

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Debora Kálalová

Doménová struktura a funkce primárních faktorů σ u bakterií

Domain structure and function of primary bacterial σ factors

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2017

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Liborovi Krásnému, Ph.D. a RNDr. Haně Šanderové, Ph.D. za jejich odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovali. Dále chci poděkovat ostatním členům Laboratoře mikrobiální genetiky a genové exprese za jejich vstřícnou pomoc a podněty pro mou práci.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou 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. 2017

Podpis

Abstrakt

Iniciace transkripce patří ke stěžejním krokům genové exprese. Přepis genetické informace z DNA do RNA zajišťuje vícepodjednotkový enzym RNA polymeráza (RNAP). Avšak samotná RNAP není schopná rozpoznat specifický promotor a iniciovat transkripci. K tomuto účelu slouží bakteriím protein zvaný faktor σ , který se na RNAP váže a spolu tvoří holoenzym RNAP.

V této práci popisuji mechanismus bakteriální transkripce a dále stavbu, funkci a regulaci faktorů σ . Zaměřuji se hlavně na primární faktory σ u dvou významných modelových druhů, a to u gramnegativní *Escherichia coli* a grampozitivního *Bacillus subtilis*. Popisuji je v kontextu s alternativními faktory σ a poukazuji na jejich vzájemné odlišnosti ve struktuře, funkci a regulaci.

Klíčová slova: RNA polymeráza, primární faktory σ , transkripce, bakterie, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

Abstract

Transcription initiation is one of the crucial steps of gene expression. A multisubunit enzyme RNA polymerase (RNAP) transcribes the genetic information from DNA to RNA. However, RNAP itself is unable to recognize a specific promoter and initiate transcription. For this purpose, bacteria have a protein called σ factor, which binds to RNAP and together form the RNAP holoenzyme.

In this thesis I describe the mechanism of bacterial transcription and the structure, function and regulation of σ factors. I focus mainly on the primary σ factors of two important model species, namely gramnegative *Escherichia coli* and grampositive *Bacillus subtilis*. I describe them in the context of alternative σ factors, and I point out their differences in structure, function and regulation.

Key words: RNA polymerase, primary σ factors, transcription, bacteria, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Transkripce..... | 2 |
| 2.1 RNA polymeráza (RNAP)..... | 2 |
| 2.2 Promotor..... | 5 |
| 2.3 Iniciační fáze transkripce..... | 6 |
| 2.4 Elongační fáze transkripce..... | 8 |
| 2.5 Terminační fáze transkripce..... | 9 |
| 3 Faktory σ..... | 10 |
| 3.1 Skupina σ^{70} | 11 |
| 3.1.1 Třída 1..... | 11 |
| 3.1.2 Třída 2..... | 13 |
| 3.1.3. Třída 3..... | 13 |
| 3.1.4. Třída 4..... | 13 |
| 3.2 Skupina σ^{54} | 16 |
| 4 Regulace faktorů σ..... | 17 |
| 4.1 Regulace faktory anti- σ | 18 |
| 4.1.1 Kaskáda RIP..... | 18 |
| 4.1.2 Volné faktory anti- σ | 19 |
| 4.1.3. Faktory anti-anti- σ | 20 |
| 4.2 Regulace primárních faktorů σ | 21 |
| 4.2.1. Regulace primárních faktorů σ pomocí proteinů AlgQ/Rsd..... | 21 |
| 4.2.2. Regulace primárních faktorů σ pomocí 6S RNA..... | 22 |
| 4.2.3. Regulace primárních faktorů σ molekulou ppGpp za pomoci proteinu DksA..... | 22 |
| 5 Závěr..... | 25 |
| 6 Použitá literatura..... | 26 |

1. Úvod

Různé faktory σ rozpoznávají rozdílné třídy promotorů. Díky tomu bakterie může regulovat, na jakých promotorech bude probíhat transkripce. Využívá to k přizpůsobení se rozličným životním podmínkám.

Faktory σ se dělí na dvě skupiny, σ^{70} a σ^{54} , které se vážou na rozdílné promotorové sekvence a mají odlišný mechanismus iniciace transkripce.

Skupina σ^{70} je dále dělena na 4 třídy. Liší se nejen ve své funkci, ale také svou sekvencí a doménovým složením. Mohou se skládat ze 2-4 domén, které mají vazebná místa sloužící k nasednutí na promotorovou sekvenci DNA.

Podle funkce se faktory σ dělí na primární (*housekeeping*) faktory σ , které odpovídají za transkripci z většiny promotorů potřebných při běžném růstu, a na alternativní faktory σ , které bakterie využívají v situacích, kdy se musí vypořádat se specifickými životními podmínkami, či chtějí podstoupit vývojovou změnu.

Významnou charakteristikou alternativních faktorů σ (oproti faktorům primárním) je absence autoinhibiční domény 1.1., která reguluje vazbu na RNAP. Tuto regulační funkci u nich zastupují faktory anti- σ .

Všechny faktory σ spolu navzájem kompetují o vazbu RNA polymerázy (RNAP). Schopnost navázat RNAP závisí na jejich afinitě k danému enzymu a koncentraci v roztoku. V této práci popisují několik způsobů, jak mohou určité faktory σ , které jsou v danou chvíli potřeba, navázat dostatečné množství RNAP a transkribovat geny pod jejich kontrolou.

2. Transkripce

Transkripce je součástí centrálního dogmatu molekulární biologie. Jako první krok genové exprese zajišťuje přepis DNA do RNA na základě komplementarity bází.

Celý proces se skládá ze tří fází. Začíná iniciační fází, následuje elongační fáze, a nakonec je celá transkripce ukončena terminační fází. V této kapitole popisují RNAP, promotor, a jednotlivé fáze transkripce.

2.1 RNA polymeráza (RNAP)

RNAP je enzym objevený a charakterizovaný v 70. letech 20. století (Hurwitz 2005). Celá struktura RNAP byla poprvé popsána u termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (Zhang *et al.* 1999).

Bakterie mají pouze jednu RNAP, která se skládá z pěti základních podjednotek. Jsou to podjednotky α , β , β' , a ω , které dohromady tvoří jádro enzymu (Murakami & Darst 2003). Molekulová hmotnost tohoto jádra činí u *E. coli* ~380 kDa (Borukhov & Nudler 2008).

Jádro RNAP (neboli *core*) je schopné elongace transkripce, nedokáže však rozeznat specifický promotor a začít tak promotorově specifickou transkripci. K tomu slouží nezávislá podjednotka σ , která se na RNAP váže a dohromady tvoří holoenzym RNAP. Samotné jádro je nicméně schopné nesespecificky interagovat s DNA (Barvík *et al.* 2017).

Na rozdíl od podjednotky σ , která je specifická pouze pro bakterie, podjednotky jádra enzymu najdeme u všech tří domén života (bakterií, eukaryot, i archeí). Funkci faktorů σ přebírají u eukaryotických organismů transkripční faktory.

Dohromady se podjednotky RNAP skládají do charakteristického tvaru krabího klepeta, který ohraničují podjednotky β a β' . Mezi nimi vede kanál o šířce 2,7 nm. Právě uvnitř tohoto kanálu se nachází aktivní místo enzymu s ionty Mg^{2+} a probíhá zde syntéza vlákna RNA (obrázek 1).

Podjednotka α , která se vždy nachází ve formě dimeru, má N-koncovou a C-koncovou doménu. N-koncové domény podjednotek α zajišťují kontakt s podjednotkami β a β' . Ty spolu drží pohromadě právě proto, že jsou na ně podjednotky α navázány (Zhang & Darst 1998, Wang *et al.* 1997). Mezi N-koncovou a C-koncovou doménou se nachází spojka, která umožňuje C-koncové doméně velkou pohyblivost.

C-koncová doména interaguje s *UP elementem* (pokud je přítomen), což je oblast bohatá na AT-páry nacházející se proti směru transkripce (neboli *upstream*) od promotoru. Tím výrazně zesiluje kontakt RNAP s promotorem (Ishihama 1992, Krásný *et al.* 2000).

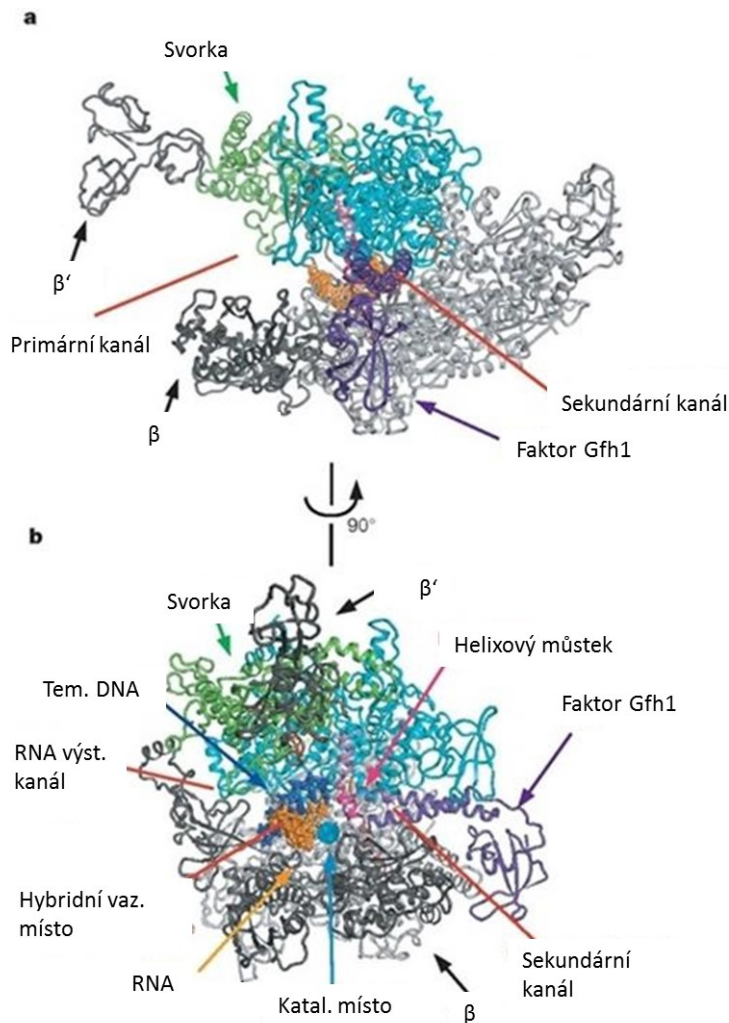
Nejmenší podjednotkou RNAP je ω , která je navázána na podjednotku β' (Murakami 2015). Nemá sice přímý vliv na transkripci, ale má několik pomocných funkcí. Působí jako pomocník při sbalování podjednotek RNAP (Ghosh *et al.* 2003) a má úlohu v regulaci transkripce za pomoci alarmonu (p)ppGpp (Guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát) při stringentní odpovědi. Tato úloha byla zatím potvrzena pouze v experimentech prováděných *in vitro* (Vrentas *et al.* 2008).

V grampozitivních bakteriích skupiny *Firmicutes*, jako například *B. subtilis*, můžeme najít specifické podjednotky δ a ϵ . Podjednotka δ napomáhá zvýšit specifitu vazby RNAP na promotor a také pomáhá při uvolnění RNAP v terminační fázi transkripce (Weiss & Shaw 2015). Dále je důležitá pro senzitivitu promotoru ke koncentraci iNTP (iniciační nukleosid trifosfát) a pro přežití buněk v kompetitivním prostředí (Rabatinová *et al.* 2013).

Gen pro podjednotku ϵ je v operonu s genem kódujícím RNÁzu J1. Předpokládá se, že by podobně jako tato RNÁza mohla mít podjednotka ϵ funkci v postranskripční regulaci a úpravách RNA (Linder *et al.* 2014). Také existuje hypotéza, že by vazba této podjednotky na RNAP mohla zajišťovat vyšší odolnost vůči bakteriofágům, které mají proteiny s tendencí vázat se na stejné místo a blokovat transkripci (Keller *et al.* 2014).

K podjednotkám jádra RNAP se připojuje nezávislý faktor σ , který má za úkol rozeznat specifickou sekvenci promotoru. Primární faktor σ u *E. coli*, zajišťující přepis esenciální sady genů, se nazývá faktor σ^{70} . Primární faktor u *B. subtilis* je nazýván faktor σ^A . O faktorech σ se podrobně rozepisují v dalších kapitolách své bakalářské práce.

Na enzymu RNAP se nachází tři hlavní kanály (obrázek 1) vedoucí mezi jednotlivými podjednotkami. Místo, na které se váže DNA:RNA hybrid, je takzvaný primární kanál. Sekundární kanál je místo, do kterého přichází substrát pro RNAP (iNTP). Substrát je tímto kanálem nasměřován do aktivního místa enzymu s ionty Mg^{2+} . Poslední je výstupní kanál pro RNA, kterým prochází nově syntetizované vlákno RNA (Borukhov *et al.* 2005).



Obrázek 1: RNAP s navázaným transkripčním inhibítorem Gfh1

Na obrázku je elongační komplex RNAP s navázaným Gfh1 u bakterie *Thermus thermophilus*. RNA je zde zobrazena jako oranžové vlákno, templátová DNA je značená světle modře, inhibiční faktor Gfh1 je tmavě modrý. Takzvaná svorka (*clamp*) je zobrazena zeleně, helixový můstek (*bridge helix*) růžově. Katalytické místo je značeno modrým bodem. Zbylé domény jsou šedivé. a) V tomto natočení je zobrazen primární a sekundární kanál. b) V tomto úhlu je zobrazen sekundární kanál a výstupní kanál pro RNA. Upraveno z (Tagami *et al.* 2010).

RNAP může být regulována malými molekulami (např. (p)ppGpp), nekódující RNA (např. 6S RNA), či čtenými transkripčními faktory. Regulace RNAP je pro svou důležitost v regulaci celé transkripce intenzivně studována a neustále jsou objevovány nové faktory, které se do tohoto procesu zapojují.

Například v naší laboratoři byl v posledních letech studován faktor HelD, který se váže na RNAP mezi sekundárním kanálem a podjednotkami α . Je to protein obsahující helikázové motivy, který je schopen hydrolyzovat ATP. Je silně exprimován během exponenciální fáze, a jeho koncentrace je ještě více zvýšena během fáze stacionární.

O tomto faktoru se toho ví zatím velmi málo. Nicméně bylo zjištěno, že spolupracuje s podjednotkou δ RNAP. Spolu s touto podjednotkou protein HelD po navázání na RNAP stimuluje transkripci (Wiedermannova *et al.* 2014).

2.2 Promotor

Promotor je specifická sekvence nacházející se proti směru transkripce (neboli *upstream*) od genu či operonu. Obsahuje hexamerní konzervované sekvence -10 a -35, případně může být přítomna i prodloužená oblast -10, *UP element*, či diskriminátor. Místo, kde začíná transkripce genu je označováno jako transkripční start a nachází se v pozici +1 (Keiltys & Rosenberg 1987). Příklady tzv. konsensus sekvencí jednotlivých oblastí, které jsou uvedené níže, jsou pro primární faktor σ^A u *Bacillus subtilis* a jsou to velmi silné sekvence, u kterých je velká afinita k holoenzymu RNAP.

Oblast 4.2 podjednotky σ interaguje s promotorovou oblastí -35. Tato oblast je tvořena hexamerem o sekvenci 5'-TTGACA-3' a sahá od pozice -35 do pozice -30.

Mezi oblastmi -35 a -10 se nachází mezerník (neboli *spacer*), který bývá dlouhý 17 – 19 pb (Ruff *et al.* 2015).

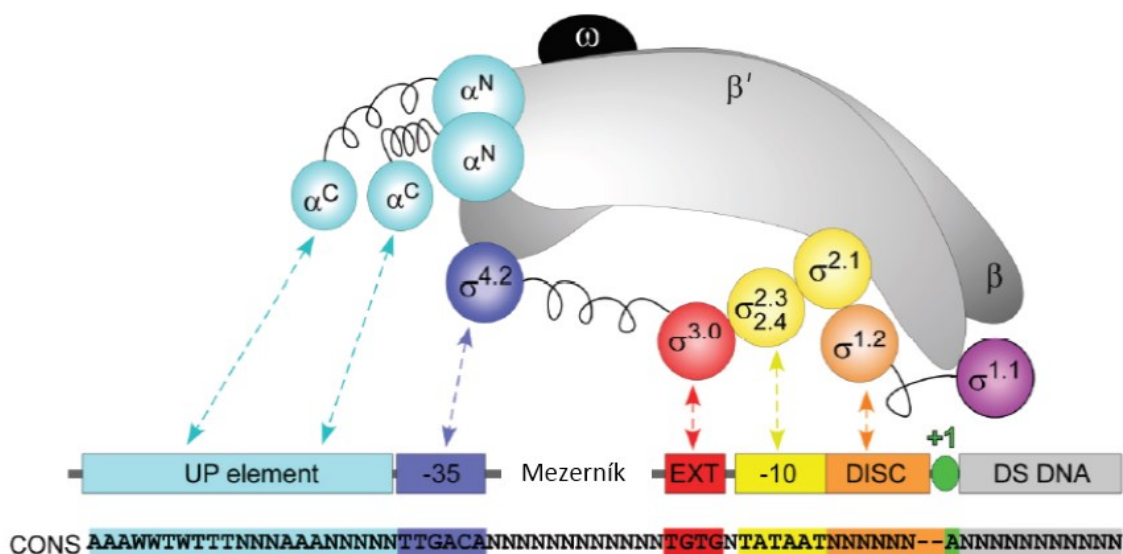
Sekvence -10 interaguje s oblastmi 2.3 a 2.4 podjednotky σ . Je to hexamer mající sekvenci 5'-TATAAT-3', která leží v pozici -12 až -7. Díky této sekvenci se oblast -10 nazývá také TATA box, nebo Pribnovův box.

Dále pak *UP element*, oblast bohatá na AT-páry, interaguje s C-koncovými doménami (CTD) podjednotek α RNAP. Tím může napomoci vazbě holoenzymu na promotor. Její délka je cca 20 bp a nachází se *upstream* od oblasti -35 (Haugen *et al.* 2008).

Rozšířená oblast -10 (tzv. *extended -10*) se nachází *upstream* od oblasti -10. Má ustálenou sekvenci 5'-TGX-3' a její délka nepřekračuje 4 bp. Interaguje s oblastí 3 podjednotky σ . (Barne *et al.* 1997).

Sekvence nacházející se mezi bázemi -10 a +1 (u *E.coli* byly tyto sekvence bohaté na GC-páry pojmenovány jako diskriminátor) váže oblast 1.2 podjednotky σ a může ovlivňovat stabilitu otevřeného komplexu. Tato funkce byla pozorována u promotorů pro rRNA, které mají kvůli slabé interakci s oblastí 1.2 velmi nestabilní otevřený komplex (Pemberton *et al.* 2000).

Promotory mezi sebou kompetují o vazbu holoenzymu RNAP. Rozhodující pro jejich afinitu je sekvence daného promotoru. Model sekvence promotoru a jeho interakce s faktorem σ je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2: Model holoenzymu RNAP a jeho interakce s promotorem

Sekvence CONS znázorňuje optimální konsensus sekvenci promotoru. *UP element* je označen světle modrou barvou, sekvence -35 tmavě modrou barvou, rozšířená oblast -10 je zvýrazněná červenou, oblast -10 žlutou, a diskriminátor oranžovou barvou. Domény faktoru σ jsou značeny stejnou barvou jako promotorová sekvence, na kterou se vážou. Doména 1.1 má fialovou barvu a transkripční počátek na pozici $+1$ má zelenou barvu. Oblast, která je transkribována, je ponechána šedivě. Upraveno z (Ruff *et al.* 2015).

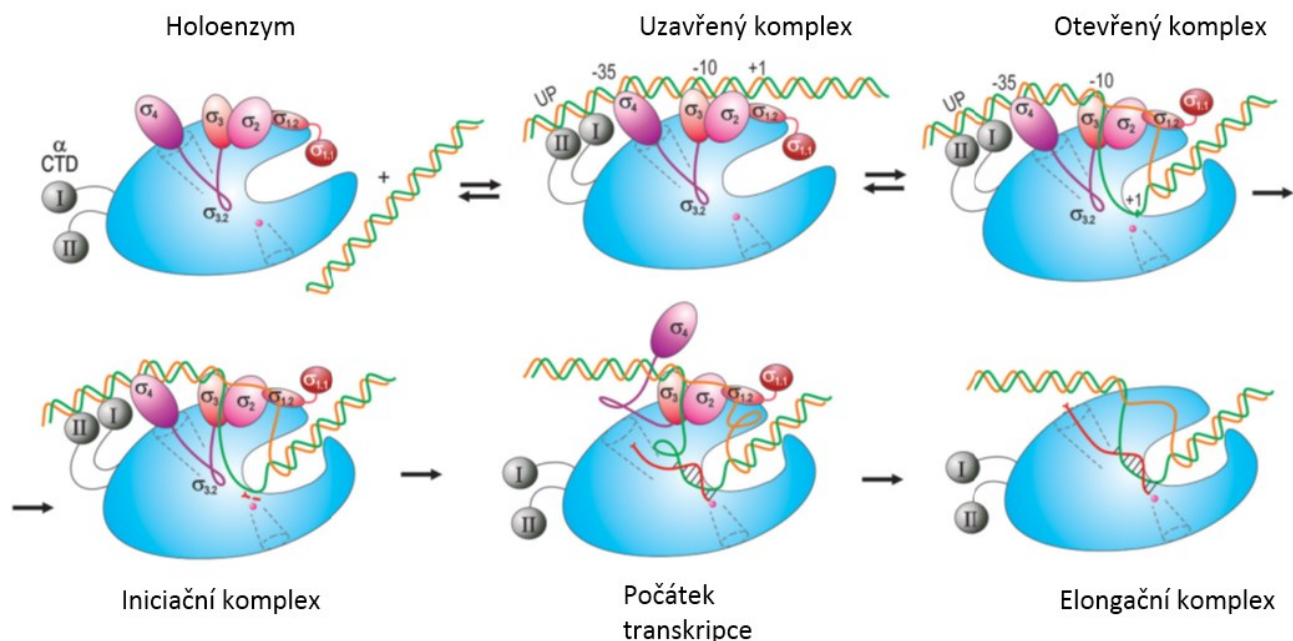
2.3 Iniciační fáze transkripce

V tomto kroku nasedá holoenzym RNAP na promotor (obrázek 3). Tím je vytvořen uzavřený komplex (RP_c).

Kinetickými změnami přes tvorbu intermediátů (tzv. přechodný stav) začne postupné vytváření transkripční bubliny, neboli otevřeného komplexu (RP_o). Tento proces nazýváme izomerizace (TsujiKawa *et al.* 2002). Vlákna promotorové DNA se rozvolní mezi pozicemi -11 a $+2$. Báze templátového vlákna na pozici $+1$ je přesunuta do katalytického místa, nacházejícího se mezi podjednotkami β a β' RNAP. V tuto chvíli je možné navázání iNTP (Haugen *et al.* 2008). Kromě otevřeného komplexu rozlišujeme někdy také raný elongační komplex (RP_{init}), jelikož u některých promotorů dochází k abortivní iniciaci. Abortivní iniciace nastává po zahájení transkripce, kdy jsou opakovaně syntetizovány krátké oligonukleotidy s délkou 2-12 nukleotidů (Lee & Borukhov 2016). Jakmile RNAP tuto fázi překoná, začne syntetizovat delší transkript.

DNA po směru transkripce (tzv. *Downstream DNA*), tvořící transkripční bublinu, se začne nasouvat do RNAP. Tomuto jevu se říká *scrunching*. Nahromaděná DNA vytlačí faktor σ z RNAP, který ve většině případů následně disociuje pryč a začíná elongační fáze (EC)

(Winkelman *et al.* 2015). K vytlačení faktoru σ také přispívá nově nasyntetizované vlákno RNA vycházející z RNAP (Barvík *et al.* 2017).



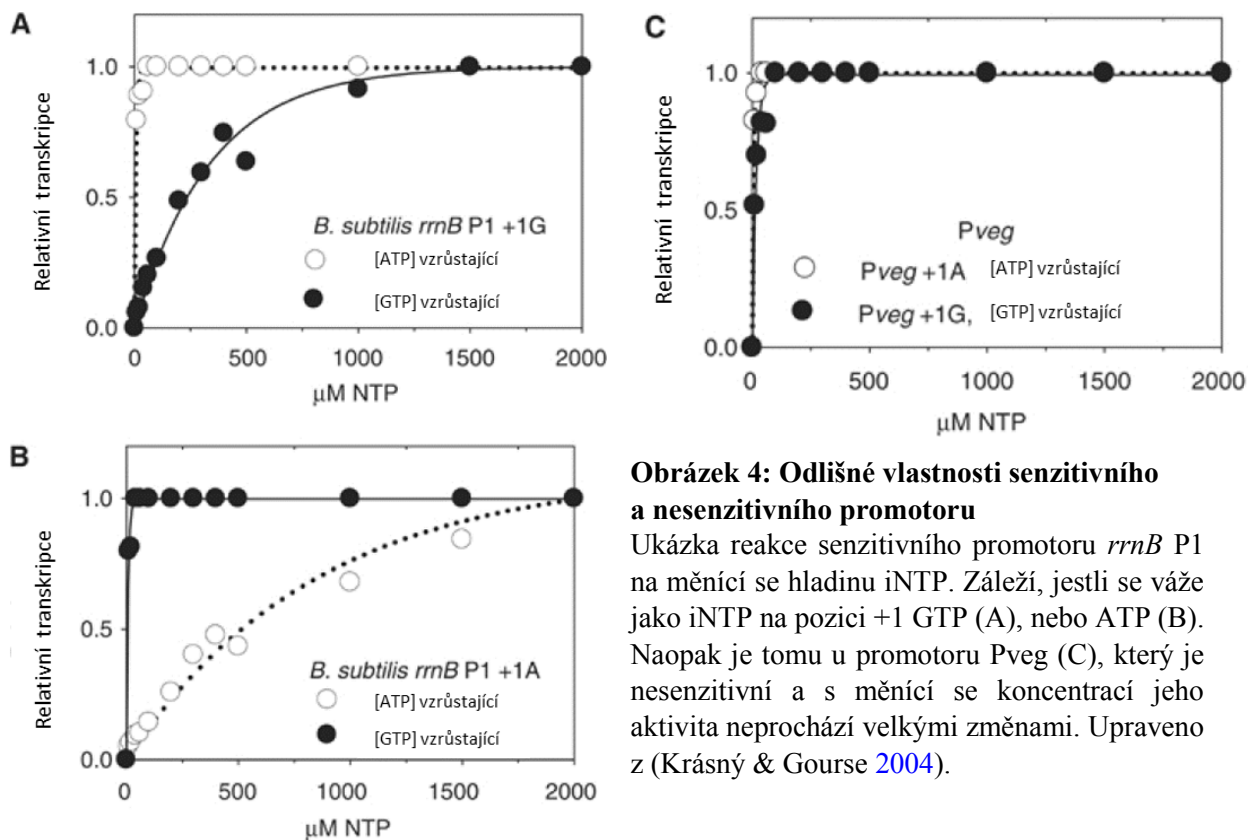
Obrázek 3: Hlavní kroky iniciace transkripce

RNAP je znázorněna jako modrý ovál se šterbinou aktivního místa. Šedé domény představují C-terminální domény podjednotky α (α CTD). Jednotlivé domény σ jsou načrtnuty jako ovály vybarvené červenou a fialovou barvou. Dále templátové vlákno DNA je znázorněno jako zelená linka, netemplátové jako oranžová. Nově vznikající RNA je v podobě červeného vlákna. Kanály v RNAP jsou naznačeny přerušovanou čarou a katalytické místo s ionty Mg^{2+} je v podobě malého červeného bodu uvnitř šterbiny. Upraveno z (Lee & Borukhov 2016)

Iniciace transkripce je významný stupeň regulace v buňce, obzvlášť z hlediska energetické úspornosti. Pomáhá buňkám přežívat v měnících se podmínkách a šetřit se svými zdroji. Toto platí zejména pro ribozomální (rRNA) promotory a geny, kde probíhá cca 70% z celkové transkripce během období exponenciálního růstu. Jakmile začne být nedostatek živin, bakterie již nepotřebuje vyrábět takové množství proteinů a potřebuje tyto promotory utlumit, aby snížila množství ribozómů (Schneider & Gourse 2003).

Důležitým regulátorem iniciace transkripce je měnící se koncentrace iNTP (Sojka *et al.* 2011). Z hlediska regulovatelnosti koncentrací iNTP dělíme promotory na senzitivní a nesenzitivní. Senzitivní promotor má nestabilní otevřený komplex a je tedy citlivý ke koncentraci iNTP. Potřebuje relativně vysokou hladinu iNTP, aby během krátkého časového intervalu, který je k dispozici, došlo k navázání iNTP do aktivního místa. Nesenzitivní promotor naopak dokáže dosáhnout vysoké míry transkripce již při nízkých koncentracích iNTP, jelikož má stabilní otevřený komplex (Murray *et al.* 2003, Krásný & Gourse 2004).

B. subtilis používá jako iNTP pro ribozomální promotory GTP. Během stresu dochází k poklesu hladiny GTP a tím je utlumena transkripce z těchto promotorů. Koncentrace ATP naopak stoupá, což zvedne transkripci u genů, které využívají ATP jako iNTP (obrázek 4). To jsou například geny pro syntézu aminokyselin (Krásný *et al.* 2008).



Obrázek 4: Odlišné vlastnosti senzitivního a nesenzitivního promotoru

Ukázka reakce senzitivního promotoru *rrnB* P1 na měnění se hladinu iNTP. Záleží, jestli se váže jako iNTP na pozici +1 GTP (A), nebo ATP (B). Naopak je tomu u promotoru *Pveg* (C), který je nesenzitivní a s měnění se koncentrací jeho aktivita neprochází velkými změnami. Upraveno z (Krásný & Gourse 2004).

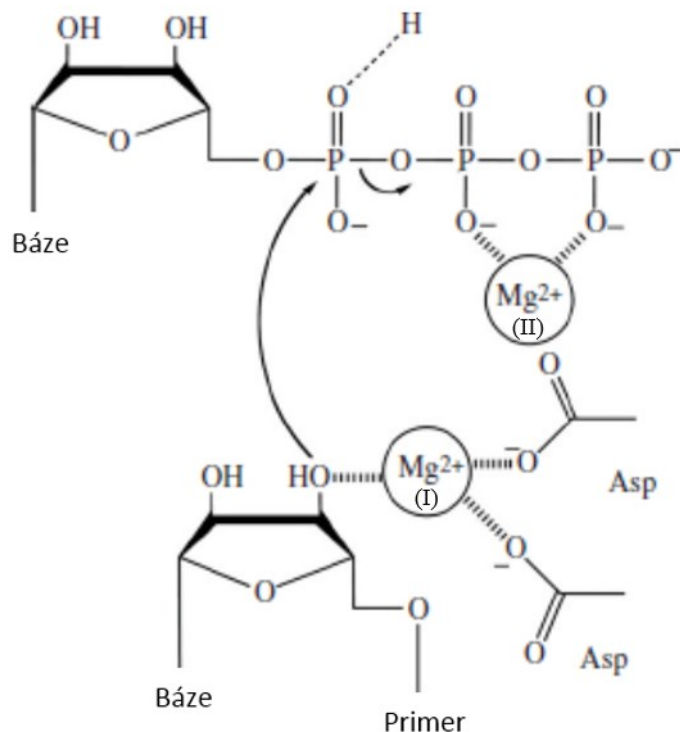
2.4 Elongační fáze transkripce

RNAP se pohybuje po templátovém vlákne a z výstupního kanálu pro RNA vychází nově syntetizované vlákno komplementární RNA.

Syntéza vlákna RNA probíhá tak, že se vytvoří vazba mezi 3'OH skupinou (resp. 3'O⁻, viz níže) ribózy a α-fosfátem příchozího NTP. K syntéze dochází v aktivním místě RNAP, kde se nachází iont Mg²⁺ (označen jako Mg²⁺ I) a dva záporně nabitě aspartátové aminokyselinové zbytky. K nově vznikajícímu vláknu RNA vždy přistupuje volný NTP s navázaným Mg²⁺ (označen jako Mg²⁺ II) a váže se svým α-fosfátem na 3'OH skupinu posledního zařazeného nukleotidu, za současného odštěpení pyrofosfátu (obrázek 5).

Katalýza je umožněna iontem Mg²⁺(I), který interaguje se vznikajícím vlákem RNA, konkrétně se jedná o jeho 3'OH konec. Tímto způsobem snižuje pKa OH skupiny, což následně vyústí v disociaci protonu. Na kyslíku se následně objeví záporný náboj. Díky těmto reakcím může být α-fosfát nově přistupujícího NTP napadnut, neboli atakován elektronem

kyslíku. Nakonec dojde k vytvoření kovalentní vazby, a to mechanismem nukleofilní substituce. Druhý iont Mg^{2+} (II) usnadňuje odštěpení pyrofosfátu (Steitz 1994).



Obrázek 5: Přidávání nukleotidu k syntetizovanému řetězci RNA

Na obrázku je znázorněn mechanismus syntézy nově vznikajícího řetězce RNA, který je popsán výše. Upraveno z (Piccirilli & Koldobskaya 2011). Původní článek (Shechner *et al.* 2009).

2.5 Terminační fáze transkripce

RNA polymeráza začíná transkripci od pozice +1 a pokračuje v polymeraci vlákna, dokud nenarazí na takzvaný terminátor, ustálenou sekvenci na DNA, která přiměje RNAP transkripci zastavit.

Jsou známy dva druhy terminace transkripce. První druh je terminace nezávislá na faktoru Rho. Spočívá ve vytvoření invertované vlásenky bohaté na GC-páry. Za touto sekvencí následuje až 8 thyminů. Vlášenska rozruší elongační komplex a díky slabé vazbě vzniklých AU párů dojde k disociaci RNAP.

Druhým typem je terminace závislá na faktoru Rho. Faktor Rho je protein složený z šesti podjednotek, které jsou uspořádány do kruhu (obrázek 6). Má ATPázovou a helikázovou aktivitu (Kriner & Groisman 2017). Na rozdíl od terminace nezávislé na faktoru Rho, tento mechanismus funguje pouze v případě přepisu celého genu či operonu (Richardson 2002).



Obrázek 6: Struktura proteinu Rho

Znázornění 3D uspořádání. Jednotlivé podjednotky jsou vybarveny modře a žlutě, vlákno RNA červeně. Upraveno z (Adelman *et al.* 2006).

Faktor Rho se váže na specifické sekvence (*Rho utilisation sites*) na RNA. Tato místa jsou přibližně 40 nt dlouhá a jsou bohatá na cytosin (Bogden *et al.* 1999).

Všechny podjednotky faktoru Rho mají N-koncovou doménu, která obsahuje vazebné místo pro RNA. Funkce C-koncové domény je vazba ATP. Faktor Rho doputuje za spotřeby ATP po vláknech RNA až k RNAP a způsobí rozpad elongačního komplexu. Předpokládá se, že k rozpadu dojde mechanickým “vytáhnutím” RNA (Park & Roberts 2006). Bylo zjištěno, že faktor Rho nemusí k elongačnímu komplexu putovat po vláknech RNA, nýbrž se dokáže navázat na samotnou RNAP. Avšak terminace v tomto případě není tak účinná (Epshtein *et al.* 2010).

Tento protein může být regulován transkripčními faktory NusA a NusG. NusA kompetuje s proteinem Rho o vazbu na RNA. Jakmile se připojí na vlákno RNA, již tam není místo a protein Rho se nenaváže. Nedojde tedy k terminaci transkripce. NusG naopak proteinu Rho v terminaci transkripce pomáhá (Cardinale *et al.* 2008).

3. Faktory σ

Faktory σ jsou důležité pro rozeznání specifické sekvence promotoru, navázání holoenzymu RNAP na promotor, stabilitu otevřeného komplexu a započetí transkripce, včetně úniku RNAP z promotoru. Také se mohou vázat s transkripčními aktivátory (Saecker *et al.* 2011). Kromě faktorů σ dále rozlišujeme faktory anti- σ a anti-anti- σ , které jsou důležité pro regulaci samotných faktorů σ . Budou blíže popsány v kapitole 4.

Bakterie mohou mít různý počet faktorů σ podle toho, kde dané organismy žijí, jaký mají metabolismus, s kým musí kompetovat a podobně. *E. coli* jich obsahuje 7, *B. subtilis* 18 a například *Streptomyces coelicolor* jich obsahuje dokonce 63 (Bentley *et al.* 2002).

Podle dvou nejznámějších faktorů σ z *E. coli* se všechny faktory σ dělí do dvou skupin. Většina z nich spadá do skupiny σ^{70} . Tyto faktory regulují transkripci u velké části genů. Druhá skupina se nazývá σ^{54} a její úkol je reagovat na specifické podmínky. Na promotorech regulovaných těmito faktory σ není zahájena transkripce při exponenciálním růstu za dostatku živin (Zhang & Buck 2015). V této kapitole popíšeme jednotlivé skupiny faktorů σ a jejich vzájemné odlišnosti.

3.1 Skupina σ^{70}

Skupina σ^{70} obsahuje čtyři třídy. Jednotlivé třídy se liší počtem domén (obrázek 8), které mohou být maximálně čtyři, a to doména 1.1 (oblast 1.1), doména 2 (oblast 1.2–2.4), doména 3 (3.0–3.2.), a doména 4 (oblast 4.1.–4.2.) (Campbell *et al.* 2002). Liší se také svou sekvencí a funkcí.

3.1.1 Třída 1

Třída 1 zahrnuje faktory σ obsahující všechny čtyři domény, které jsou navzájem propojené variabilními spoji. Patří sem primární (*housekeeping*) faktory σ , například σ^{70} u *E. coli* a σ^A u *B. subtilis*, které zajišťují transkripci z většiny promotorů při běžném exponenciálním růstu. Do zbylých tříd 2-4 patří alternativní faktory σ , které bakterie používá za specifických okolností, kdy je potřeba přizpůsobit se určité změně prostředí.

Doména 1.1 působí jako autoinhibiční doména. Pokud není faktor σ navázán na RNAP, doména 1.1, která má strukturu negativně nabitých α -helixů, se váže na zbylé domény proteinu. U bakterie *Thermotoga maritima* bylo zjištěno, že mimo RNAP se doména 1.1 nachází v blízkosti domén 2 a 4, a vytváří tak kompaktní strukturu. Mohlo by se mezi těmito doménami jednat o elektrostatické interakce. Důkaz fyzické vazby domén však stále chybí (Schwartz *et al.* 2008). Podobné studie byly dělány také u σ^{70} z *E. coli* (Dombroski *et al.* 1993). V tomto kompaktním stavu s navázanou doménou 1.1 není faktor σ schopný vazby na promotor. Teprve po vytvoření holoenzymu RNAP dojde k odkrytí vazebných míst pro promotor na doménách 2, 3 a 4. Může tedy dojít ke specifickému rozeznání a vazbě na promotor (Murakami *et al.* 2002, Vassylyev *et al.* 2002). Interakce jednotlivých oblastí domén σ s promotorem jsou znázorněny na obrázcích 2, 7 a 8.

Kromě autoinhibiční funkce a tedy vlivu na iniciaci transkripce má doména 1.1 zásadní roli v tvorbě otevřeného komplexu (takzvané izomerizaci) a následně v tvorbě iniciačního komplexu (Wilson & Dombroski 1997). Dokáže obsadit RNAP v jejím aktivním místě a tím

zabránit vazbě templátové DNA (Bae *et al.* 2013). Záleží tedy na tom, zda se z aktivního místa během izomerace uvolní či nikoliv. Pokud místo uvolní, vytvoří se otevřený komplex a může následovat transkripce. Pokud zůstane navázána, transkripce nezačne (Saecker *et al.* 2011, Hook-Barnard & Hinton 2009).

Na rozdíl od domény 1.1, která se nachází pouze u faktorů σ třídy 1, doména 2 se vyskytuje u všech čtyř tříd σ^{70} . Rozsáhle interaguje s RNAP, zvláště pak oblast 2.2, která se váže na podjednotku β' RNAP (Arthur & Burgess 1998, Murakami *et al.* 2002).

Tato doména se podílí na stabilizaci otevřeného komplexu, a to díky svým interakcím s vláknem DNA v oblasti sekvence -10. Jsou známy dvě konzervované báze v rámci promotorové sekvence -10, které jsou stěžejní pro tuto interakci. Jsou to adenin na pozici -11 a thymin na pozici -7. Především tyto dvě báze tvoří interakci s doménou 2 (Zhang *et al.* 2012). Doména 2 má strukturu tří α -helixů, z toho druhý helix je esenciální pro vazbu na podjednotku β' RNAP (Young *et al.* 2001).

U některých primárních faktorů σ se v rámci domény 2 (mezi oblastmi 1.2 a 2.1) nachází nekonzervovaná oblast, která může mít různou délku. U primárního faktoru σ^{70} v *E. coli* se ukázalo, že tato oblast hraje roli v disociaci faktoru σ v raných fázích elongace (Leibman & Hochschild 2007).

Na promotorech, kde je prodloužená sekvence -10, má doména 3 možnost se na ní navázat a stabilizovat tak iniciační komplex. Na těchto promotorech dojde k takovému stabilizačnímu efektu, že sekvence -35 již nemusí být přítomna (Mitchell *et al.* 2003). Doména 3 však není esenciální pro vazbu faktoru σ na promotor, jelikož není přítomna u všech tříd σ^{70} . Stejně jako doména 2 je složena ze tří α -helixů, přičemž zejména první helix je odpovědný za vazbu prodloužené sekvence -10 na promotoru (Campbell *et al.* 2002).

Poslední doménou je doména 4, která je podobně jako doména 2 konzervovaná ve všech třídách skupiny σ^{70} . Nejenže se váže na promotorovou sekvenci -35, ale navíc také interaguje s podjednotkou β RNAP a tím stabilizuje strukturu holoenzymu. Tato doména se skládá ze dvou párů α -helixů. Pár α -helixů na karboxylovém konci zajišťuje kontakt s promotorovou sekvencí -35 (Campbell *et al.* 2002).

Konzervovaná sekvence (*linker*), která spojuje domény 3 a 4, zasahuje do kanálu, kudy vychází nově nasyntetizovaná RNA. Takzvaný σ *prst*, který tvoří část tohoto linkeru, interaguje s templátovým vláknem DNA. Proto, aby RNAP mohla syntetizovat delší úseky RNA, musí být σ *prst* odstraněn z výstupního kanálu pro RNA. Poté se může rozeběhnout elongační fáze (Zhang *et al.* 2012, Paget 2015).

3.1.2 Třída 2

Do třídy 2 patří alternativní faktory σ s doménami 2, 3 a 4. Svou sekvencí a strukturou se velmi podobají skupině 1, avšak stejně jako třídy 3 a 4 postrádají doménu 1.1 (Paget 2015). Teoreticky se tedy mohou vázat na promotorovou sekvenci DNA i bez přítomnosti enzymu RNAP. Tento jev se potvrdil například u faktoru σ^B v *B. subtilis*, nicméně vazba na DNA byla poměrně slabá (Kuo *et al.* 2015). Faktor σ^B reguluje transkripci genů pro reakci na rozmanité stresové podmínky, jako například reakce na osmotický a oxidativní stres, antibiotika, nedostatek kyslíku či ATP, nebo extrémní teploty (Nagler *et al.* 2016, Nannapaneni *et al.* 2012).

Alternativní faktory třídy 2 přepisují geny důležité pro odpověď například na hladovění či jiné stresy stacionární fáze. Jeden z nejvíce prostudovaných je faktor σ^S (nebo také σ^{38}) u *E. coli*, který řídí transkripci genů pro širokou škálu odpovědí na různé druhy stresu. Může to být chybějící zdroj uhlíku či vysoká teplota (Jishage *et al.* 1996, Battesti *et al.* 2011). Dalším příkladem je faktor σ^E u bakterie *Synechocystis*, který je důležitý pro růst aktivovaný světlem (Osanai *et al.* 2005).

3.1.3. Třída 3

Alternativní faktory σ skupiny 3 se nejčastěji skládají z domén 2, 3 a 4. Jsou však již více sekvencně rozdílné od skupiny 1. Regulují transkripci genů pro odpovědi na vysokou teplotu, sporulaci, syntézu bičíku, pohyblivost a různé stresové situace (Paget & Helmann 2003). Například faktor σ^D u *B. subtilis*, který působí v době pozdního exponenciálního růstu, ovlivňuje geny pro chemotaxi či sestavování bičíku (Serizawa *et al.* 2004). U *E. coli* je to σ^F (FliA), která podobně jako σ^D řídí tvorbu orgánů pro pohyb (Fitzgerald *et al.* 2014).

3.1.4. Třída 4

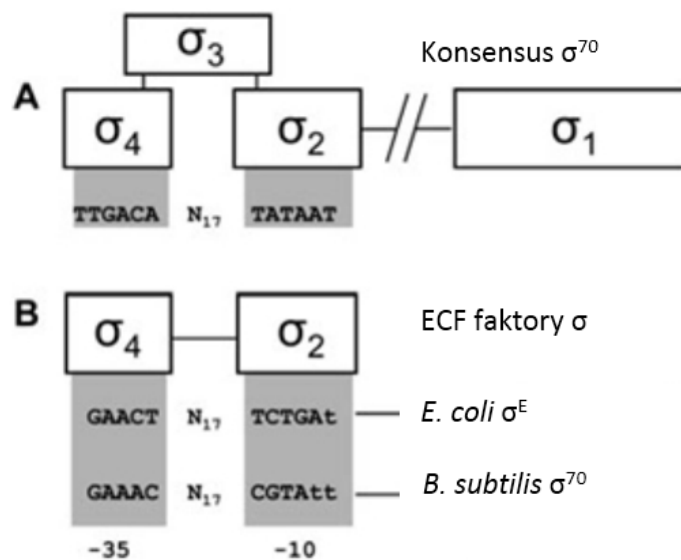
Do této třídy patří alternativní faktory σ , které obsahují pouze domény 2 a 4, které jsou esenciální pro rozeznání promotoru. Kromě domén 1.1 a 3 postrádají také první z α -helixů domény 1.2., který váže diskriminátor (Staron *et al.* 2009).

Faktory σ patřící do třídy 4 slouží bakteriím k přijímání vnějších signálů a reakci na ně. Proto se jim také říká faktory s extracytoplasmatickou funkcí (ECF) (Lonetto *et al.* 1994). Příkladem může být faktor σ^E u *E. coli*, který působí při různých stresových podmínkách, například při hromadění špatně složených proteinů vnější membrány (Meccas *et al.* 1993).

Homology faktoru σ^E se nacházejí kupříkladu u *Vibrio cholerae* (Mathur *et al.* 2007) a *Salmonella enterica*, kde hrají roli ve virulenci daných bakterií (Crouch *et al.* 2005, Testerman *et al.* 2002).

Dalším zástupcem této třídy je faktor σ^W u *B. subtilis*, který reaguje na antimikrobiální peptidy vylučované jinými bakteriemi (Helmann 2006).

Promotory rozeznávané těmito faktory mají často motiv “AAC” v rámci promotorové sekvence -35 (obrázek 7). Naopak sekvence -10 je více sekvenčně různorodá (Staron *et al.* 2009). Třída 4 je nejvíce početnou a rozmanitou skupinou.



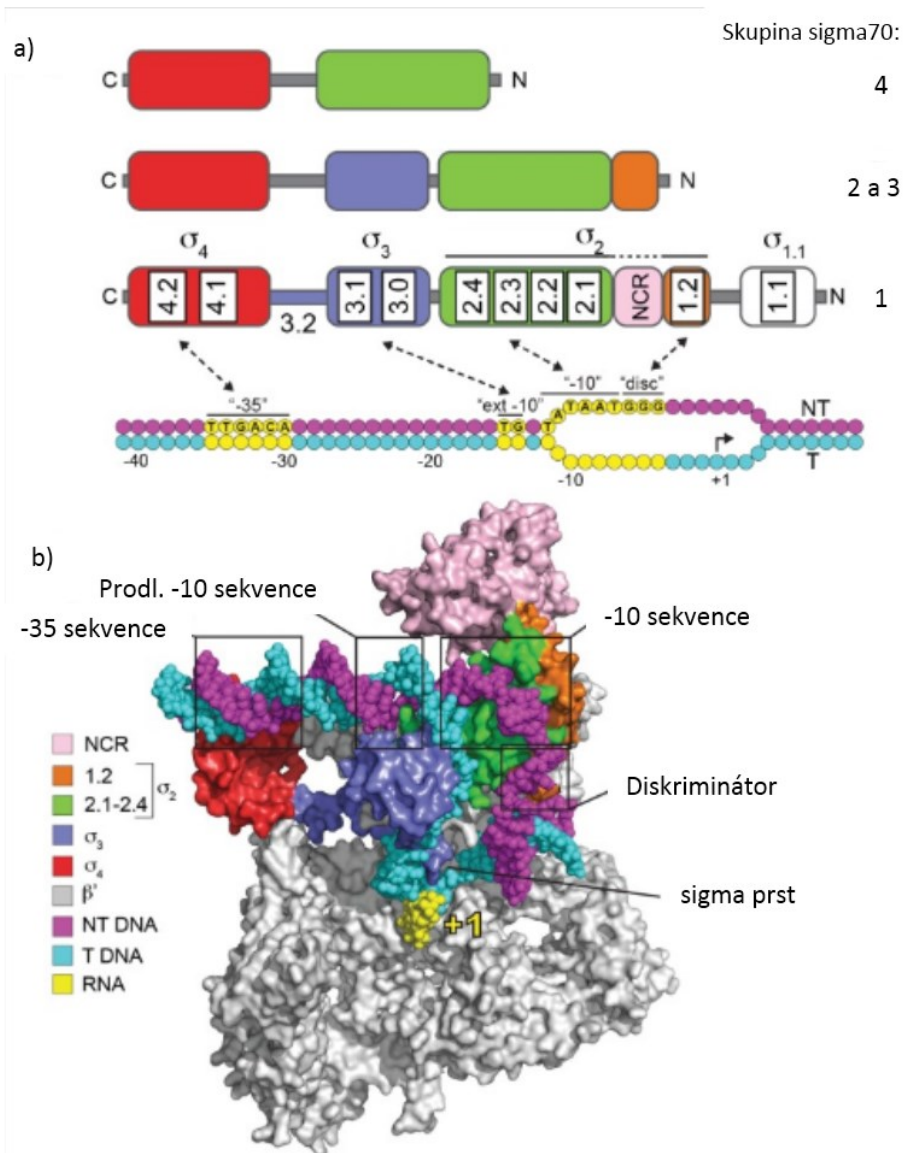
Obrázek 7: Doménové složení a rozeznávaná promotorová sekvence u primárních faktorů σ a faktorů ECF

A) Primární faktor σ^{70} se čtyřmi doménami. Pod doménami 2 a 4 je znázorněna konsensus promotorová sekvence, kterou tyto domény vážou.

B) Příklady dvou faktorů σ ze skupiny ECF, σ^E z *E. coli* a σ^W z *B. subtilis*. Pod doménami 2 a 4 je znázorněna konkrétní promotorová sekvence, kterou tyto domény vážou.

Upraveno z (Staron *et al.* 2009)

Ojedinělým příkladem faktoru σ , který se skládá ze dvou proteinů, je faktor YvrI-YvrHa u *B. subtilis*. Tento faktor zmíním podrobněji v kapitole 4.



Obrázek 8:

(a) Doménové složení jednotlivých tříd u skupiny σ^{70} a jejich vazba na promotor

Na obrázku je znázorněna stavba jednotlivých tříd σ^{70} , pod nimi je sekvence promotoru regulovaného σ^{70} z *E. coli*. Vazby na promotor jsou znázorněny přerušovanými šipkami. Doména 1.1 je zobrazena v bílé barvě, doména 2 v zelené (oblast 1.2 je vybarvená oranžově), dále doména 3 je modrá, doména 4 je červená. Netemplátové vlákno DNA má fialovou barvu, templátové tyrkysovou. Důležité konzervované sekvence promotoru (sekvence -35, prodloužená -10, sekvence -10 a diskriminátor) jsou zvýrazněny žlutou barvou. Nekonzervovaná sekvence, označená jako NCR, je zvýrazněna růžovou barvou. Nachází se mezi oblastmi 1.2 a 2.1 a může mít jak různorodou sekvenci, tak i délku.

(b) Iničiační komplex RNAP s navázanou σ^{70} v *E. coli*

V prostorovém zobrazení iničiačního komplexu jsou jednotlivé domény faktoru σ^{70} a vlákna DNA zobrazeny ve stejných barvách jako v části (a). Nicméně nejsou žlutě vyznačeny konzervované promotorové sekvence. Namísto nich je žlutě vybarvené vlákno nově vznikající RNA. Aby byl obrázek co nejprehlednější, nejsou u RNAP zobrazeny podjednotky α_2 , β a ω . Upraveno z (Paget 2015).

3.2 Skupina σ^{54}

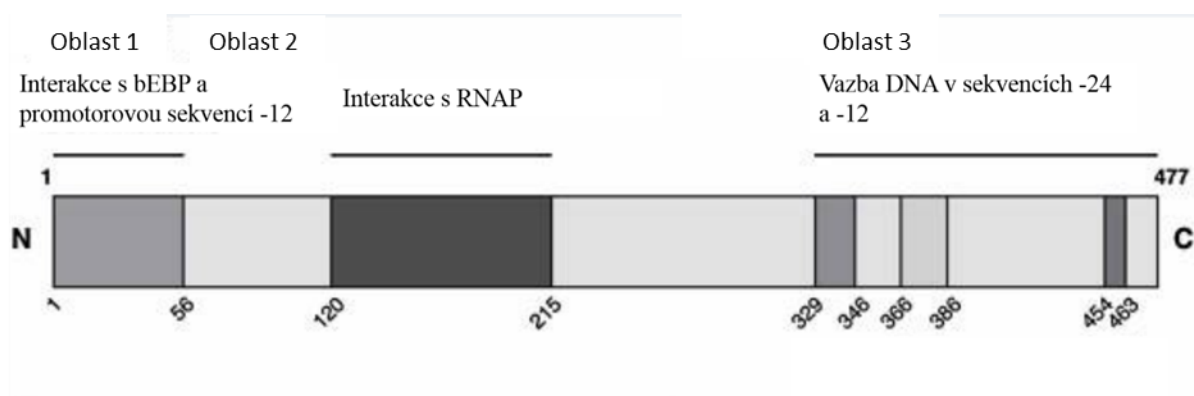
Tyto alternativní faktory σ rozeznávají na promotoru sekvenční motivy lokalizované v pozicích -24 a -12 *upstream* od transkripčního startu promotoru (Barrios *et al.* 1999). Tuto skupinu reprezentuje faktor σ^N u *E. coli* (Wigneshweraraj *et al.* 2002), nebo σ^L u *B. subtilis* (Débarbouillé *et al.* 1991). Nemají žádnou sekvenční podobnost se skupinou σ^{70} .

Tyto faktory jsou zodpovědné za transkripci genů pro zpracování dusíku, alternativních zdrojů uhlíku, či tvorbu orgánů určených pro pohyb. Skládají se z oblastí 1, 2 a 3 (obrázek 9). Oblast 3 je hlavním vazebným místem pro RNAP a pro interakce s promotorovými sekvencemi -24 a -12 (Burrows *et al.* 2004). Oblast 2 slouží k pohyblivému propojení oblastí 1 a 3. Může mít různou sekvenci a délku (Southern & Merrick 2000).

Oblast 1 může sloužit stejně jako oblast 3 k vazbě promotorové sekvence v oblasti -12 a k navázání RNAP, nicméně jsou tyto vazby podstatně slabší než v případě oblasti 3 (obrázek 9). Navíc se v rámci oblasti 1 nachází vazebné místo pro aktivátory bEBPs (*bacterial enhancer-binding proteins*). Vazba na promotorovou oblast -12 znemožňuje tvorbu otevřeného komplexu (Wigneshweraraj *et al.* 2001, Cannon *et al.* 1999).

Na rozdíl od skupiny σ^{70} , faktory σ^{54} nejsou schopny po navázání na RNAP a nasednutí na promotor spustit izomeraci DNA a tím vytvořit otevřený komplex.

K izomeraci daný holoenzym potřebuje navíc transkripční aktivátory zvané bEBPs. Proteiny bEBPs hydrolyzují ATP a využívají získanou energii k vyvolání konformační změny DNA. Navázáním na oblast 1 zruší inhibiční konformaci a je umožněna izomerace DNA (Cannon *et al.* 2001, Österberg *et al.* 2011).



Obrázek 9: Struktura σ^{54}

Schématické znázornění funkčních částí σ^{54} , které jsou popsány výše. Upraveno z (Bose *et al.* 2008).

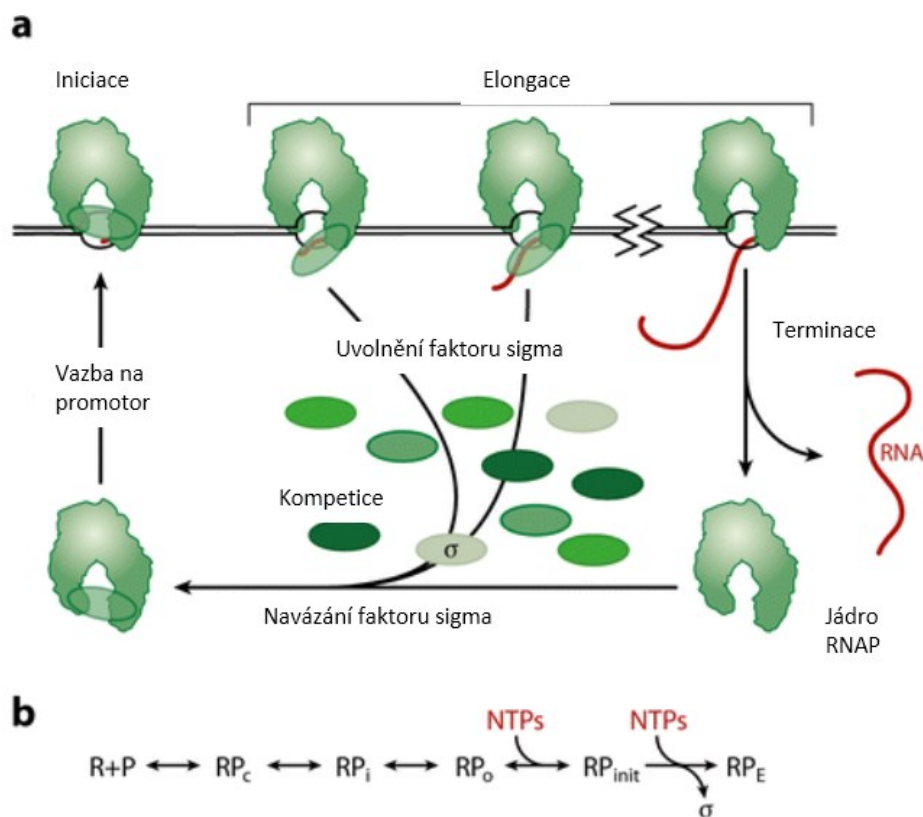
4. Regulace faktorů σ

Schopnost bakterií rychle se adaptovat na měnící se životní podmínky spočívá z velké části v regulaci faktorů σ . Záleží na koncentracích různých faktorů σ v buňce, které jsou schopné vázat RNAP a nasednout na promotor (obrázek 10). Regulace koncentrace a afinity těchto volných faktorů σ schopných vazby poskytuje možnost výběru sad genů, které je v dané chvíli potřeba exprimovat.

Koncentrace volných faktorů σ ovlivňuje i aktivitu dalších regulačních faktorů, například proteinu DksA (Azriel *et al.* 2016), či molekuly (p)ppGpp (Srivatsan & Wang 2008) a dalších transkripčních aktivátorů a represorů.

V této kapitole popíšeme cyklus vazby faktorů σ na RNAP a kompetici mezi nimi. Dále popíšeme regulaci alternativních faktorů σ pomocí faktorů anti- σ a regulaci primárních faktorů σ .

V bakteriální buňce neustále probíhá kompetice mezi faktory σ o vazbu na RNAP. Každý faktor σ prochází cyklem. Naváže se na RNAP, spustí transkripci genů pod jeho kontrolou a následně se odpojí a je opět ve formě volného faktoru připraveného k vazbě RNAP (obrázek 10). V této kompetici záleží na koncentraci a afinitě daného faktoru σ k RNAP.



Obrázek 10: Cyklus vazby a uvolnění faktoru σ

- a) Zobrazení koloběhu, při kterém se faktory σ po uvolnění z RNAP dostanou zpět do takzvaného *poolu* faktorů σ , kde soutěží o vazbu na další RNAP, aby mohly spustit transkripci ze své sady genů.

- b) Jednotlivé kroky iniciace transkripce. RNAP s navázaným faktorem σ (R) se váže na promotor (P) a vytváří uzavřený komplex (RP_c). Ten poté přejde přes nestabilní konformace (RP_i) do otevřeného komplexu (RP_o). V této fázi začíná transkripce krátkých úseků (RP_{init}). Při přechodu do elongační fáze (RP_E) se faktor σ ve většině případů uvolňuje a vrací se mezi ostatní faktory kompetovat o RNAP. Upraveno z (Österberg *et al.* 2011).

Není pravidlem, že se faktory σ uvolňují na začátku elongační fáze. Mohou být spojené s RNAP i v elongační fázi a působit jako elongační faktor. Tímto způsobem funguje například primární faktor σ^{70} v *E. coli*. Faktory σ tím mohou pozastavit transkripci, což bakterie využívá hlavně ve stacionární fázi (Goldman *et al.* 2015).

Dalším příkladem může být faktor σ YvrI-YvrHa u *B. subtilis*. Tento faktor je složen ze dvou proteinů. Protein YvrI je homologní s doménou 4 u faktoru σ^{70} v *E. coli* a protein YvrHa je homologní s doménou 2. Tyto dva proteiny jsou v jednom operonu a fungují dohromady jako jeden faktor σ (MacLellan *et al.* 2009). Protein YvrI je s postupující elongací z RNAP uvolněn, zatímco protein YvrHa je během elongační fáze stále navázán (Sengupta *et al.* 2015).

4.1 Regulace faktory anti- σ

Faktory anti- σ regulují přístup alternativních faktorů σ k RNAP. Dokáží regulovat buď koncentraci volného faktoru σ přístupného pro RNAP, či jeho afinitu k RNAP. Tím pádem zbyde RNAP dostupná pro ostatní faktory σ . Faktory anti- σ způsobí, že se faktory σ projeví až ve chvíli, kdy je potřeba jimi řízené geny transkribovat.

Samotné faktory anti- σ mohou být regulované extracytoplazmatickými proteiny, malými molekulami (efektory), sekrecí z buňky ven, či inhibicí pomocí faktorů anti-anti- σ , které ve své defosforylované formě vážou faktory anti- σ a inaktivují je (Helmann 1999).

V této kapitole popíšeme mechanismus kaskády RIP (*regulated intramembrane proteolysis*), funkci volných faktorů anti- σ a faktorů anti-anti- σ .

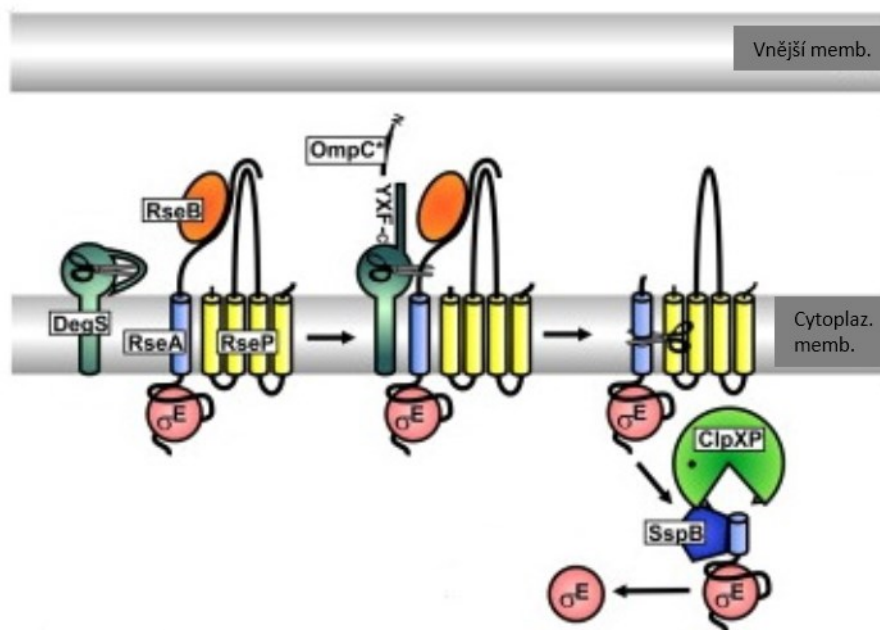
4.1.1 Kaskáda RIP

Faktory anti- σ mohou fungovat například v takzvaných kaskádách RIP. Faktor σ^W u *B. subtilis* má ve svém operonu gen *rsiW*, který pro σ^W kóduje faktor anti- σ RsiW. Tato anti- σ je membránově vázaná. Pokud naváže σ^W , znemožní jí vazbu na RNAP. Aby se σ^W opět aktivovala, je potřeba anti- σ RsiW naštěpit. Tuto funkci mají membránové proteázy PrsW and RasP. Faktor σ^W s navázanou částí RsiW je tímto uvolněn do cytosolu. V cytosolu

je proteázou ClpXP odstraněn zbytek anti- σ RsiW a tím dojde k úplné aktivaci σ^W (Schöbel *et al.* 2004, Devkota *et al.* 2017).

Tento mechanismus kaskády RIP se vyskytuje také u *E. coli* (obrázek 11). Její σ^{24} (σ^E) má své faktory anti- σ RseA a koanti- σ RseB. Pro aktivaci σ^{24} je potřeba opět stěpení, nicméně jinými proteázami, a to proteázou DegS a RseP (Penas *et al.* 1997).

Proteáza DegS má funkci jak štěpící, tak senzorkou. Jakmile se v periplazmě objeví špatně sbalené proteiny (např. OmpC), spustí kaskádu RIP. Špatně sbalené proteiny se začnou hromadit například při tepelném šoku (Heinrich & Wiegert 2009).



Obrázek 11: Mechanismus aktivace faktoru σ^{24} (σ^E)
Mechanismus je popsán výše. Upraveno z (Heinrich & Wiegert 2009).

4.1.2 Volné faktory anti- σ

Faktory anti- σ se běžně vyskytují i v cytoplazmě. Příkladem může být σ^{28} (FlhA) u bakterie *Salmonella typhimurium*, která řídí expresi z genů pro chemotaxi či filamenta. Anti- σ FlgM váže v cytoplazmě σ^{28} a brání tak expresi z příslušných genů. Tento mechanismus funguje pro zadržení transkripce genů spadajících pod σ^{28} před tím, než se utvoří bazální tělísko bičíku. Jakmile se tělísko utvoří, FlgM je jím transportován ven z buňky a tím uvolní faktor σ^{28} , který se stává aktivním (Chadsey & Hughes 2001).

Tento způsob regulace je široce rozšířen, můžeme ho najít například i u *E. coli* či u bakterie *Salmonella enterica* (Aldridge *et al.* 2006, Saini *et al.* 2011).

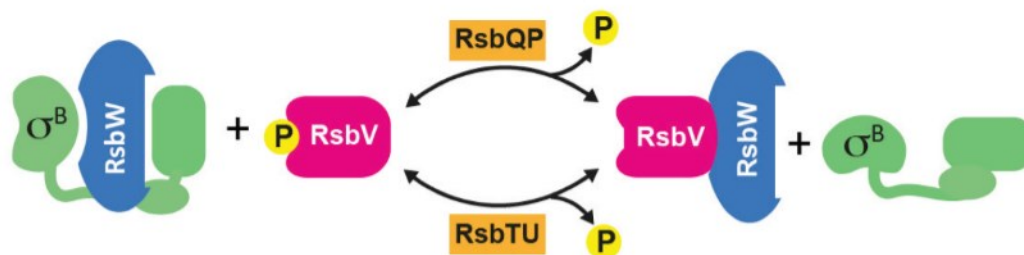
V některých případech může být příjemce signálu samotný faktor anti- σ . Například anti- σ RsrA u *Streptomyces coelicolor*, která váže faktor σ^R , reaguje na oxidativní stres změnou konformace. Tato změna způsobí uvolnění σ^R (Kim *et al.* 2009, Donohue 2009).

4.1.3. Faktory anti-anti- σ

Když buňka neprochází stresovými podmínkami a není potřeba aktivita specifického alternativního faktoru σ , tak je na něj navázán jeho faktor anti- σ a tím pádem přetrvává v neaktivním stavu. Faktor anti- σ má kinázovou aktivitu a fosforyluje svůj faktor anti-anti- σ . Tím ho udržuje neaktivní.

Pokud se buňka dostane do stresu, specifické fosfatázy mohou defosforylovat příslušnou anti-anti- σ . Ta se aktivuje a naváže faktor anti- σ . Díky vazbě faktoru anti-anti- σ na jeho anti- σ se uvolní potřebný faktor σ a může řídit transkripci z jemu příslušejících genů. Tento mechanismus můžeme najít například u *Streptomyces coelicolor*, která má faktor σ^H a jeho faktor anti- σ UshX. Ten je regulován anti-anti- σ BldG (Sevcikova *et al.* 2010).

Známějším příkladem tohoto mechanismu je σ^B u *B. subtilis* a její anti- σ RsbW (obrázek 12). RsbW je regulována anti-anti- σ RsbV. Tato anti-anti- σ je aktivována defosforylací pomocí fosfatáz RsbTU a RsbQP (Dufour & Haldenwang 1994).



Obrázek 12: Schéma fungování faktorů anti- σ a anti-anti- σ u σ^B v *B. subtilis*
Mechanismus je popsán výše. Upraveno z (Paget 2015).

Regulace koncentrace aktivních faktorů σ může probíhat kromě vazby na anti- σ také na úrovni transkripce, translace, či aktivity daného proteinu. Například v *B. subtilis* existuje neaktivní faktor pro- σ^E , u kterého odstěpení inhibiční domény na N-konci vede k vytvoření aktivního faktoru σ^E (Hilbert & Piggot 2004).

Těmito způsoby je alternativním faktorům σ zabráněno v možnosti kompetice s faktory primárními, a ty mají díky tomu k dispozici větší množství volné RNAP k navázání. Mohlo by se tedy zdát, že jediné faktory σ , které lze omezit regulací, jsou faktory alternativní. Navíc přes to, že zvýšíme koncentraci alternativních faktorů σ , stále bude dost volných primárních faktorů σ , které mají vyšší afinitu k RNAP (Sharma & Chatterji 2010). Nicméně jsou i způsoby, jak omezit vazbu primárních faktorů σ na RNAP a tím dát možnost alternativním faktorům σ k vazbě, jak bude popsáno dále.

4.2 Regulace primárních faktorů σ

Regulace koncentrace primárních faktorů σ schopných vazby RNAP může probíhat více způsoby. Nejjednodušší mechanismus, který se nabízí, je na popud specifického signálu zvýšit koncentraci alternativních faktorů σ , které navážou RNAP a tím pádem jí zbyde méně pro primární faktory σ . Tím se primárním faktorům σ sníží možnost transkripce z genů pod jejich kontrolou (Mauri & Klumpp 2014). Existují však i další mechanismy. Primární faktory σ mohou být regulovány pomocí faktorů AlgQ/Rsd, 6S RNA, či molekulou (p)ppGpp. Principy těchto regulací popisují níže.

4.2.1. Regulace primárních faktorů σ pomocí proteinů AlgQ/Rsd

Významným způsobem regulace je vazba určitého proteinu na primární faktor σ a tím inhibice jeho vazby na RNAP.

V *E. coli* je to faktor Rsd, který se váže na σ^{70} a znemožní tak její navázání na RNAP (Westblade *et al.* 2004). Rsd na σ^{70} obsazuje konkrétně doménu 4 (obrázek 11), která je esenciální pro vazbu na promotorovou sekvenci -35 a na jádro RNAP (Patikoglou *et al.* 2007).

Tento způsob regulace se nachází také u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tato bakterie umí produkovat polysacharid alginát, který zvyšuje její virulenci (Govan & Deretic 1996). Enzymy pro syntézu tohoto polysacharidu jsou kódovány genem *algD*, který je transkribován pomocí alternativního faktoru σ^{AlgU} (Yin *et al.* 2013). Transkripce genu *algD* závisí na proteinu AlgQ, který se váže na faktor σ^{70} a tím znemožňuje jeho vazbu na RNAP. Zůstává tak více volných RNAP pro faktor σ^{AlgU} (Dove & Hochschild 2001).

4.2.2. Regulace primárních faktorů σ pomocí 6S RNA

6S RNA je poměrně rozšířeným regulátorem mezi bakteriemi. Nejvíce prostudovaná je však u *E. coli*. Hladina této RNA je nejvyšší během pozdní stacionární fáze, nicméně v menších koncentracích se objevuje i ve fázi exponenciální. Její funkcí je zabránit transkripci z genů pod kontrolou σ^{70} (Wassarman & Storz 2000).

Bylo prokázáno, že se 6S RNA váže na RNAP s navázanou primární σ^{70} (Gildehaus *et al.* 2007). Váže se na holoenzym RNAP obdobně jako promotorová DNA a brání tak nasednutí na promotor. Tvoří vazbu s oblastí 4.2. faktoru σ^{70} (Steuten *et al.* 2013). Četné 6S RNA v různých bakteriích nemají příliš podobnou primární sekvenci, nicméně je nápadná podobnost v sekundární struktuře (Cavanagh & Wassarman 2014).

Bylo zjištěno, že promotory s prodlouženou sekvencí -10 či slabou sekvencí -35 jsou citlivější vůči regulaci pomocí 6S RNA (Cavanagh *et al.* 2008).

Bakterie, které nemají 6S RNA jsou méně schopné kompetice a hůře přežívají v podmínkách s nedostatkem živin. Dá se tedy soudit, že 6S RNA díky utlumení transkripce z promotorů závislých na σ^{70} dává možnost alternativním faktorům projevit se v době, kdy jsou potřeba (Trotochaud & Wassarman 2004).

U *Mycobacterium smegmatis* byla studována malá RNA zvaná Ms1. Hladina této RNA je stejně jako u 6S RNA nejvyšší ve stacionární fázi. Ovšem narozdíl od 6S RNA se váže na jádro RNAP bez navázaného faktoru σ , což je mezi malými RNA ojedinělé. K pochopení funkce této interakce je třeba dalších studií (Hnilicová *et al.* 2014).

4.2.3. Regulace primárních faktorů σ molekulou (p)ppGpp za pomoci proteinu DksA

Pokud bakterie v době nedostatku živin potřebuje přeměřovat transkripci na alternativní faktory σ , využívá regulaci pomocí molekuly (p)ppGpp. Říká se tomu stringentní odpověď. Například to může být reakce na nedostatek aminokyselin, který ohrožuje bakterii na životě (Steinchen *et al.* 2015). Molekula (p)ppGpp reguluje tuto odpověď pomocí vazby na RNAP ve spolupráci s proteinem DksA (Potrykus & Cashel 2008).

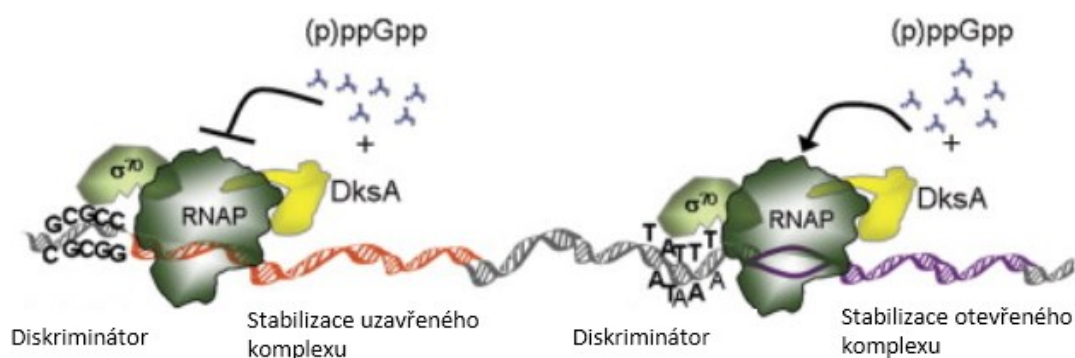
Jakmile nastane nedostatek aminokyselin, na ribozomy se začínají vázat nenabitě tRNA. Faktor RelA dokáže za spotřeby ATP přeměnit GTP/GDP na (p)ppGpp, ten se poté může vázat na RNAP a zabránit syntéze dalších proteinů (Srivatsan & Wang 2008). Syntetizovat (p)ppGpp může také enzym SpoT, který reaguje na hladovění na železo, uhlík, nebo fosfát (Xu *et al.* 2016).

Jakmile se během stringentní odpovědi začne zvyšovat hladina (p)ppGpp, začne inhibovat transkripci z promotorů pod kontrolou σ^{70} . Molekula (p)ppGpp za pomoci kofaktoru DksA

nasedne na RNAP a sníží stabilitu otevřeného komplexu (obrázek 13). Tím sníží pravděpodobnost navázání iNTP a iniciace transkripce. Geny pro syntézu aminokyselin v transkripci naopak podpoří (Hesketh *et al.* 2007, Durfee *et al.* 2008).

Nejvíce omezí promotory pro rRNA a tRNA. Zůstane tak více volných RNAP pro alternativní faktory σ , které se uplatní ve fázi hladovění (Magnusson *et al.* 2005).

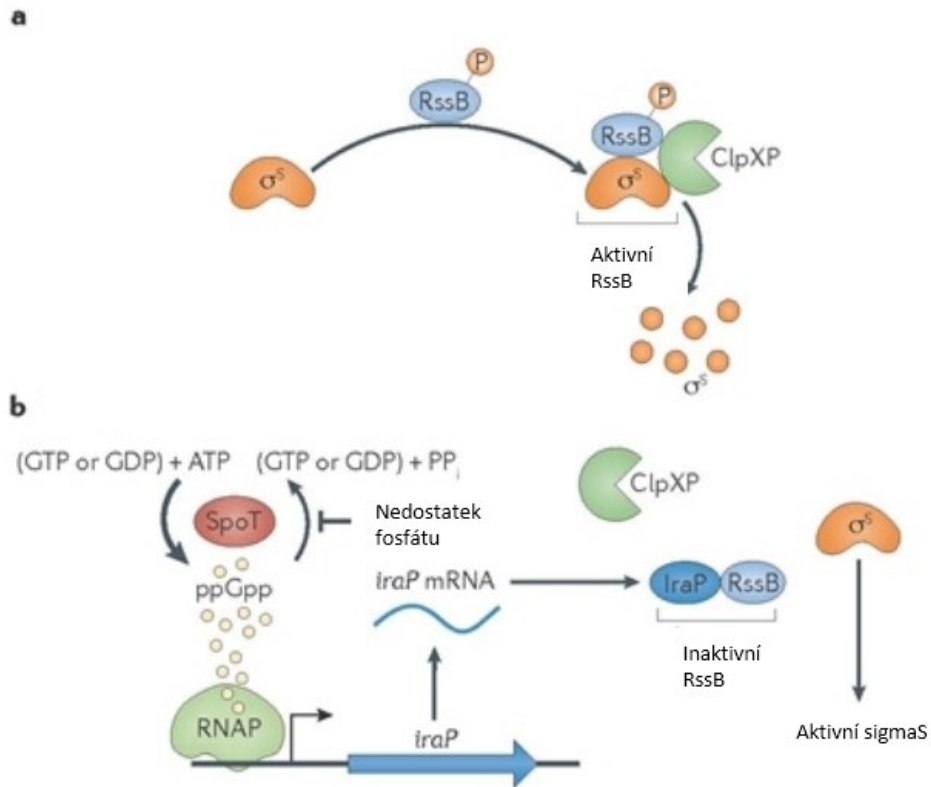
Protein DksA se váže do sekundárního kanálu a aktivního místa RNAP. Touto vazbou zabraňuje RNAP vytvořit otevřený komplex a zahájit transkripci (Parshin *et al.* 2015).



Obrázek 13: Mechanismus působení molekuly (p)ppGpp na RNAP

Spolupráce molekuly (p)ppGpp s proteinem DksA u *E. coli*. Protein DksA nastaví senzitivitu RNAP pro (p)ppGpp, které může následně stabilizovat otevřený komplex (obrázek vpravo), či ho destabilizovat tak, že se iNTP nedostane na pozici +1. Tím inhibuje transkripci daného genu (obrázek vlevo). Upraveno z (Srivatsan & Wang 2008).

Molekula (p)ppGpp má však kromě inhibice či aktivace transkripce genů primárního faktoru σ i další funkce. Například může zvyšovat hladinu aktivního faktoru σ^S v *E. coli* (obrázek 14). Indukuje tvorbu proteinu IraP, který váže adaptorový protein RssB. RssB zprostředkovává vazbu faktoru σ^S na proteázu ClpXP, kde je tento faktor následně rozštěpen. Navázáním na RssB protein IraP inhibuje jeho aktivitu a zabrání tak štěpení σ^S proteázou ClpXP (Bougdour & Gottesman 2007). Nejen tedy, že může uvolňovat RNAP pro vazbu alternativních faktorů σ , ale může tyto faktory i stabilizovat.



Obrázek 14: Stabilizace σ^S pomocí (p)ppGpp během stacionární fáze

- a) Během exponenciálního růstu je σ^S směřována proteinem RssB na proteázu ClpXP.
 b) Pokud je nedostatek fosfátu, (p)ppGpp indukuje tvorbu IraP, který inhibuje RssB.
 Upraveno z (Dalebroux & Swanson 2012).

5. Závěr:

Tato práce obsahuje přehled základních poznatků o primárních faktorech σ v porovnání s alternativními faktory σ . Přestože jsou tyto faktory studovány téměř 50 let (Burgess *et al.* 1969), zůstává řada nevyjasněných otázek. Jelikož jsou faktory σ prostudovány zejména u modelových organismů, lze předpokládat, že variant faktorů σ a s nimi spojených regulací bude nespočet. Nicméně, i u dobře prostudovaných faktorů σ jsou oblasti, kde jsou naše znalosti minimální.

Takovouto oblastí, která je zároveň klíčová pro pochopení molekulární funkce primárních faktorů σ a která je dosud neprobádaná, je interakce autoinhibiční domény 1.1 se zbytkem proteinu. Této problematice se budu věnovat ve své diplomové práci. O doméně 1.1 je známo, že má autoinhibiční funkci a tvoří kompaktní strukturu s ostatními doménami pokud σ není v komplexu s RNAP. Avšak stále nebyla potvrzena fyzická vazba domény 1.1 na kteroukoliv ze zbylých domén faktoru σ . Jediné náznaky možné vazby na domény 2 a 4 byly nalezeny u bakterií *Thermotoga maritima* a *E. coli* (Schwartz *et al.* 2008, Dombroski *et al.* 1993). Tyto studie však postrádají dostatečný molekulární detail.

Mým cílem bude izolovat domény faktoru σ^A z *B. subtilis* v dostatečné koncentraci a čistotě, aby mohly být použity pro NMR a vazebné pokusy. Tyto pokusy objasní architekturu interakce domény 1.1 se zbytkem proteinu. Získané výsledky spolu s dalšími poznatky o faktorech σ pak mohou pomoci při vývoji nových anti-mikrobiálních látek, které inhibují interakci faktoru σ s jádrem RNAP (Lewis *et al.* 2015).

6. Použitá literatura

- Adelman, J.L. *et al.*, 2006. Mechanochemistry of Transcription Termination Factor Rho. *Molecular Cell*, 22(4), pp.611–621.
- Aldridge, P.D. *et al.*, 2006. The flagellar-specific transcription factor, σ_{28} , is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti- σ_{28} factor FlgM. *Genes & Development*, 20, pp.2315–2326.
- Arthur, T.M. & Burgess, R.R., 1998. Localization of a sigma70 Binding Site on the N Terminus of the Escherichia coli RNA Polymerase β' Subunit. *The journal of biological chemistry*, 273(47), pp.31381–31387.
- Azriel, S. *et al.*, 2016. The Stringent Response Regulator DksA Is Required for Salmonella enterica Serovar Typhimurium Growth in Minimal Medium, Motility, Biofilm Formation, and Intestinal Colonization. *Infection and immunity*, 84(1), pp.375–384.
- Bae, B. *et al.*, 2013. Phage T7 Gp2 inhibition of Escherichia coli RNA polymerase involves misappropriation of σ_{70} domain 1.1. *PNAS*, 110(49), pp.19772–19777.
- Barne, K.A. *et al.*, 1997. Region 2 . 5 of the Escherichia coli RNA polymerase σ_{70} subunit is responsible for the recognition of the “ extended – 10 ” motif at promoters. *The EMBO journal*, 16(13), pp.4034–4040.
- Barrios, H., Valderrama, B. & Morett, E., 1999. Compilation and analysis of σ_{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic acids research*, 27(22), pp.4305–4313.
- Barvík, I. *et al.*, 2017. Non-canonical transcription initiation: the expanding universe of transcription initiating substrates. *FEMS microbiology reviews*, 41(2), pp.131-138
- Battesti, A., Majdalani, N. & Gottesman, S., 2011. The RpoS-Mediated General Stress Response in Escherichia coli. *Annual Review of Microbiology*, 65, pp.189–213.
- Bentley, S. *et al.*, 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). *Nature*, 417(9), pp.141–147.
- Bogden, C.E. *et al.*, 1999. The Structural Basis for Terminator Recognition by the Rho Transcription Termination Factor. *Molecular Cell*, 3, pp.487–493.
- Borukhov, S., Lee, J. & Laptenko, O., 2005. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology*, 55(5), pp.1315–1324.
- Borukhov, S. & Nudler, E., 2008. RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Cell press*, 16(3), pp.126–134.
- Bose, D. *et al.*, 2008. Organization of an Activator-Bound RNA Polymerase Holoenzyme. *Molecular Cell*, 32(3), pp.337–346.
- Bougdoor, A. & Gottesman, S., 2007. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *PNAS*, 104(31), pp.12896–12901.
- Burgess, R. *et al.*, 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221, pp. 43–46
- Burrows, P.C. *et al.*, 2004. Reorganisation of an RNA polymerase – promoter DNA complex for DNA melting. *The EMBO journal*, 23(21), pp.4253–4263.

- Campbell, E.A. *et al.*, 2002. Structure of the Bacterial RNA Polymerase Promoter Specificity sigma Subunit. *Molecular Cell*, 9(3), pp.527–539.
- Cannon, W. *et al.*, 1999. Amino-terminal sequences of σ^N (σ^{54}) inhibit RNA polymerase isomerization. *Genes & development*, 13, pp.357–370.
- Cannon, W., Gallegos, M. & Buck, M., 2001. DNA Melting within a Binary σ^{54} -Promoter DNA Complex. *The journal of biological chemistry*, 276(1), pp.386–394.
- Cardinale, C. *et al.*, 2008. Termination Factor Rho and Its Cofactors NusA and NusG Silence Foreign DNA in *E. coli*. *Science*, 320(5878), pp.935–938.
- Cavanagh, A.T. *et al.*, 2008. Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4 . 2 of σ^{70} . *Molecular Microbiology*, 67(6), pp.1242–1256.
- Cavanagh, A.T. & Wassarman, K.M., 2014. 6S RNA , a Global Regulator of Transcription in *Escherichia coli* , *Bacillus subtilis* , and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, 68, pp.45–60.
- Chadsey, M.S. & Hughes, K.T., 2001. A Multipartite Interaction between Salmonella Transcription Factor σ^{28} and its Anti-sigma Factor FlgM : Implications for σ^{28} Holoenzyme Destabilization Through Stepwise Binding. *Journal of Molecular Biology*, 306, pp.315–929.
- Crouch, M. *et al.*, 2005. The alternative sigma factor σ^E is required for resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium to anti-microbial peptides. *Molecular Microbiology*, 56(3), pp.789–799.
- Dalebroux, Z.D. & Swanson, M.S., 2012. ppGpp : magic beyond RNA polymerase. *Nature reviews microbiology*, 10(3), pp.203–212.
- Débarbouillé, M. *et al.*, 1991. The *Bacillus subtilis* sigL gene encodes an equivalent of σ^{54} from Gram-negative bacteria. *PNAS*, 88, pp.9092–9096.
- Devkota, S.R. *et al.*, 2017. Structural insights into the regulation of *Bacillus subtilis* SigW activity by anti-sigma RsiW. *PLOS one*, 12(3), pp.1–15.
- Dombroski, A.J. *et al.*, 1993. Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes & Development*, 7(12A), pp.2446-55
- Donohue, T.J., 2009. Targeted σ factor turnover inserts negative control into a positive feedback loop. *Molecular Microbiology*, 73(5), pp.747–750.
- Dove, S.L. & Hochschild, A.N.N., 2001. Bacterial Two-Hybrid Analysis of Interactions between Region 4 of the σ^{70} Subunit of RNA Polymerase and the Transcriptional Regulators Rsd from *Escherichia coli* and AlgQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 183(21), pp.6413–6421.
- Dufour, A. & Haldenwang, W.G., 1994. Interactions between a *Bacillus subtilis* Anti- σ Factor (RsbW) and Its Antagonist (RsbV). *Journal of bacteriology*, 176(7), pp.1813–1820.
- Durfee, T. *et al.*, 2008. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(3), pp.1084–1096.
- Epshtein, V. *et al.*, 2010. An Allosteric Mechanism of Rho-dependent Transcription Termination. *Nature*, 463(7278), pp.245–249.

- Fitzgerald, D.M., Bonocora, R.P. & Wade, J.T., 2014. Comprehensive Mapping of the Escherichia coli Flagellar Regulatory Network. *PLoS Genetics*, 10(10), p.1004649.
- Ghosh, P., Ramakrishnan, C. & Chatterji, D., 2003. Inter-subunit recognition and manifestation of segmental mobility in Escherichia coli RNA polymerase : a case study with ω - β' interaction. *Biophysical chemistry*, 103(3), pp.223–237.
- Gildehaus, N. *et al.*, 2007. Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from E . coli : RNA polymerase binding , inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic acids research*, 35(6), pp.1885–1896.
- Goldman, S.R. *et al.*, 2015. The primary σ factor in Escherichia coli can access the transcription elongation complex from solution in vivo. *eLife*, 4(10514), pp.1–17.
- Govan, J.R.W. & Deretic, V., 1996. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis : Mucoïd Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. *Microbiological reviews*, 60(3), pp.539–574.
- Haugen, S.P., Ross, W. & Gourse, R.L., 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature reviews microbiology*, 6(7), pp.507–519.
- Heinrich, J. & Wiegert, T., 2009. Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors. *Research in Microbiology*, 160(9), pp.696–703.
- Helmann, J.D., 1999. Anti-sigma factors. *Current Opinion in Microbiology*, 2, pp.135–141.
- Helmann, J.D., 2006. Deciphering a complex genetic regulatory network : the Bacillus subtilis σ W protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. *Science progress*, 89(3/4), pp.243–266.
- Hesketh, A. *et al.*, 2007. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2). *Genome biology*, 8(8), p.161.
- Hilbert, D.W. & Piggot, P.J., 2004. Compartmentalization of Gene Expression during Bacillus subtilis Spore Formation. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(2), pp.234–262.
- Hnilicová, J. *et al.*, 2014. Ms1 , a novel sRNA interacting with the RNA polymerase core in mycobacteria. *Nucleic acids research*, 42(18), pp.11763–11776.
- Hook-Barnard, I. & Hinton, D.M., 2009. The promoter spacer influences transcription initiation via sigma70 region 1.1 of Escherichia coli RNA polymerase. *PNAS*, 106(3), pp.737–742.
- Hurwitz, J., 2005. The discovery of RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), pp.42477–42485.
- Ishihama, A., 1992. Role of the RNA polymerase α subunit in transcription activation. *Molecular Microbiology*, 6(22), pp.3283–3288.
- Jishage, M. *et al.*, 1996. Regulation of RNA Polymerase Sigma Subunit Synthesis in Escherichia coli : Intracellular Levels of Four Species of Sigma Subunit under Various Growth Conditions. *Journal of bacteriology*, 178(18), pp.5447–5451.
- Keilts, S. & Rosenberg, M., 1987. Constitutive Function of a Positively Regulated Promoter Reveals New Sequences Essential for Activity. *The journal of biological chemistry*, 262(13), pp.6389–6395.

- Keller, A.N. *et al.*, 2014. ϵ , a New Subunit of RNA Polymerase Found in Gram-Positive Bacteria. *Journal of bacteriology*, 196(20), pp.3622–3632.
- Kim, M. *et al.*, 2009. Positive and negative feedback regulatory loops of thiol-oxidative stress response mediated by an unstable isoform of σ R in actinomycetes. *Molecular Microbiology*, 73(5), pp.815–825.
- Krásný, L. *et al.*, 2008. The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 69(1), pp.42–54.
- Krásný, L. & Gourse, R.L., 2004. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *The EMBO journal*, 23(22), pp.4473–4483.
- Krásný, L. *et al.*, 2000. Cloning and Characterization of the *str* Operon and Elongation Factor Tu Expression in *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of bacteriology*, 182(21), pp.6114–6122
- Kriner, M.A. & Groisman, E.A., 2017. RNA secondary structures regulate three steps of Rho-dependent transcription termination within a bacterial mRNA leader. *Nucleic acids research*, 45(2), pp.631–642.
- Kuo, H. *et al.*, 2015. The core-independent promoter-specific binding of *Bacillus subtilis* σ B. *The FEBS journal*, 282, pp.1307–1318.
- Lee, J. & Borukhov, S., 2016. Bacterial RNA Polymerase-DNA Interaction — The Driving Force of Gene Expression and the Target for Drug Action. *Frontiers in molecular biosciences*, 3(73).
- Leibman, M. & Hochschild, A., 2007. A σ -core interaction of the RNA polymerase holoenzyme that enhances promoter escape. *The EMBO journal*, 26(6), pp.1579–1590.
- Lewis, P. *et al.*, 2015. Identification of inhibitors of bacterial RNA polymerase. *Elsevier*, 86, pp.45-50
- Linder, P., Lemeille, S. & Redder, P., 2014. Transcriptome-Wide Analyses of 5'-Ends in RNase J Mutants of a Gram-Positive Pathogen Reveal a Role in RNA Maturation, Regulation and Degradation. *PLoS Genetics*, 10(2), p.1004207.
- Lonetto, M. *et al.*, 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase or factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *PNAS*, 91, pp.7573–7577.
- MacLellan, S.R., Helmann, J.D. & Antelmann, H., 2009. The YvrI Alternative σ Factor Is Essential for Acid Stress Induction of Oxalate Decarboxylase in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 191(3), pp.931–939.
- Magnusson, L.U., Farewell, A. & Nystrom, T., 2005. ppGpp : a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in microbiology*, 13(5), pp.236–242.
- Mathur, J., Davis, B.M. & Waldor, M.K., 2007. Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* σ E regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Molecular Microbiology*, 63(3), pp.848–858.
- Mauri, M. & Klumpp, S., 2014. A Model for Sigma Factor Competition in Bacterial Cells. *PLOS Computational biology*, 10(10), pp.29–34.

- Mecenas, J. *et al.*, 1993. The activity of σ^E , an Escherichia coli heat-inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & Development*, 7, pp.2618–2628.
- Mitchell, J.E. *et al.*, 2003. Identification and analysis of “extended –10” promoters in Escherichia coli. *Nucleic acids research*, 31(16), pp.4689–4695.
- Murakami, K., 2015. Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules*, 5(2), pp.848–864.
- Murakami, K., Masuda, S. & Darst, S.A., 2002. Structural Basis of Transcription Initiation: RNA Polymerase Holoenzyme at 4 Å Resolution. *Science*, 296, pp.1280–1285.
- Murakami, K.S. & Darst, S.A., 2003. Bacterial RNA polymerases: The whole story. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(1), pp.31–39.
- Murray, H.D., Schneider, D.A. & Gourse, R.L., 2003. Control of rRNA Expression by Small Molecules Is Dynamic and Nonredundant. *Molecular Cell*, 12(1), pp.125–134.
- Nagler, K. *et al.*, 2016. Identification of Differentially Expressed Genes during Bacillus subtilis Spore Outgrowth in High-Salinity Environments Using RNA Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 7(1564), pp.1–15.
- Nannapaneni, P. *et al.*, 2012. Defining the structure of the general stress regulon of Bacillus subtilis using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology*, 158, pp.696–707.
- Osanai, T. *et al.*, 2005. Positive Regulation of Sugar Catabolic Pathways in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 by the Group 2 σ Factor SigE. *The journal of biological chemistry*, 280(35), pp.30653–30659.
- Österberg, S., Peso-Santos, T. Del & Shingler, V., 2011. Regulation of Alternative Sigma Factor Use. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), pp.37–55.
- Paget, M.S., 2015. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), pp.1245–65.
- Paget, M.S.B. & Helmann, J.D., 2003. The σ^{70} family of sigma factors. *Genome biology*, 4(203), pp.1–6.
- Park, J. & Roberts, J.W., 2006. Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *PNAS*, 103(13), pp.4870–4875.
- Parshin, A. *et al.*, 2015. DksA regulates RNA polymerase in Escherichia coli through a network of interactions in the secondary channel that includes Sequence Insertion 1. *PNAS*, 112(50), pp.6862–71.
- Patikoglou, G.A. *et al.*, 2007. Crystal structure of the Escherichia coli regulator of σ^{70} , Rsd, in complex with σ^{70} domain 4. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), pp.649–659.
- Pemberton, I.K. *et al.*, 2000. The G+C-rich discriminator region of the tyrT promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *Journal of Molecular Biology*, 299(4), pp.859–864.
- Penas, A.D. Las, Connolly, L. & Gross, C., 1997. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in Escherichia coli is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . *Molecular Microbiology*, 24(2), pp.373–385.

- Piccirilli, J.A. & Koldobskaya, Y., 2011. Crystal structure of an RNA polymerase ribozyme in complex with an antibody fragment. *Philosophical transactions B of the royal society*, 366(1580), pp.2918–2928.
- Potrykus, K. & Cashel, M., 2008. (p)ppGpp : Still Magical ? *Annual Review of Microbiology*, 62, pp.35–51.
- Rabatinová, A. *et al.*, 2013. The δ Subunit of RNA Polymerase Is Required for Rapid Changes in Gene Expression and Competitive Fitness of the Cell. *Journal of bacteriology*, 195(11), pp.2603–2611.
- Richardson, J.P., 2002. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochimica et biophysica acta*, 1577, pp.251–260.
- Ruff, E.F., Record, M.T. & Artsimovitch, I., 2015. Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*, 5(2), pp.1035–62.
- Saecker, R., Record, T. & DeHaseth, P.L., 2011. Mechanism of Bacterial Transcription Initiation: RNA Polymerase - Promoter Binding, Isomerization to Initiation- Competent Open Complexes, and Initiation of RNA Synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), pp.754–771.
- Saini, S. *et al.*, 2011. Continuous control of flagellar gene expression by the σ_{28} – FlgM regulatory circuit in Salmonella enterica. *Molecular Microbiology*, 79(1), pp.264–278.
- Schneider, D.A. & Gourse, R.L., 2003. Changes in Escherichia coli rRNA promoter activity correlate with changes in initiating nucleoside triphosphate and guanosine 5' diphosphate 3'-diphosphate concentrations after induction of feedback control of ribosome synthesis. *Journal of bacteriology*, 185(20), pp.6185–6191.
- Schöbel, S. *et al.*, 2004. The Bacillus subtilis σ^W anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Molecular Microbiology*, 52(4), pp.1091–1105.
- Schwartz, E.C. *et al.*, 2008. A Full Length Group 1 Bacterial Sigma Factor Adopts a Compact Structure Incompatible with DNA Binding. *Chemical biology*, 15(10), pp.1091–1103.
- Sengupta, S., Prajapati, R.K. & Mukhopadhyay, J., 2015. Promoter Escape with Bacterial Two-component σ Factor Suggests Retention of σ Region Two in the Elongation complex. *The journal of biological chemistry*, 290(47), pp.28575–28583.
- Serizawa, M. *et al.*, 2004. Systematic analysis of SigD-regulated genes in Bacillus subtilis by DNA microarray and Northern blotting analyses. *GENE*, 329, pp.125–136.
- Sevcikova, B. *et al.*, 2010. The Anti-Anti-Sigma Factor BldG Is Involved in Activation of the Stress Response Sigma Factor σ^H in Streptomyces coelicolor A3 (2). *Journal of bacteriology*, 192(21), pp.5674–5681.
- Sharma, U.K. & Chatterji, D., 2010. Transcriptional switching in Escherichia coli during stress and starvation by modulation of σ^{70} activity. *Fems microbiology reviews*, 34, pp.646–657.
- Shechner, D.M. *et al.*, 2009. Crystal Structure of the Catalytic Core of an RNA-Polymerase Ribozyme. *Science*, 326(5957), pp.1271–1275.
- Sojka, L. *et al.*, 2011. Rapid changes in gene expression: DNA determinants of promoter regulation by the concentration of the transcription initiating NTP in Bacillus subtilis. *Nucleic acids research*, 39(11), pp.4598–4611.

- Southern, E. & Merrick, M., 2000. The role of Region II in the RNA polymerase σ factor σ^N (σ^{54}). *Nucleic acids research*, 28(13), pp.2563–2570.
- Srivatsan, A. & Wang, J.D., 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), pp.100–105.
- Staron, A. *et al.*, 2009. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. *Molecular Microbiology*, 74(3), pp.557–581.
- Steinchen, W. *et al.*, 2015. Catalytic mechanism and allosteric regulation of an oligomeric (p)ppGpp synthetase by an alarmone. *PNAS*, 112(43), pp.13348–53.
- Steitz T.A. *et al.*, 1994. A unified polymerase mechanism for nonhomologous Dna and Rna-polymerases. *Science*, 266, pp.2022–5.
- Stuten, B. *et al.*, 2013. Mapping the Spatial Neighborhood of the Regulatory 6S RNA Bound to Escherichia coli RNA Polymerase Holoenzyme. *Journal of Molecular Biology*, 425(19), pp.3649–3661.
- Tagami, S. *et al.*, 2010. Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein. *Nature*, 468(7326), pp.978–982.
- Testerman, T.L. *et al.*, 2002. The alternative sigma factor σ^E controls antioxidant defences required for Salmonella virulence and stationary-phase survival. *Molecular Microbiology*, 43(3), pp.771–782.
- Trotochaud, A.E. & Wassarman, K.M., 2004. 6S RNA Function Enhances Long-Term Cell Survival. *Journal of bacteriology*, 186(15), pp.4978–4985.
- Tsujikawa, L., Tsodikov, O. V & DeHaseth, P.L., 2002. Interaction of RNA polymerase with forked DNA: Evidence for two kinetically significant intermediates on the pathway to the final complex. *PNAS*, 99(6), pp.3493–8.
- Vassylyev, D.G. *et al.*, 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6Å resolution. *Nature*, 417(13), pp.712–719.
- Vrentas, C.E. *et al.*, 2008. Still Looking for the Magic Spot: The Crystallographically Defined Binding Site for ppGpp on RNA Polymerase Is Unlikely to Be Responsible for rRNA Transcription Regulation. *Journal of Molecular Biology*, 377(2), pp.551–564.
- Wang, Y. *et al.*, 1997. Determinants for Escherichia coli RNA Polymerase Assembly within the β Subunit. *Journal of Molecular Biology*, 270(5), pp.648–662.
- Wassarman, K.M. & Storz, G., 2000. 6S RNA Regulates E. coli RNA Polymerase Activity. *Cell*, 101, pp.613–623.
- Weiss, A. & Shaw, L.N., 2015. Small things considered: the small accessory subunits of RNA polymerase in Gram-positive bacteria. *Fems microbiology reviews*, 39(4), pp.541–554.
- Westblade, L.F. *et al.*, 2004. Studies of the Escherichia coli Rsd – σ^{70} Complex. *Journal of Molecular Biology*, 335, pp.685–692.
- Wiedermannova, J. *et al.*, 2014. Characterization of Held, an interacting partner of RNA polymerase from Bacillus subtilis. *Nucleic acids research*, 42(8), pp.5151–5163.

- Wigneshweraraj, S.R. *et al.*, 2001. Regulatory Sequences in Sigma 54 Localise Near the Start of DNA Melting. *Journal of Molecular Biology*, 306, pp.681–701.
- Wigneshweraraj, S.R., Casaz, P. & Buck, M., 2002. Correlating protein footprinting with mutational analysis in the bacterial transcription factor σ 54 (σ N). *Nucleic acids research*, 30(4), pp.1016–1028.
- Wilson, C. & Dombroski, A.J., 1997. Region 1 of σ 70 is Required for Efficient Isomerization and Initiation of Transcription by Escherichia coli RNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 267(1), pp.60–74.
- Winkelman, J.T. *et al.*, 2015. Crosslink Mapping at Amino Acid-Base Resolution Reveals the Path of Scrunched DNA in Initial Transcribing Complexes. *Molecular Cell*, 59(5), pp.768–780.
- Xu, X. *et al.*, 2016. Role of ppGpp in Pseudomonas aeruginosa acute pulmonary infection and virulence regulation. *Microbiological Research*, 192, pp.84–95.
- Yin, Y. *et al.*, 2013. Evidence for Sigma Factor Competition in the Regulation of Alginate Production by Pseudomonas aeruginosa. *PLOS one*, 8(8), p.72329.
- Young, B.A. *et al.*, 2001. A Coiled-Coil from the RNA Polymerase β' Subunit Allosterically Induces Selective Nontemplate Strand Binding by σ 70. *Cell*, 105, pp.935–944.
- Zhang, G. *et al.*, 1999. Crystal Structure of Thermus aquaticus Core RNA Polymerase at 3 . 3 Å Resolution. *Cell*, 98(6), pp.811–824.
- Zhang, G. & Darst, S.A., 1998. Structure of the Escherichia coli RNA Polymerase alpha Subunit Amino-Terminal Domain. *Science*, 281(5374), pp.262–266.
- Zhang, N. & Buck, M., 2015. A Perspective on the Enhancer Dependent Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules*, 5, pp.1012–1019.
- Zhang, Y. *et al.*, 2012. Structural basis of transcription initiation. *Science*, 338(6110), pp.1076–1080.