. (2012) Alternative sigma factor sigmaH activates competence gene expression in *Lactobacillus sakei*. *BMC Microbiology*, 12, 32.
- Song, T.; Dove, S. L.; Lee, K. H.; Husson, R. N. (2003) RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. *Molecular Microbiology*, 50, 949-959.
- Song, T.; Song, S. -E.; Raman, S.; Anaya, M.; Husson, R. N. (2008) Critical role of a single position in the -35 element for promoter recognition by *Mycobacterium tuberculosis* SigE and SigH. *Journal of Bacteriology*, 190, 2227-2230.
- Stackebrandt, E.; Rainey, F. A.; Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 479-491.
- Treviño-Quintanilla, L.; Freyre-González, J.; Martínez-Flores, I. (2013) Anti-sigma factors in *E. coli*: common regulatory mechanisms controlling sigma factors availability. *Current Genomics*, 14, 378-387.
- Typas, A.; Hengge, R.; Dorman, C. (2006) Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigmas promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 59, 1037-1051.
- Unthan, S.; Baumgart, M.; Radek, A.; Herbst, M.; Siebert, D.; Brühl, N.; Bartsch, A.; Bott, M.; Wiechert, W.; Marin, K.; Hans, S.; Krämer, R.; Seibold, G.; Frunzke, J.; Kalinowski, J.; Rückert, C. (2014) Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum* – a top-down approach to identify and delete irrelevant gene clusters. *Biotechnology Journal*, 10, 290–301.
- Vertes, A. A.; Inui, M.; Yukawa, H. (2005) Manipulating *Corynebacteria*, from individual genes to chromosomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 279-305.
- Wade, J. T.; Roa, D. C.; Grainger, D. C.; Hurd, D.; Busby, S. J. W.; Struhl, K.; Nudler, E. (2006) Extensive functional overlap between σ factors in *Escherichia coli*. *Nature Structural*, 13, 806-814.
- Weber, H.; Polen, T.; Heuveling, J.; Wendisch, V. F.; Hengge, R. (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187, 1591-1603.
- Weiss, D. S.; Batut, J.; , K. E.; Keener, J.; Kustu, S. (1991) The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell*, 67, 155-167.
- Wieschalka, S.; Blombach, B.; Bott, M.; Eikmanns, B. J. (2012) Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Biotechnology*, 6, 87-102.

Woo, H. M.; Park, J. -B.; Suzuki, N.; Inui, M. (2014) Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 180, 89-105.

Internetové zdroje:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>

http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=cgb