

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tomáš Kučera

Regulační sítě řízené faktory sigma RNA polymerázy v *Corynebacterium glutamicum*

Regulatory networks controlled by sigma factors of RNA polymerase in

Corynebacterium glutamicum

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Miroslav Pátek, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení

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

V Praze, 08. 08. 2018

.....

Tomáš Kučera

Poděkování

Děkuji Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. za cenné připomínky, rady a vstřícnost během vypracování této bakalářské práce.

Abstrakt

Důležitou vlastností bakterií je schopnost přizpůsobit se změně prostředí pomocí regulace exprese genů. Úroveň exprese genů a její načasování závisí hlavně na aktivaci nebo represi daného genu transkripčními regulátory a rozpoznání příslušného promotoru faktorem sigma, který je podjednotkou RNA polymerázy. Transkripční regulátory společně s faktory sigma a dalšími řídicími elementy tvoří komplexní regulační síť.

Regulační síť v *Corynebacterium glutamicum* je díky sekvenaci genomu a aplikaci řady technik na úrovni genomu jednou z nejlépe prostudovaných v rámci grampozitivních bakterií. Bylo dosaženo mnoha úspěchů v porozumění rolí jednotlivých regulátorů a interakcí mezi regulátory v závislosti na změnách prostředí.

Tato práce shrnuje dosud známé poznatky vzájemných vztahů mezi faktory sigma, vlivu faktorů sigma na transkripčními regulátory a jejich společné působení na iniciaci transkripce. V práci je schématicky vytvořena regulační síť faktorů sigma v *C. glutamicum* a regulační kaskáda v reakci na stresovou situaci.

Klíčová slova: faktor sigma (FS), *Corynebacterium glutamicum*, transkripční regulátor (TR), transkripce, regulace

Abstract

An important feature of bacteria is an ability to adapt to changing environment by regulating gene expression. Level of gene expression and its right timing depends mainly on activation or repression of the gene by transcriptional regulators and recognition of the respective promoter by the sigma factor which is a subunit of RNA polymerase. Transcription regulators with sigma factors and other control elements, form a complex regulatory network.

The regulatory network in *Corynebacterium glutamicum* is one of the best studied networks among gram-positive bacteria owing to genome sequencing and application of a number of techniques at the genome level. There has been a lot of success in understanding the roles of individual regulators and interactions between regulators in response to changes in environment.

This work summarizes currently known knowledge of mutual relationships between sigma factors, the influence of sigma factors on transcriptional regulators and their cooperative effect on the initiation of transcription. In the thesis, a regulatory network of sigma factors in *C. glutamicum* and a regulatory cascade in response to the stress situation is schematically created.

Key words: sigma factor (FS), *Corynebacterium glutamicum*, transcription regulator (TR), transcription, regulation

Seznam použitých zkratek

A	adenine	adenin
AMK	amino acid	aminokyselina
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
C	cytosine	cytosin
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dTTP	deoxythymidine triphosphate	deoxythymidin trifosfát
ECF	extracytoplasmic function	extracytoplazmatická funkce
FAS	anti-sigma factor	faktor anti-sigma
FS	sigma factor	faktor sigma
G	guanine	guanin
HSP	heat shock protein	protein teplotního šoku
kDa	kilo dalton	kilodalton
Mbp	mega base pair	milion párů bází
MK	mycolic acid	mykolová kyselina
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAPs	nucleoid-associated proteins	proteiny asociované s nukleoidem
nt	nucleotide	nukleotid
PPP	pentose phosphate pathway	pentózofosfátový cyklus
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RNAP	RNA polymerase	RNA polymeráza
T	thymine	thymin
TR	transcription regulator	transkripční regulátor
WT	wild-type	divoký kmen

Poznámka:

V této práci používám výraz sigma-dependentní, který může být považován za anglicismus. Slovní spojení je vytvořeno analogicky podle slovníku Terminologie molekulární biologie od prof. RNDr. Stanislav Rosypala, DrSc. ze slovního spojení DNA-dependentní RNA polymeráza.

Obsah

1	Úvod	1
2	Transkripce.....	2
2.1	Interakce v promotorové sekvenci	3
2.2	Regulace iniciace transkripce	4
3	Faktory sigma	6
3.1	Funkce faktorů sigma.....	6
3.2	Struktura faktorů sigma.....	6
3.3	Regulace aktivity faktorů sigma	9
3.3.1	Faktory anti-sigma	10
4	Bakterie <i>C. glutamicum</i>	11
4.1	Představení <i>C. glutamicum</i>	11
4.1.1	Genom <i>C. glutamicum</i>	12
4.2	Faktory sigma <i>C. glutamicum</i>	12
4.2.1	Faktor sigma A	12
4.2.2	Faktor sigma B	14
4.2.3	Faktor sigma C	15
4.2.4	Faktor sigma D	16
4.2.5	Faktor sigma E	16
4.2.6	Faktor sigma H.....	17
4.2.7	Faktor sigma M.....	19
4.3	Vzájemná regulace faktorů sigma v <i>C. glutamicum</i>	20
4.4	Transkripční regulátory <i>C. glutamicum</i>	23
4.4.1	Regulátory spřažené se SigH	24
4.4.2	Kooperace regulátorů při odpovědi na tepelný šok.....	26
4.4.3	Kooperace regulátorů při odpovědi na oxidativní stres.....	27
5	Závěr	29
6	Seznam použité literatury.....	30

1 Úvod

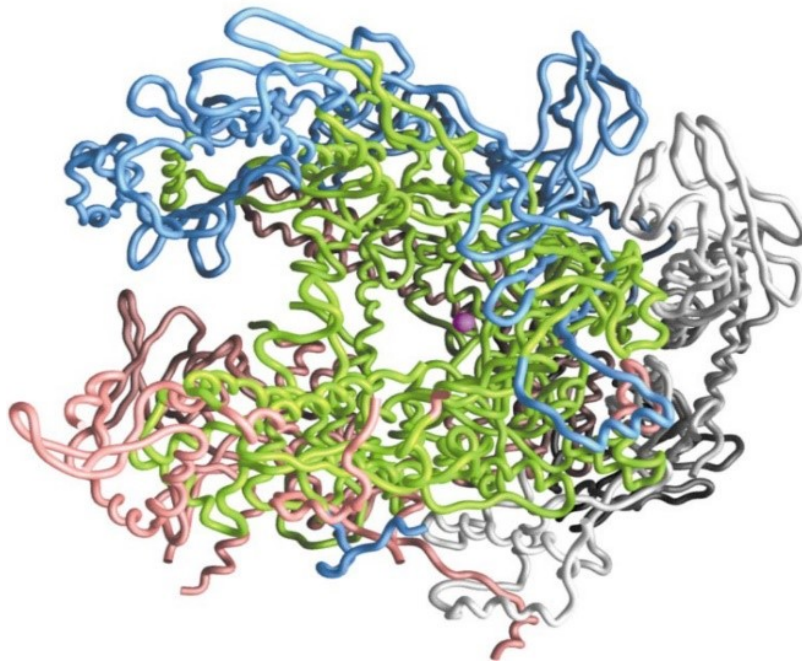
V průběhu evoluce osídlily bakterie nejrůznější životní prostředí a přizpůsobily se rozmanitým, často i nehostinným podmínkám. Tato adaptace na život v nových ekologických nikách byla umožněna jen díky systému regulace genové exprese, který zprostředkoval schopnost reagovat na změny okolního prostředí. Přestože jednotlivé druhy bakterií prošly odlišným vývojem a žijí v různých prostředích, stojí bakteriální regulační síť na společných základech. Transkripce bakteriálních genů je zajišťována enzymem RNA polymeráza. Rozpoznání a umístění RNA polymerázy na sekvenci promotoru je podmíněno interakcí s faktory sigma, které zajišťují hlavní úroveň regulace transkripce. Sekvence aminokyselin a počet FS je unikátní pro každý bakteriální kmen a odráží vývoj a přizpůsobení se na danou ekologickou niku. Regulace transkripce je kontrolována na více úrovních např. transkripčními regulátory. Tento víceúrovňový systém regulace vytváří v buňkách komplexní regulační síť.

Tato bakalářská práce si klade za cíl charakterizaci faktorů sigma a popsání jejich řídicí role v rámci regulační sítě v buňkách *Corynebacterium glutamicum*. Probírán bude také vliv interakcí faktorů sigma s transkripčními regulátory označovanými dle kategorizace, kterou popsali Schröder a Tauch (2010) jako lokální, hlavní (*master*) a globální. Popsané regulátory řízené faktorem σ^H se účastní odpovědi na tepelný a oxidativní stres, jejíž průběh v buňkách *C. glutamicum* bude popsán.

2 Transkripce

Genetická informace uložená v DNA je do mediátorové RNA (*messenger RNA*, mRNA) prepisována procesem transkripce. Tento děj probíhá u bakterií ve volné cytoplazmě, jelikož bakteriální buňka postrádá organelu schraňující nukleoid. Organizace genomu bakterií je vysoce efektivní a obsahuje minimální množství nekódujících sekvencí. Geny společné biochemické dráhy jsou zpravidla organizovány do operonu, souboru genů, který je regulován ze společného promotoru. Tím je zefektivněna regulace exprese genů nezbytných pro jednotlivé reakce metabolické dráhy. Před dokončením syntézy transkriptu je zahájen proces translace mRNA do sekvence aminokyselin.

Klíčovým enzymem, který zajišťuje transkripci, je DNA-dependentní RNA polymeráza (*RNA polymerase*, RNAP), jež se skládá z podjednotek $\alpha_2\beta\beta'\omega$. Tyto podjednotky jsou evolučně konzervované napříč celou bakteriální říší. Podjednotky zaujímají tzv. strukturu krabího klepete nejčastěji o hmotnosti 400 kDa (Zhang et al., 1999) (Obrázek 1).



Obrázek 1 - Struktura RNA polymerázy: Jádru RNAP je tvořeno homodimerem α_2 (bílá), jehož funkcí je držet pohromadě podjednotky β a β' . Zároveň podjednotky α tvoří C-konec RNAP, který umožňuje interakce s různými transkripčními faktory. Podjednotka ω (bílá) stabilizuje komplex $\alpha_2\beta$. Velké podjednotky β' (růžová) a β (modrá) mají evolučně konzervované úseky (zelené), ale existují i úseky charakteristické pro evoluci daného bakteriálního kmene. V tomto obrázku jsou úseky specifické pro bakterii *Thermus aquaticus* označeny růžově a modře. Podjednotky β a β' tvoří katalytický kanál, kterým vstupuje dvouvláknová DNA. Katalytický ion Mg^{2+} (fialová) se nachází hluboko uvnitř kanálu a orientuje DNA do katalytického místa. Převzato z A. Darst (2001).

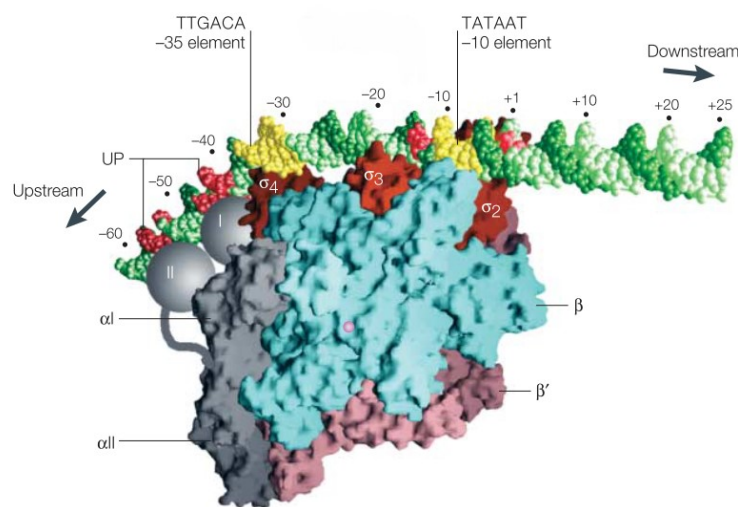
Interakce podjednotky sigma s katalytickým jádrem RNAP umožňuje zahájit iniciaci transkripce (Murakami, 2015). Po zahájení syntézy mRNA sigma podjednotka disociuje. V některých případech po zahájení syntézy nastává tzv. abortivní fáze, jelikož dochází k syntéze několika krátkých úseků mRNA o velikosti přibližně 16 nukleotidů (nt). Tyto úseky indukují odsunutí poddomény $\sigma_{3.2}$, jež blokuje výstupní místo mRNA na RNAP. Poté může holoenzym RNAP přejít do fáze elongace (Nickels et al., 2005). Terminace transkripce se uskuteční pomocí RNA smyčky, nebo proteinu ρ (Gusarov & Nudler, 1999).

2.1 Interakce v promotorové sekvenci

Každému genu nebo operonu předchází promotor, který je nezbytný pro jeho přepis. Promotor je sekvence v nekódující části DNA, jež umožňuje rozpoznat počátek transkripce. V genomu bakterií se může nacházet až několik tisíc promotorů, přičemž promotory příbuzných bakterií jsou ortologní (Rhodius et al., 2013). Rozpoznání sekvence promotoru je úkolem faktorů sigma (*sigma factor*, FS). Každý z FS rozpoznává určitou třídu promotorů, která má svoji specifickou konvenční (konsensus) sekvenci, jež je charakteristická pro daný regulon. Rozpoznávaná sekvence je více či méně odlišná od konvenčních sekvencí ostatních tříd promotorů. FS se váží na RNAP pomocí proteinových aktivátorů nebo podnětů z vnějšího prostředí. Pouze FS vázaný do katalytického jádra RNAP je schopen rozpoznat specifickou sekvenci promotoru (Borukhov & Severinov, 2002). RNAP se v bakteriální buňce nachází nerovnoměrně na různých úsecích DNA. Jedním z důvodů nerovnoměrného rozložení RNAP mezi jednotlivými promotory je variabilita sekvence promotoru od konvenční sekvence. Rozpoznání promotorové sekvence zefektivňují proteiny vázající se jak na motiv -35, tak i na motiv -10. Nerovnoměrné rozložení také způsobují transkripční aktivátory a represory či mechanická stavba DNA. Podobnost mezi konvenční a odlišnou sekvencí promotoru není vždy rozhodující pro jeho sílu (aktivitu). Cílem příslušného promotoru není zajištění nejvyšší možné síly, ale přizpůsobení aktivity transkripce požadavkům buňky. Ačkoli odlišná síla promotoru poskytuje užitečný způsob kontroly transkripce, nejedná se o dynamické řízení reagující na změny v prostředí (Browning & Busby, 2004; Davis et al., 2017; Feklistov et al., 2014).

Faktor σ se vždy skládá z domén σ_2 a σ_4 a v některých případech i z doplňkových domén σ_1 a σ_3 . Pouze domény σ_2 , σ_3 a σ_4 mají vliv na rozpoznání sekvence promotoru

(Browning & Busby, 2004). Nejdůležitější roli zastává doména σ_2 , která je schopna se vázat na motiv -10 a současně zajišťuje rozvolnění dvoušroubovice DNA (Feklistov & Darst, 2011). Doména σ_4 rozpoznává motiv -35 a rovněž umožňuje interakce transkripčních aktivátorů s RNAP (Campbell et al., 2002). V oblasti promotoru se může nacházet také sekvence -10 rozšiřujícího motivu rozpoznávaná doménou σ_3 a UP element, který se vyskytuje před -35 motivem, rozpoznávaný C-koncovou doménou RNAP (Browning & Busby, 2004; Ross et al., 2001) (Obrázek 2). V průběhu iniciace transkripce probíhají dynamické změny ve vazbách mezi FS, RNAP a promotorem (Davis et al., 2017).



Obrázek 2 - Interakce RNAP a promotoru - Model odvozený z výsledků krystalografických studií znázorňuje interakce mezi jednotlivými podjednotkami RNAP a elementy DNA vlákna. Převzato z Browning and Busby (2004).

2.2 Regulace iniciace transkripce

Regulace exprese jednotlivých genů je rozhodujícím prvkem pro adaptaci buňky na podmínky prostředí, růst a rozmnožování buněk. Pro většinu genů v bakteriální buňce je klíčovým regulačním krokem rozpoznání promotoru a iniciace transkripce. Iniciace transkripce může být regulována na úrovni formování a aktivity RNAP nebo rozpoznání promotoru. Regulační mechanismy mohou ovlivňovat aktivitu samotné RNA polymerázy nebo dostupnost a afinitu promotoru (Browning & Busby, 2016).

Nejvýznamnější částí regulace iniciace transkripce je ovlivňování aktivity FS, které je popsáno v kapitole „Regulace podjednotek sigma“.

U bakterií řádu *Actinomycetales* byly popsány regulátory, které se stejně jako FS podílejí na regulaci iniciace transkripce. Jsou rozděleny do skupin RbpA a CarD,

jejichž úkolem je vázat a stabilizovat komplex promotor=RNAP (Flentie et al., 2016). RbpA interaguje přímo s doménou σ_2 FS a je orientován směrem k DNA, se kterou vytváří přímé stabilizační vazby (Hubin et al., 2015). C-koncová doména proteinu CarD vytváří stabilizační vazby komplementární k vazbám RbpA, zatímco N-koncová doména interaguje s podjednotkou β RNAP. Proteiny RbpA a CarD během stabilizace otevřeného komplexu promotor=RNAP pravděpodobně spolupracují (Bae et al., 2015; Srivastava et al., 2013).

Další možností regulace iniciace transkripce je vytváření úseků, tvořených vyššími strukturními motivy DNA, které zabraňují přístupu RNAP k promotoru. K této změně struktury DNA dochází jen v malé části genomu. Změnu struktury genomu zajišťují proteiny asociované s nukleoidem (*nucleoid-associated proteins*, NAPs), mezi které patří IHF, FIS, HU a H-NS (popsané v *Escherchia coli*). Koncentrace proteinů NAPs se mění v závislosti na růstových podmínkách, tudíž jsou změny struktury DNA dynamické a řízené změnami vnějších podmínek. NAPs mohou mít specifickou vazebnou sekvenci nebo se na DNA vázat náhodně. Přestavby mají stimulační, nebo inhibiční vliv na transkripci v závislosti na tvorbě pozitivních nebo negativních nadšroubovic (Browning & Busby, 2004, 2016).

Transkripční regulátory (*transcription regulator*, TR) vázající se na promotor mají různé strukturní motivy a rozpoznávají specifické sekvence promotoru. Nejčastěji se vyskytuje motiv *helix-turn-helix*, který rozpoznává sekvenci o 4–5 nt. Jelikož daná sekvence o 5 nt vzniká ve vlákně DNA velmi často, pravděpodobnost vazby na daný promotor se zvyšuje buď pomocí dimerizace TR, nebo asociací s jiným DNA vazebným proteinem. Klíčová role TR spočívá v propojení aktivity promotoru v závislosti na změnách vnějších podnětů. Regulace promotorů transkripčními regulátory vytváří síť, která je tvořena lokálními, *master* a globálními regulátory, jejichž funkcí je koordinované řízení distribuce RNAP mezi různými promotory, a tím řízení exprese genů (Browning & Busby, 2016).

Jiné faktory dokáží snížit počet molekul RNAP schopných vytvořit komplex s FS nebo promotorem. Příkladem je 180 nt dlouhá nekódující RNA, tzv. 6S RNA, která interaguje s RNAP a tím ji inhibuje (Cavanagh & Wassarman, 2014). Aktivitu RNAP dokáží měnit faktory označované jako *appropriators*, které se zaměřují za části RNAP, čímž změni afinitu a rozpoznávanou sekvenci promotoru. Tím se umožní rozpoznání

a exprese jiného genu. Tyto přestavby byly poprvé pozorovány u bakterií napadených fágem T4 (Browning & Busby, 2016; Hinton, 2010).

3 Faktory sigma

3.1 Funkce faktorů sigma

K rozpoznání promotorů dochází ve všech případech pomocí FS, které se v bakteriální buňce nachází v různých skupinách a množství. Tyto skupiny vedle sebe koexistují a interagují s určitým množstvím RNAP. FS při stimulaci vnějšími impulzy vytěsňuje ostatní FS vázané v katalytickém centru RNAP za možného vzniku dominance jednoho z FS (Maeda, 2000). FS rozpoznávají promotor jak v ideálních růstových podmínkách, tak i při neobvyklých fyziologických a vývojových situacích (Salgado et al., 2001). FS zajišťují tři hlavní funkce: specifické rozpoznání promotoru, umístění RNA polymerázy na cílový promotor a usnadnění rozvíjení DNA v oblasti -10 motivu (Gross et al., 1998).

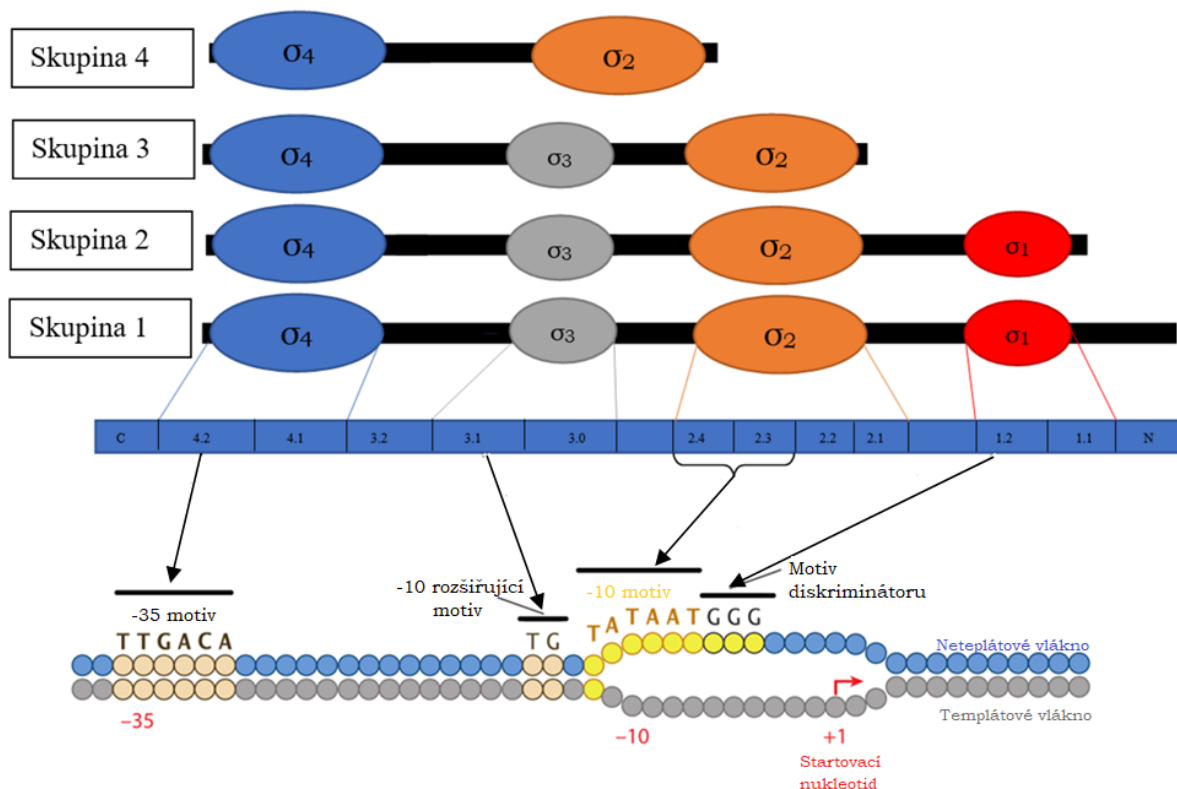
3.2 Struktura faktorů sigma

Faktory σ lze rozdělit do dvou fylogeneticky odlišných rodin σ^{70} a σ^{54} odvozených z modelového organismu *E. coli* (Burgess et al., 1969; Merrick, 1993). První rodinou jsou faktory σ^{54} pojmenované podle své hmotnosti 54 kDa. Druhou rodinou jsou faktory σ^{70} , které nejsou homologní s faktory σ^{54} (Merrick, 1993). Faktory σ^{70} (o hmotnosti 70 kDa v *E. coli*) jsou hlavní rodinou v říši bakterií. Geny kódující FS rodiny σ^{70} se nachází ve všech bakteriálních genomech, a to ve velkém množství alternativních forem. Faktory σ^{54} jsou zastoupeny jen u malé části bakterií a v mnoha případech pouze v jedné variantě (Buck et al., 2000; Studholme & Buck, 2000).

Rodinu σ^{70} lze rozdělit do čtyř skupin podle struktury a fyziologických funkcí (Gruber & Gross, 2003). I přes odlišnou stavbu jednotlivých skupin mohou FS interagovat se stejnými promotory a vázat se do stejného katalytického centra RNAP. Porovnání sekvencí aminokyselin (*amino acid*, AMK) rodiny σ^{70} napříč různými skupinami bakterií odhalilo, že primární a většina alternativních faktorů σ je homologních ve čtyřech vysoce konzervovaných úsecích AMK, které jsou spojeny flexibilními linkery (Helmann & Chamberlin, 1988; Lonetto et al., 1992). Strukturní podobnost je možné pozorovat u *E. coli* v případě faktorů σ^H a σ^E , které řídí odpovědi na tepelný šok. U *C. glutamicum* se jedná o faktory σ^E , σ^H a σ^M reagující na povrchový, tepelný a

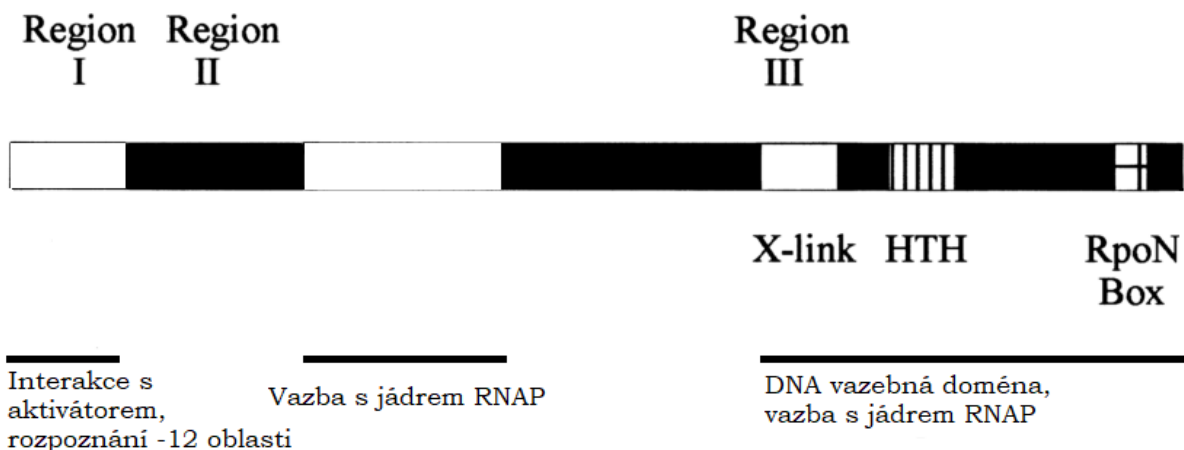
oxidativní šok. V obou těchto organismech jsou tyto FS schopny rozpoznat a řídit expresi ze stejného promotoru (Pátek et al., 2013). Tyto homologie umožňují nejen rozpoznání sekvence promotoru v jednom kmeni, ale i u nepříbuzných bakteriálních druhů (Chandrangsu & Helmann, 2014).

Faktory σ z rodiny σ^{70} se skládají z maximálně čtyř domén ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3, \sigma_4$). Domény σ_2 a σ_4 jsou kódovány ve všech skupinách rodiny σ^{70} (M. Lonetto et al., 1992). Představují tedy základní rozlišující prvek, jelikož FS složené pouze z těchto domén jsou schopny rozpoznávat sekvenci promotoru a zároveň interagovat s katalytickým jádrem RNAP. Z toho plyne vysoká evoluční konzervovanost a tedy i malá možnost strukturní evoluce těchto domén (Gruber & Gross, 2003) (Obrázek 3). Klasifikaci faktorů σ^{70} do skupin (Group) 1, 2, 3 a 4 podle počtu domén navrhli Gruber a Gross (2003). FS ze skupiny 1 se odlišují od ostatních skupin N-koncem dlouhým 70-90 AMK. N-konec není pro FS esenciální, ale jeho přítomnost vede k menší časové náročnosti stabilizace komplexu FS=RNAP=promotor (Wilson & Dombroski, 1997). Další funkcí N-konce je maskování DNA vazebné domény, která se objeví až během interakce s RNAP, kdy dojde ke změně konformace FS (Chandrangsu & Helmann, 2014). Na rozdíl od vegetativních FS rozpoznávají alternativní FS malé množství promotorů (Browning & Busby, 2016). FS skupiny 2 se odlišují od skupiny 1 pouze chybějícím N-koncem. Ostatní strukturní vlastnosti jsou stejné, proto jsou schopny rozpoznávat stejné sekvence promotorů (Gruber & Bryant, 1997). Skupina 3 řídí expresi specifických regulonů za zvláštních fyziologických nebo vývojových podmínek (Manganelli et al., 2004). Skupina 3 stejně jako skupina 4 postrádá doménu σ_1 , která rozpoznává rozšířený -10 motiv (Wösten, 1998). Skupina 4 je nejvíce různorodou skupinou z důvodu úzce zaměřené funkce jednotlivých FS na specifické stresové situace (Lonetto et al., 1994). Některé FS ze skupiny 4 jsou rozšířeny v mnoha bakteriálních kmenech, což značí jejich dávný evoluční původ. Většina jich je ale druhově specifická, čímž se předpokládá jejich vznik v nedávné době. Z tohoto důvodu byla zjištěna korelace mezi počtem genů kódujících FS nacházejících se v genomu jednotlivých bakteriálních kmenů a rozmanitostí ekologické niky, na kterou se daný kmen bakterie adaptoval (Staroň et al., 2009). Při pohledu na čeleď *Corynebacterineae* se ukazuje, že všichni jeho členové mají faktory σ^C , σ^E , σ^H a σ^M , jež řídí geny transkripčně aktivní při různých stresových odpovědích. Ale analýza sekvence AMK domén $\sigma_{2.4}$ a $\sigma_{4.2}$ zjistila jejich velmi nízkou konzervovanost, a to dokonce i mezi takto příbuznými druhy, což potvrzuje nutné přizpůsobení faktorů σ pro život bakterií v odlišných ekologických nikách (Pátek & Nešvera, 2011).



Obrázek 3 - Detail struktury FS rodiny σ^{70} – Schéma znázorňuje základní rozdíly v doménách jednotlivých skupin. Nejsložitější stavbu mají FS ze skupiny 1, která řídí iniciaci transkripce vegetativních genů. Jak lze pozorovat, skupina 2 se od skupiny 1 odlišuje pouze chybějícím N-koncem, ale váže stejné motivy nacházející se v sekvenci promotoru. Skupině 3 a skupině 4 již schází doména σ_1 , která slouží k přechodu komplexu do otevřené pozice. Skupina 3 se nachází u všech pohyblivých bakterií, jelikož řídí syntézu flagelinu. Skupina 4 má pouze domény σ_2 a σ_4 pro rozeznání klíčových sekvencí v oblastech -35 a -10. Modrý obdélník reprezentuje přesnější rozdělení jednotlivých domén FS, hlavní vazebné poddomény a cíle jejich vazeb v sekvenci promotoru. Upraveno dle Paget (2015).

Rodina σ^{54} má jiné konzervované úseky, domény a funkční odlišnosti od rodiny σ^{70} (Obrázek 4). Pouze za pomoci TR a spotřeby ATP je schopen faktor σ^{54} rozpoznat promotor a rozvolnit dvoušroubovici DNA (Morris et al., 1994; Weiss et al., 1991). Faktory σ^{54} rozpoznávají motivy lokalizované v promotoru v oblastech -12 a -24. Geny ovládané touto rodinou řídí hlavně specifické dráhy, jako je asimilace dusičnanů, sporulace nebo syntéza flagelinu (Österberg et al., 2011).



Obrázek 4 – Úseky proteinů rodiny σ^{54} – Schéma ukazuje nejvíce konzervované úseky v rodině σ^{54} . Region III je doména s hlavním vazebnou strukturou na DNA. Region I rozpoznává oblast -12 v sekvenci promotoru. Zajímavostí regionu I je vysoký podíl AMK glutaminu. Region II je různorodější s nadbytkem kyselých zbytků. Převzato z Wösten (1998), doplněno z Bose (2008).

3.3 Regulace aktivity faktorů sigma

V bakteriální buňce je kontrola hladiny a aktivity jednotlivých FS kritickým bodem regulace exprese genů. Pro zpřesnění exprese probíhá regulace FS na mnoha úrovních za použití různých mechanismů. Mezi hlavní mechanismy regulace aktivity FS patří kontrola na úrovni iniciace transkripce. Regulace na této úrovni je pro buňku výhodná z důvodu nízké energetické náročnosti procesu. Další mechanismus se nachází na úrovni regulace translace, kdy se inhibuje nasednutí ribozómu na transkript, tím pádem nedochází k syntéze FS a ani ke zvýšení jeho hladiny v buňce. Ke snížení aktivity FS dochází posttranslačně. Obecným mechanismem regulace na této úrovni je vznik inhibiční vazby mezi FS a příslušným faktorem anti- σ (*factor anti- σ* , FAS). U některých FS s extracytoplasmatickou funkcí (*extracytoplasmic function*, ECF) existuje posttranslační mechanismus, kdy dochází ke snížení aktivity přidáním inhibujícího rozšíření na N-konec. Po odstranění rozšíření dojde k opětovné aktivaci FS. Mezi mechanismy regulace hladiny FS patří proteolytická degradace, kdy jsou FS v buňce rychle degradovány. Proto dochází k jejich neustále syntéze, která je opět regulována podle potřeb buňky. Hladina každého FS je při jakékoli růstové situaci alespoň na bazální úrovni (Chandrangu & Helmann, 2014; Österberg et al., 2011). Cílem fyzické regulace nemůže být interakce RNAP=FS, ale interakce je nepřímo regulována afinitou FS k RNAP, hladinou FS v buňce a dále fyziologickým stavem buňky (Gruber & Gross, 2003).

Tyto úrovně a mechanismy regulace vytvářejí síť, jež umožňuje dynamické přizpůsobení exprese genů reagující na změny v růstových podmínkách.

3.3.1 Faktory anti-sigma

Regulace pomocí FAS patří k široce využívaným způsobům v bakteriální říši. FAS se v buňce vyskytují ve dvou formách jako cytoplazmatické nebo jako vázané na membránu (Österberg et al., 2011). FAS se skládají z domény schopné rozpoznávat a interagovat s faktorem σ a z domény detekující signály reagující na změny vnějšího prostředí. Přijetí signálu způsobí zrušení vazby FAS=FS, čímž dojde k uvolnění aktivního FS. Funkcí FAS je přímá reverzibilní vazba, inhibující aktivitu FS, s doménami FS, které interagují s katalytickým jádrem RNAP. Tato vazba udržuje domény FS v nekompatibilní orientaci k RNAP a současně i promotoru. FAS s FS vytváří multidoménovou vazbu, jelikož vazba pouze jedné domény by nezabránila ostatním doménám FS interagovat s RNAP nebo promotorem. Komplex vzniklý interakcí nekompletního počtu domén FS s RNAP by pravděpodobně nebyl funkční, ale docházelo by ke snížení počtu volných RNAP (Paget, 2015). Regulace příslušnými FAS je doménou skupiny 4. Až třetina FS ze skupiny 4 se nachází ve stejném operonu s příslušným FAS, čímž je zabráněno nadměrné aktivitě FS. FAS se vyznačují stejnou N-koncovou strukturou schopnou tvořit vazbu s doménami σ_4 a σ_2 , tím dojde k inhibici celého FS (Campbell et al., 2003, 2007). FAS stabilizují svoji strukturu různými způsoby jako např. hydrofobními interakcemi nebo strukturou s obsahem Zn^{2+} iontu (Paget, 2015).

Ke zrušení vazby FAS=FS dochází při detekci signálu. Signál může být detekován buď doménou FAS, nebo pomocným proteinem. Detekce doménou FAS způsobí změnu konformace vedoucí k uvolnění FS. U membránového FAS je zvýšena citlivost na detekci extracelulárního signálu. Pomocným proteinem může být např. člen proteolytického aparátu, který daný FAS odbourává. U membránového FAS je nejdříve degradována část zasahující do extracytoplazmatického prostoru, a poté až cytosolické části FAS interagující s FS. Po degradaci FAS dojde k opětovné aktivaci FS (Paget, 2015).

K regulaci aktivity FAS může také docházet přidáním či odebráním fosforu. Minoritní možností regulace aktivity FS patřících do skupiny 3 je tzv. přepínání účastníků, poněvadž se do regulace zapojuje kromě FS a FAS ještě anti-FAS. FAS může vytvářet vazbu jak s FS, tak i anti-FAS. V tomto případě disponuje FAS ještě kinázovou

aktivitou, neboť dokáže regulovat možnost vzniku vazby s anti-FAS prostřednictvím fosforylace. Za nestresových podmínek FAS fosforyluje anti-FAS, čímž blokuje možnost vzniku vazby. Pokud systém zachytí stresový signál, dojde k defosforylaci anti-FAS, čímž se objeví vazebné místo pro FAS. FAS má vyšší afinitu k anti-FAS než k FS, kvůli čemuž dochází k zrušení vazby FAS=FS, vzniku vazby anti-FS=FAS a uvolnění FS (Paget, 2015).

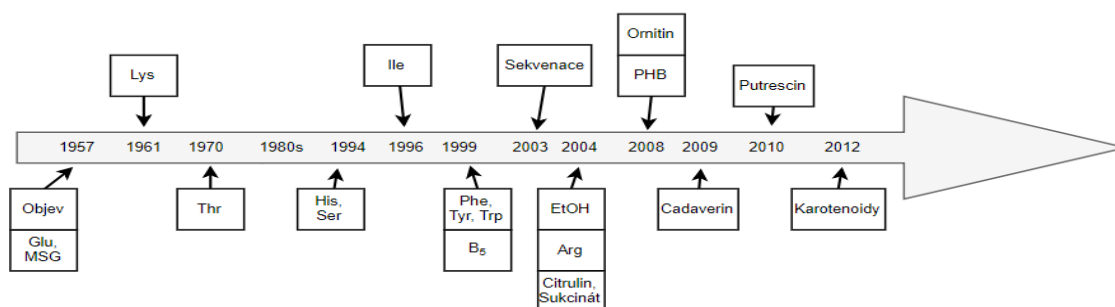
Hlavní funkcí FAS je sice negativní regulace aktivity FS, ale po přijetí signálu se regulace FAS může změnit na pozitivní a stimulovat aktivitu daného FS (Mettrick & Lamont, 2009). Na rozdíl od FS mají FAS velmi různorodou sekvenci i strukturu s výjimkou podobných N-konců (Campbell et al., 2008).

4 Bakterie *C. glutamicum*

4.1 Představení *C. glutamicum*

V roce 1957 byla izolována nepatogenní bakterie *C. glutamicum*, která byla popsána jako krátká, aerobní, gram-pozitivní tyčinka schopná růstu na různých cukrech a organických kyselinách. Největší pozornost přitahovala díky přirozené schopnosti syntetizovat velké množství kyseliny L-glutamové při limitaci růstu biotinem. Průmyslová produkce kyseliny L-glutamové s využitím buněk *C. glutamicum* byla dále zvýšena optimalizací podmínek při kultivaci ve fermentorech (Kinoshita et al., 1957). V biotechnologiích se kmeny *C. glutamicum* využívají díky své lehké kultivovatelnosti a výhodným vlastnostem při laboratorní práci, mezi něž patří: (1) obecně uznávané jako bezpečný organismus (*generally recognized as safe*); (2) rychlý růst do velkých hustot; (3) genetická stabilita bez rekombinantního opravného systému; (4) omezené množství restrikcí modifikačních systémů; (5) nenastává autolýza; (6) schopnost metabolické aktivity v zastaveném růstu; (7) nízká proteázová aktivita, která podporuje produkci rekombinantních proteinů; (8) pružnost primárního a sekundárního metabolismu; (9) široké spektrum využitelných zdrojů uhlíku (Lee et al., 2016). Pro větší uplatnění v potravinářském a farmaceutickém průmyslu se vědci snažili se o zefektivnění produkce aminokyseliny, o objevení drah a genů ovlivňující její produkci. Tím také analyzovaly geny a dráhy vedoucí k dalším AMK jako L-lysinu, L-treoninu, L-izoleucinu či vitamínu D-pantotenátu (Sahm et al., 2000) (Obrázek 5). Kmen *C. glutamicum* patří do třídy *Actinobacteria*, do kterého patří také rody *Mycobacterium* a *Streptomyces*. Blízká příbuznost k druhům *Corynebacterium diphtheriae* a *Mycobacterium tuberculosis*, které způsobují záškrť, respektive

tuberkulózu, umožňuje bezpečný výzkum léků proti těmto bakteriím na kmenech *C. glutamicum* (Pátek & Nešvera, 2011).



Obrázek 5 - Historické a technické milníky v *C. glutamicum* – Na obrázku je vyobrazena šipka představující časovou osu s vyobrazenými roky, ke kterým je vedena šipka s tabulkou upřesňující daný objev v *C. glutamicum*. Upraveno podle Lee (2016).

4.1.1 Genom *C. glutamicum*

Korynebakterie mají z fylogenetické čeledi *Corynebacterineae* nejmenší genom, tvořený jedním kruhovým chromosomem obsahujícím 3,3 Mbp a okolo 3000 genů, a současně nejmenší kódovací hustotu, jež je způsobena vysokým podílem GC párů, které zapříčiňují rozšíření kódovacích oblastí v důsledku nízkého výskytu stop kodónů (Kalinowski et al., 2003; Yukawa et al., 2007).

Sekvenace nukleotidů celého genomu byla stanovena na začátku tisíciletí (Kalinowski et al., 2003). Tento milník lze považovat za počátek nové kapitoly na poli průmyslové mikrobiologie a biotechnologií, který umožnil lepší porozumění a zlepšenou genetickou manipulaci v rámci kmene *C. glutamicum* (Yukawa et al., 2007).

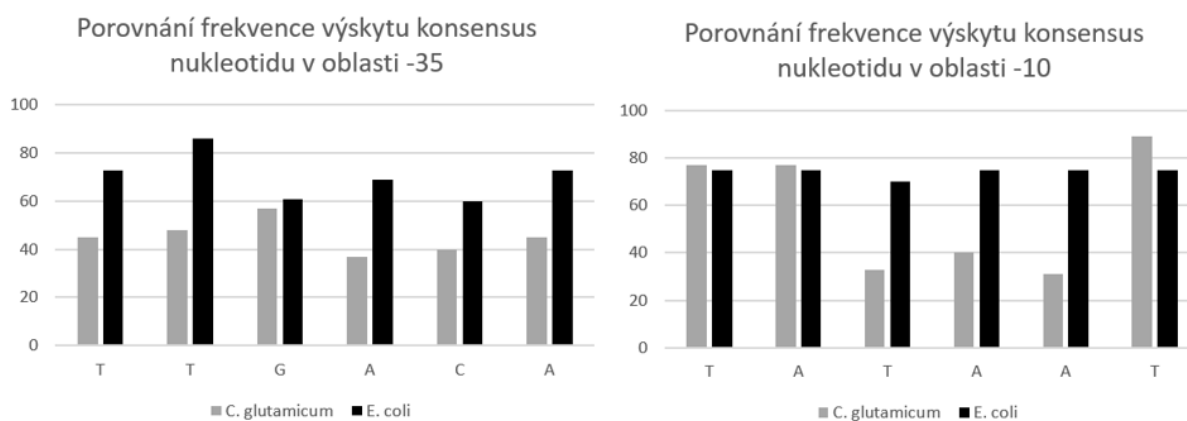
4.2 Faktory sigma *C. glutamicum*

Chromosom *C. glutamicum* obsahuje celkem 7 FS; esenciální σ^A (skupina 1), alternativní σ^B (skupina 2) a FS typu ECF (σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^M). V genomu *C. glutamicum* se nevyskytují FS skupiny 3 (kategorizace dle Gruber a Gross, 2003) a žádný FS patřící do rodiny σ^{54} (Pátek & Nešvera, 2011). Počet FS v *C. glutamicum* je pozoruhodně malý oproti sporulujícím gram-pozitivní bakteriím *Streptomyces coelicolor* (65) či *Bacillus subtilis* (17), ale i oproti příbuzným druhům jako *M. tuberculosis* (17) (Pátek et al., 2003).

4.2.1 Faktor sigma A

V každé bakterii je kódován esenciální FS, jenž se u *C. glutamicum* nazývá σ^A . Provnáním sekvencí AMK domén $\sigma_{2.4}$, $\sigma_{3.0}$, $\sigma_{4.2}$, které tvoří vazbu s promotorem,

s ostatními druhy v čeledi *Corynebacterineae* se zjistilo, že vysoce identické sekvence AMK mají příslušné domény u *C. diphtheriae* a *M. tuberculosis*. Při analýze domén $\sigma_{2.4}$ a $\sigma_{4.2}$ u bakterií *C. glutamicum* a *E. coli* byl objeven velký rozdíl v evoluční konzervovanosti sekvence AMK mezi jednotlivými doménami. U domény $\sigma_{2.4}$ (19 AMK) byla odhalena 90% shoda, zatímco u domény $\sigma_{4.2}$ (28 AMK) byla shoda pouze 66 %. Při porovnání výskytu konvenčních sekvencí v promotorových oblastech -35 a -10 rozpoznávaných vegetativním FS u *C. glutamicum* a *E. coli* se potvrdily výsledky z analýzy sekvence AMK. Konvenční sekvence pro oblast -10 je s vyšší pravděpodobností mezi σ^A -dependentními geny u obou organismů stejná (Obrázek 7). Zatímco konvenční sekvence v oblasti -35 u *C. glutamicum* je méně evolučně konzervována a objevuje se s menší pravděpodobností než konvenční sekvence u *E. coli* (Pátek & Nešvera, 2011) (Obrázek 6).



Obrázek 6 – Pravděpodobnost výskytu nukleotidů v promotorové oblasti -35 – Na grafu je znázorněn hexamer nukleotidů, které byly stanoveny pro oblast -35 jako konvenční sekvence: 5' – TTGACA-3'. Je zřejmé, že konvenční sekvence se v promotorech pro RpoD vyskytuje častěji než pro SigA. Pátek & Nešvera (2011); Shimada (2014), upraveno.

Obrázek 7 – Pravděpodobnost výskytu nukleotidů v promotorové oblasti -10 – Na grafu je znázorněn hexamer nukleotidů, které byly stanoveny pro oblast -10 jako konvenční sekvence: 5' – TATAAT – 3'. Lze zde spatřit vysokou pravděpodobnost 5' – TANNNT – 3', jež patrně bude určující pro vazbu k podjednotce $\sigma_{2.4}$, která má minimální rozdíly mezi *E. coli* a *C. glutamicum*. Pátek & Nešvera (2011); Shimada (2014), upraveno.

Hlavní FS buněk *C. glutamicum* umožňuje transkripci vegetativních genů, jež řídí základní metabolické dráhy a zároveň je zodpovědný za expresi většiny ostatních genů. Jeho nejvyšší aktivita byla pozorována během exponenciální fáze růstu při optimálních podmínkách bez působení stresových faktorů (Larisch et al., 2007; Pátek & Nešvera, 2011). Při působení nepříznivých fyziologických podmínek dochází v buňce ke snižování exprese genu *sigA*, zatímco transkripce příslušného alternativního FS se zvyšuje. K nahrazování faktoru σ^A dochází při přechodu do stacionární fáze růstu, při reakci na teplotní nebo oxidativní stres (Larisch et al., 2007; Nakunst et al., 2007).

Nepřítomnost faktoru σ^A by způsobila smrt buňky. Nemožnost konstrukce kmene s delecí genu *sigA* a jeho bazální exprese při jakékoli fyziologické a vývojové situaci tak komplikuje zkoumání funkcí FS (Pátek & Nešvera, 2011).

4.2.2 Faktor sigma B

Jediný alternativní faktor sigma ze skupiny 2 u *C. glutamicum* je kódován genem *sigB*. Porovnání strukturních rozdílů vegetativního faktoru σ^A a alternativního faktoru σ^B naznačuje, že tyto dva FS jsou schopny rozpoznávat stejné promotory (Ehira et al., 2008). Alternativní faktor σ^B stejně jako σ^A vykazuje velkou podobnost v sekvenci AMK u domén $\sigma_{2.4}$, $\sigma_{3.0}$, $\sigma_{4.2}$ mezi příbuznými druhy *C. diphtheriae* a *M. tuberculosis*. Při srovnání sekvence AMK s faktorem σ^S , který v *E. coli* zastává stejnou funkci, vychází najevo již značně snížená konzervovanost úseků AMK jak u domény $\sigma_{2.4}$ (63 %), tak i u domény $\sigma_{4.2}$ (46 %). To je dáno pravděpodobně již značně odlišným způsobem života a funkční specializací obou faktorů σ (Pátek & Nešvera, 2011).

Výzkum faktoru σ^B ulehčuje jeho neesenciální funkce v buňkách *C. glutamicum*. V kmenech s delecí genu *sigB* se předpokládala zvýšená syntéza faktoru σ^A kvůli možnosti rozpoznávat stejné promotory a tedy regulovat stejné geny. Překvapivě se tento předpoklad experimentálně nepotvrdil a koncentrace faktoru σ^A zůstala na stejné hladině jako u nemanipulovaného kmene (*wild-type*, WT) (Larisch et al., 2007). Geny řízené faktorem σ^B patří do skupin: metabolismus AMK a jejich transport, metabolismus a transport uhlíku, obranné mechanismy během stresu, membránové procesy, metabolismus fosforu a jeho regulace. Ke zvýšené aktivitě faktoru σ^B dochází také v reakci na oxidativní poškození, kyselé prostředí, dále při osmotickém stresu a odpovědích na tepelný nebo chladový šok. Alternativní σ^B se neúčastní pouze odpovědí na různé stresové podmínky, ale uplatňuje se i při exponenciálním růstu buňky (Barreiro et al., 2009; Jakob et al., 2007; Larisch et al., 2007). Při podmínkách nedostatku kyslíku dochází ke zvýšené expresi genu *sigB*. Buňka vykazuje zvýšenou produkci organických kyselin v reakci na vzrůstající spotřebu glukózy. Dochází tedy ke zvýšení exprese genů účastníků se metabolismu glukózy při podmínkách limitace kyslíkem. U buněk s delecí genu *sigB* nedošlo v porovnání s WT ke změně rychlosti růstu ani spotřebě glukózy při kultivaci za aerobních podmínek (Ehira et al., 2008). Faktor σ^B se také uplatňuje v tranzitní fázi růstu, při přechodu mezi exponenciálním a stacionárním růstem, kdy dochází k snížení exprese genu *sigA*. V této fázi růstu dochází k nahrazení faktoru σ^A za faktor σ^B v katalytickém centru RNAP. V pozdější

fázi stacionárního růstu dochází opět k poklesu exprese *sigB* (Larisch et al., 2007). V tranzitní fázi růstu σ^B řídí i biosyntetickou dráhu dTTP, neboť reguluje syntézu proteinu ThyX tvořícího dTMP, důležitého metabolitu v biosyntéze dTTP (Cho et al., 2012; M. Park et al., 2010). Při odpovědi na osmotický stres dochází ke zvýšené expresi proteinů asociovaných s membránou, sekretovaných proteinů a proteinů buněčné stěny. Delece genu *sigB* poté vede ke zvýšené sekreci proteinů do extracytoplazmatického prostoru, přičemž nezávisí na typu signální sekvence ani cílovém umístění proteinu. Předpokládá se, že proteolytická degradace spuštěná faktorem σ^B , může být počáteční reakcí pro adaptaci proteomu na stresové prostředí. Proto delece *sigB* ve stresovém prostředí může podporovat tvorbu vysoce stabilních proteinů (Liebal et al., 2012; Watanabe et al., 2013).

Existují i geny, které jsou negativně ovlivněny zvýšenou expresí genu *sigB*. Může to být pozorováno u genu, který je přepisován pouze faktorem σ^A , kdy při vysoké hladině faktoru σ^B v buňce nastává kompetice mezi oběma FS o RNAP (Larisch et al., 2007).

4.2.3 Faktor sigma C

Faktor σ^C patří mezi alternativní FS skupiny 4. Výzkumy se na odhalení jeho funkcí a vlastností zaměřily až v posledních letech, z tohoto důvodu patří k nejméně prozkoumaným FS v rámci kmene *C. glutamicum*.

Faktor σ^C je zodpovědný za stresovou odpověď při poškození aerobního dýchání, při narušení přenosu elektronů v řetězci, při nedostatečné hladině kyslíku v buňce a při respiraci nitrátu (Inui et al., 2007; Nishimura et al., 2011; Toyoda & Inui, 2016). Promotory rozpoznávané faktorem σ^C řídí expresi genů různých cytochromových komplexů a hem-syntetázy. Hlavní funkcí faktoru σ^C je tedy pozitivní regulace dýchacího řetězce. Delece genu *sigC* způsobí nižší růstovou rychlost bakteriální kultury a vznik dvou fenotypově odlišných typů kolonií. Byl také pozorován nárůst spontánních mutací. Tato zjištění naznačují, že σ^C je důležitý pro růst kultury i za normálních podmínek. Dále bylo pozorováno, že nadprodukce σ^C snížila transkripci genu *sigB* a současně snížila expresi transkripčního regulátoru RamA, z nichž oba mohou ovlivnit expresi σ^C regulonu (Toyoda & Inui, 2016).

I když se gen *sigC* nachází ve stejném operonu jako geny pro syntetázy hemu, tak nedochází k pozitivní autoregulaci (Toyoda & Inui, 2016).

4.2.4 Faktor sigma D

Faktor σ^D (skupina 4) patří podobně jako σ^C k méně prozkoumaným FS u kmene *C. glutamicum*, na nějž se pozornost také upřela až v posledních letech.

Využitím technik pro vytvoření delece či zvýšené exprese genu *sigD* bylo zjištěno, že σ^D zajišťuje udržování integrity buněčné stěny. Faktor σ^D rozpoznává promotory genů, které kódují mykolové kyseliny (*mycolic acid*, MK) a transportují je do membrány. Bylo prokázáno, že 4 ze 6 transferáz mykolových kyselin jsou indukovány faktorem σ^D . Modifikační proteiny MK jsou taktéž pod kontrolou faktoru σ^D . Pokud dojde k inaktivaci faktoru σ^D , zastavení syntézy MK, a tedy snížení jejich obsahu v mykomebráně, překvapivě nedochází k velkému růstovému defektu. Při inaktivaci faktoru σ^D však byla zjištěna zvýšená koncentrace sloučenin obsahující sacharidy v extracelulárním prostoru, což může znamenat buněčnou agregaci (Taniguchi et al., 2017; Toyoda & Inui, 2018). Další studie prokázala, že faktor σ^D řídí expresi proteinů důležitých pro přenos kyslíku. Delece genu *sigD* snižuje schopnost růstu při nízkých koncentracích kyslíku (IKEDA et al., 2009).

Faktor σ^D tvoří se svým příslušným FAS operon. Exprese operonu *sigD-rsdA* ovlivňuje citlivost k antibiotikům zaměřujících se na syntézu peptidoglykanu. Mutant v genu *rsdA* je více rezistentní vůči antibiotikům, což podporuje zjištění pozitivního vlivu faktoru σ^D na syntézu buněčné stěny a současně i samotnou stabilitu buněčné stěny. Delece genu *sigD* vede kvůli tomu ke zvýšené citlivosti na lysozym. Pokud nedochází k inhibici aktivity faktoru σ^D vazbou na FAS, je vyšší hladina faktoru σ^D pro buňku vysoce toxická (Toyoda & Inui, 2018).

4.2.5 Faktor sigma E

Alternativní faktor σ^E z *C. glutamicum* patří také do skupiny 4 tedy ECF. Jeho podobnost v sekvenci AMK s faktorem σ^E z příbuzného bakteriálního druhu *M. tuberculosis* je 63 % (Pátek & Nešvera, 2011). Z experimentů vyplývá, že nehraje důležitou roli při růstu za běžných růstových podmínek, ale u mutanta s delecí *cseE* dochází ke zpomalení růstu. Překvapivě při vytvoření dvojitého mutanta v genech *sigE* a *cseE* se růstová rychlost vrací na úroveň WT. (Park et al., 2008)

Ke zvýšení aktivity faktoru σ^E dochází častěji v mírných stresových podmínkách než za extrémních situacích. Experimenty odhalily zvýšenou aktivitu faktoru σ^E v prostředí s obsahem detergentů. Při odpovědi na tepelný stres dochází nejen ke

zvýšení aktivity faktoru σ^E , ale i ke zvýšené expresi genu *sigE*, jehož transkripce je pod vlivem TR HspR (Barreiro et al., 2009; Park et al., 2008). Metyltransferáza, jejíž expresi řídí faktor σ^E , zajišťuje vyšší rezistenci vůči antibiotikům. Mutanti v genu *sigE* byli totiž více citliví na působení různých druhů antibiotik jako penicilinu, vankomycinu, tetracyklinu nebo chloramfenikolu. Každé z těchto antibiotik se zaměřuje na jiný druh inhibice růstu bakterie, tudíž příčinou zvýšené citlivosti může být zvýšená permeabilita buněčné membrány (Park et al., 2008). Při zpomaleném růstu nastává rovněž zvýšená aktivita faktoru σ^E ovlivňující expresi potřebných genů. Zpomalený růst nastává při limitaci hořčíkem nebo dusíkem a ve stacionární fázi růstu, jelikož se v prostředí buňky nahromadí velké množství nezpracovatelných látek vyvolávajících stres (Barreiro et al., 2009; Park et al., 2008).

Je zřejmé, že σ^E z *C. glutamicum* hraje zcela odlišnou roli od faktorů σ^H a σ^M . Faktory σ^H a σ^M se podílí na regulaci reakcí na tepelný a oxidativní stres, zatímco σ^E se podílí na odpovědi stresu buněčného obalu (Park et al., 2008). ECF faktor σ^E má velmi podobnou konvenční sekvenci promotorů s faktory σ^H a σ^M . Pravděpodobně tedy může docházet k přepisu genů ze stejného promotoru řízeného faktory σ^E , σ^H a σ^M . V *C. glutamicum* byly prozatím pozorovány geny, které jsou přepisovány z promotoru rozpoznávaného jak faktorem σ^E , tak i faktorem σ^H (Pátek & Nešvera, 2011; Šilar et al., 2016).

4.2.6 Faktor sigma H

Faktor σ^H je nejdůležitějším FS typu ECF (skupina 4). Úroveň identity sekvence AMK s orhologem v *M. tuberculosis* dosahuje 69 %. Gen *sigH* je v buňce vždy přepisován na bazální hladině, zatímco k nárůstu aktivity dochází během růstu ve stacionární fázi, čímž se předpokládá aktivita faktoru σ^H za stresových podmínek. Nejvyšší koncentrace faktoru σ^H v buňce je pozorována v reakci na teplotní a oxidativní stres. V bakterii *C. glutamicum* zaujímá σ^H ústřední roli v řízení celé řady genů účastnících se regulace za stresových podmínek. Současně se účastní řízení několika TR a má významnou roli při regulaci transkripce ostatních FS jako jsou faktory σ^B , σ^M či σ^A a FAS CseE (Nakunst et al., 2007; Ehira et al., 2009; Barreiro et al., 2009; Toyoda et al., 2015). Faktor σ^H je tak jedním z kandidátů na zařazení mezi globální regulátory (Schröder & Tauch, 2010).

Mutace v genu *sigH* způsobí při teplotním stresu zastavení růstu (Kim et al., 2005). Při reakci na teplotní stres dochází ke zvýšení exprese genů kódujících proteiny

teplotního šoku (*heat shock protein*, HSP), genů pro Fe-S proteiny a genů účastnících se syntézy mykothiolu a jeho recyklace. Produkty genů z Fe-S shluku byly nalezeny i v buňkách s delecí genu *sigH* při růstu za běžných podmínek, což ukazuje na kontrolu i jiným FS (Toyoda et al., 2015). Při teplotním šoku buňka buď opravuje poškozené proteiny nebo je degraduje pomocí proteáz. Z tohoto důvodu je výhodné řízení bicistrónního operonu *clp* pro podjednotky ATP dependentní Clp proteázy a chaperonů faktorem σ^H . Operon *clp* je regulován pozitivním TR ClgR patřícím rovněž do regulonu σ^H . Ukázalo se, že pro transkripci *clp* operonu není ClgR aktivátor nutný. Existují tedy dvě cesty pro indukci *clp* genů, závislá na okolní teplotě a ClgR, nebo cesta aktivována silným tepelným stresem nezávisle na ClgR (Obrázek 10). Rozpoznání špatně sbaleného proteinu probíhá na základě označení (pupylace) tohoto proteinu prováděném bakteriálním ubiquitin proteinem, který je kódován z σ^H rozpoznávaného genu *pup* (Busche et al., 2012; Engels et al., 2004).

Dalším důležitým genovým shlukem řízeným faktorem σ^H jsou geny pro enzymy pentózofosfátového cyklu (*pentose phosphate pathway*, PPP). Geny v tomto operonu jsou regulovány pomocí dvou σ^H -dependentních promotorů v závislosti na zdroji uhlíku, nebo tepelném a oxidativním stresu. Dráha PPP poskytuje NADPH pro thiooxidativní systém, který je pod kontrolou faktoru σ^M , tudíž nepřímou kontrolou faktoru σ^H . Dráha PPP současně poskytuje substráty i pro biosyntézu flavinu, který je také řízen faktorem σ^H . Vlivem faktoru σ^H je syntéza flavinu pouze zvýšena, protože syntéza probíhá i za běžných růstových podmínek (Toyoda et al., 2015). Další oblastí především nepřímo regulovanou faktorem σ^H je odpověď na oxidativní stres, kdy řídí expresi genu *sigM* (Nakunst et al., 2007). Oxidativním stresem se projevuje i růst na vyčerpaném zdroji uhlíku, a tím zvýšená aktivita faktoru σ^H (Kim et al., 2005).

Důležitou součástí regulonu faktoru σ^H je i operon pro podjednotky F_1F_0 ATPázy, který je optimálně přepisován za pH~9. Tím se ukazuje možnost faktoru σ^H reagovat na změny pH, za zvýšené teploty dochází k represí exprese operonu pro F_1F_0 ATPázu (Barreiro et al., 2009; Barriuso-Iglesias et al., 2013). Mezi nově objevené geny řízené faktorem σ^H patří geny transportního systému typu ABC pro přenos zinku, hořčíku a udržení homeostáze iontů kovů (Toyoda et al., 2015).

Regulon SOS je zahrnut do různých druhů oprav DNA jako nukleotidová výměna nebo rekombinantní opravy. Přepis genů z SOS regulonu je řízen na mnoha úrovních.

Faktor σ^H je pouze jedním z prvků této kaskády, kdy v regulonu SOS řídí pouze geny pro Uvr proteiny (Busche et al., 2012).

Schopnost faktoru σ^H zvyšovat expresi genu *sigB*, který rozpoznává i σ^A -dependentní promotory, dává silný předpoklad k možnosti nepřímé regulace velkého množství genů faktorem σ^H . Další geny jsou nepřímo pod kontrolou faktoru σ^H řídicího expresi genu *sigM* (Nakunst et al., 2007; Busche et al., 2012; Toyoda et al., 2015).

4.2.7 Faktor sigma M

Faktor σ^M je dalším typem faktoru s ECF u *C. glutamicum*, jehož název je odvozen od nejbližšího příbuzného ortologa v *M. tuberculosis*, s kterým má však shodu v sekvenci AMK pouze 35 %. Také v porovnání s ostatními příbuznými bakteriemi je shoda v sekvenci AMK velice nízká (Pátek & Nešvera, 2011). I přes tyto odlišnosti se gen *sigM* u všech aktinobakterií nachází ve stejném shluku a to s geny thioredoxinového systému (Nakunst et al., 2007).

Pomocí delece genu *sigM* bylo objeveno 23 genů, které jsou ovlivňovány faktorem σ^M . Oblast působnosti faktoru σ^M byla vymezena díky zvýšené aktivitě za podmínek sulfidického, tepelného a chladového šoku, kdy došlo k zvýšení exprese genu *sigM*. Objevené geny byly zařazeny do skupin pro sulfidický stres, geny související s tepelným stresem a geny bez specifikace. Geny pro sulfidický stres se nacházejí v *suf* shluku. Jejich exprese probíhá i během růstu za běžných podmínek, neboť se před shlukem nachází i σ^A -dependentní promotor. Produkty těchto genů mají za úkol složení, tvorbu a opravy proteinů obsahujících Fe-S složku. Do regulonu σ^M spadají také chaperony (*dnaJ*, *grpE*) a chaperoniny (*groEL*, *groES*) pomáhajících se sbalením proteinů do správné konformace, jejichž exprese je zvýšena za tepelného stresu. Buňky *C. glutamicum* v reakci na přítomnost diaminu, manadionu či plumbaginu (oxidativní stres) spouští expresi genů, řízených faktorem σ^M , z thioredoxinového a mykothiolového systému, jejichž produkty reaktivují oxidované proteiny tvořící mezi sebou disulfidické můstky (Nakunst et al., 2007).

Jelikož faktory σ^M i σ^H rozpoznávají velice podobné sekvence promotorů, nelze vyloučit, že přepisují i stejné geny pouze za odlišných podmínek (Šilar et al., 2016).

4.3 Vzájemná regulace faktorů sigma v *C. glutamicum*

Před jednotlivými geny faktorů σ existují promotory, jež jsou řízeny různými FS. Před genem může být promotor řízen jedním, ale i více FS, čímž se jeho regulace stává komplexnější. Regulace daného genu FS nemusí vždy probíhat přímo přes promotor, ale může nastávat i situace nepřímé regulace. FS jsou nejdůležitější složkou regulační sítě buňky, které zajišťují odpovídající optimální reakce organismu na jakoukoliv změnu růstových podmínek a na environmentální impulsy. Základem regulační sítě je síť zahrnující vzájemné působení samotných faktorů σ a faktorů anti- σ .

Před genem esenciálního faktoru σ^A byl objeven jak σ^A -dependentní promotor, tak i σ^H -dependentní promotor. Gen *sigA* je nejsilněji přepisován právě z σ^A -dependentního promotoru, ale v reakci na tepelný šok může být exprese zvýšena aktivitou σ^H -dependentního promotoru, jehož aktivita je ale ve srovnání s σ^A -dependentním promotorem velice nízká (Toyoda et al., 2015).

Alternativní faktor σ^B je pravděpodobně nejvíce přepisován z σ^H/σ^E -dependentního promotoru (Dostálová et al., 2017). Další možností regulace exprese je z σ^A -dependentního promotoru, který se překvapivě nachází až o dva geny dále proti směru transkripce (Ehira et al., 2008; Pátek, nepublikováno). Transkripci genu *sigB* je schopen nepřímo ovlivnit při zvýšené koncentraci také faktor σ^C (Toyoda & Inui, 2016).

Před genem *sigC* se nachází σ^A -dependentní promotor (Pátek, nepublikováno). V okolí genu *sigC* nebyl nalezen příslušný FAS, tak jako u některých FS ze skupiny ECF v *C. glutamicum*. U analýzy ortologního faktoru σ^C v *M. tuberculosis*, jenž také nekóduje příslušný FAS, byla zaznamenána vzájemná interakce mezi doménami σ_2 a σ_4 . Tato mezimolekulární interakce může regulovat aktivitu faktoru σ^C (Thakur et al., 2007; Toyoda & Inui, 2016).

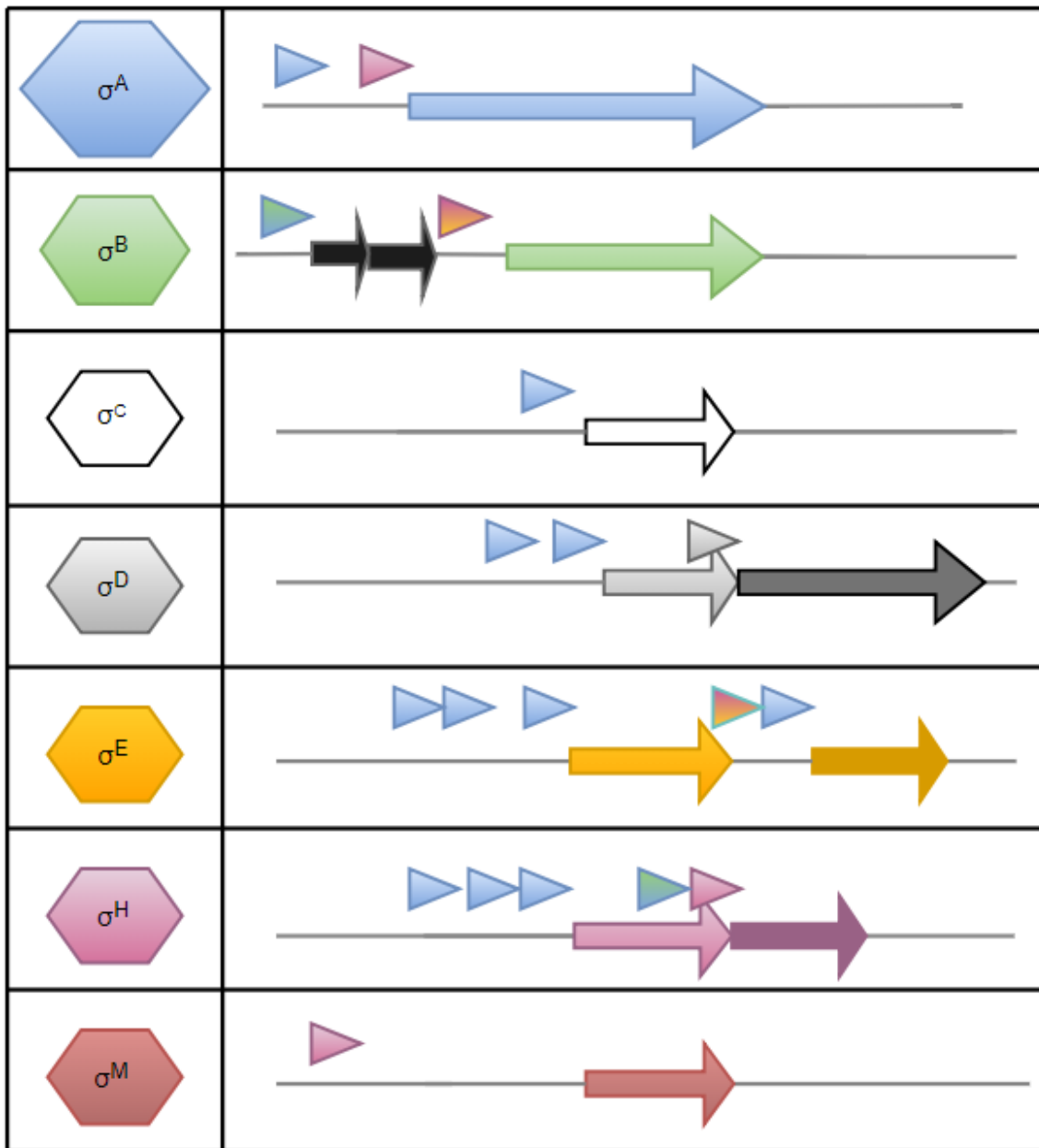
Na gen *sigD* navazuje gen příslušného FAS RsdA. Zajímavostí genu *rsdA* je jeho velikost (37 kDa) v porovnání s ostatními FAS v *C. glutamicum*, které jsou výrazně menší (RsdA 11kDa, CseE 19 kDa). Geny faktoru σ^D a jeho FAS vytvářejí operon *sigD-rsdA*. Před tímto operonem se nachází jediný σ^A -dependentní promotor. U operonu byl také prokázán interní σ^D -dependentní promotor pro gen *rsdA*. Toto uspořádání genů, v němž σ^D přímo spouští syntézu faktoru anti- σ^D pravděpodobně

zajišťuje rychlé utlumení aktivity faktoru σ^D poté, co byl stres překonán (Dostálová et al., 2015; Toyoda & Inui, 2018).

Podobně jako u faktoru σ^D se i geny faktoru σ^E a jeho FAS CseE nachází v operonu. Před operonem *sigE-cseE* byli objeveny tři σ^A -dependentní promotory. Přepis samotného genu *cseE* řídí dva interní promotory. Prvním je σ^A -dependentní promotor, za nímž se nachází σ^H/σ^E -dependentní promotor. Podobně jako u faktoru σ^D i toto uspořádání transkripce umožňuje rychlou inhibici faktoru σ^E poté, co odezní stresové podmínky (Park et al., 2008; Dostálová et al., 2015).

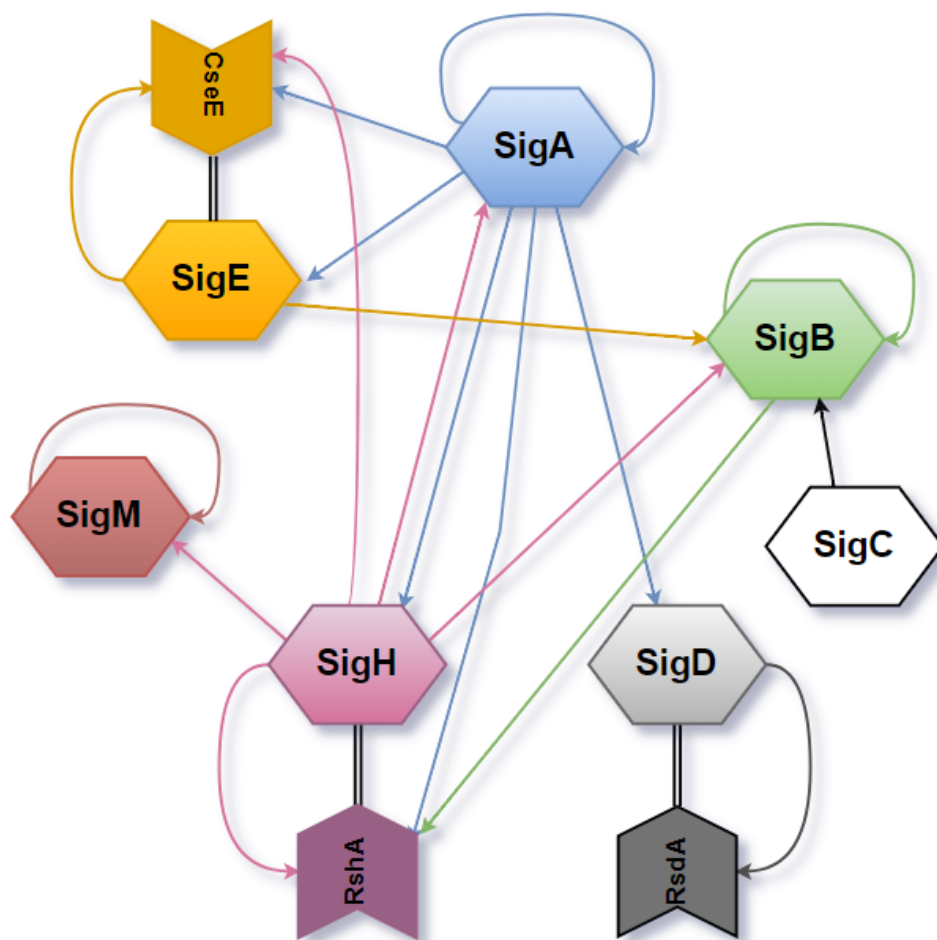
U centrálního regulačního faktoru ECF σ^H se analogicky jako u ostatních ECF faktorů σ , které mají příslušný FAS, geny organizují v operonu *sigH-rshA*. Bylo zjištěno, že před tímto operonem jsou rozpoznávány tři σ^A -dependentní promotory. První σ^A -dependentní promotor je pravděpodobně řízen SOS regulátorem LexA (Busche et al., 2012; Jochmann et al., 2009). Důvodem takto zvýšeného počtu promotorů může být jemné doladění transkripce buď působením dalších TR, jako je např. LexA, nebo různou afinitou k faktorům σ^A , případně σ^B . Současně se v regulonu před genem *rshA* nachází i σ^H -dependentní promotor. K bazální expresi *rshA* dochází i v buňce s delecí genu *sigH*. To ukazuje na přítomnost dalšího promotoru, jehož sekvenci mohou rozpoznávat jak faktor σ^A , tak i faktor σ^B (Busche & Kalinowski, 2016; Busche et al., 2012; Toyoda et al., 2015). Při porovnání odpovědi na tepelný šok bylo zjištěno, že exprese genu *sigH* se zvýšila dvakrát, zatímco exprese genu *rshA* se zvýšila více než dvacetkrát. To ukazuje, že oba geny jsou v reakci na tepelný šok řízeny nezávisle (Busche et al., 2012; Toyoda et al., 2015).

Gen faktoru σ^M se nachází ve shluku s geny, které sám reguluje. Jak se ukázalo v kmeni s delecí *sigM*, došlo ke snížení exprese genu *sigM* a ostatních genů ve shluku, tudíž dochází k přímé nebo nepřímé autoregulaci aktivity. U *M. tuberculosis* se faktor σ^M nalézá pod kontrolou faktoru σ^H , proto bylo v experimentech s buňkami *C. glutamicum* postupováno s delecí genu *sigH*, čímž došlo ke snížení exprese genu *sigM* a ostatních genů ve shluku. Z tohoto je zřejmé, že i v *C. glutamicum* se před genem *sigM* nachází σ^H -dependentní promotor (Nakunst et al., 2007).



Obrázek 8 - Promotory genů kódující faktory σ a příslušné faktory anti- σ – Schématicky jsou trojúhelníkem zmapovány promotory, jejichž řízení příslušným faktorem σ je vyznačeno barevně. U *C. glutamicum* je obtížné odlišit promotor řízený faktorem σ^A od promotoru řízeného σ^B , protože konsensus sekvence těchto typů promotorů jsou prakticky totožné. Nelze proto vyloučit řízení přepisu genů z σ^A -dependentního promotoru faktorem σ^B . Ze sekvenčních dat vychází najevo největší velikost genu *sigA* z důvodu N-konce, který ostatní FS nemají. Gen *sigB* je velikostně mezi esenciálním a ECF faktory, což je v souladu se stavbou tohoto FS. Velikost genů ECF je velice podobná, což potvrzuje i stejná doménová stavba. Upraveno dle Pátek (nepublikováno). Barva šipky genu odpovídá barvě FS; promotor je znázorněn trojúhelníkem s barevným podáním rozpoznávaného FS; šedá přímka značí řetězec DNA.

Z těchto experimentálních dat lze vytvořit regulační síť vzájemných interakcí FS v *C. glutamicum* (Obrázek 9).



Obrázek 9 - Regulační síť FS v *C. glutamicum* – Schéma znázorňuje přehled dosud známých vztahů mezi faktory σ a příslušnými faktory anti- σ . Upraveno podle Pátek (nepublikováno).

Šipky znázorňují účast jednotlivých faktorů σ na transkripci genů kódujících faktory σ . Dvojitá šipka značí vazbu FS=FAS, tedy posttranslační inhibici aktivity faktoru σ příslušným faktorem anti- σ .

4.4 Transkripční regulátory *C. glutamicum*

Bakteriální transkripční síť je složitý biologický systém, který koordinuje tok informací z vnějšího a vnitřního prostředí do transkripce genů. Současně spouští specifické funkce, které jsou schopny buňku rychle adaptovat na změněné podmínky. Pro zpřesnění této sítě je nutná koordinace více elementů. Faktory σ tvoří jen jednu úroveň regulace informační sítě buňky a jsou tak jen částí této globální sítě. Při regulaci metabolismu buňky pracují v přímé součinnosti s dalšími regulačními prvky, jakou jsou např. transkripční regulátory a regulační RNA. Transkripční regulátory jsou zvláště zřetelné a intenzivně zkoumané proteiny schopny ovlivnit transkripci genů svojí vazbou na DNA, jež je podmíněna fyziologickým stavem buňky a vnějšími stimuly. TR se rozdělují na aktivátory nebo represory, navíc každý regulátor může vykonávat obě funkce (Balleza et al., 2009; Seshasayee et al., 2006).

V *C. glutamicum* bylo zatím popsáno 159 regulátorů a 1 441 regulací, které bakterii poskytují velké množství odlišných způsobů k diverzifikaci reakce na vnější podmínky (Baumbach, 2007; Pátek et al., 2013). Rekonstrukci interakcí TR je bráněno nízkou konzervovaností komponent mezi bakteriemi (Herrgård et al., 2004). Transkripční regulátory lze rozdělit na tři skupiny podle rozsahu genů a procesů, které řídí. Ukazuje se, že globální a *master* regulátory působí na geny většinou v kooperaci s lokálními regulátory, které regulují pouze specifické geny (Kohl & Tauch, 2009).

4.4.1 Regulátory spřažené se SigH

Všechny zde popsané transkripční regulátory patří do regulonu σ^H . Podílí se na regulační kaskádě při odpovědi na tepelný a oxidativní stres, při kterém se zvyšuje exprese i samotného genu *sigH*.

4.4.1.1 ClgR

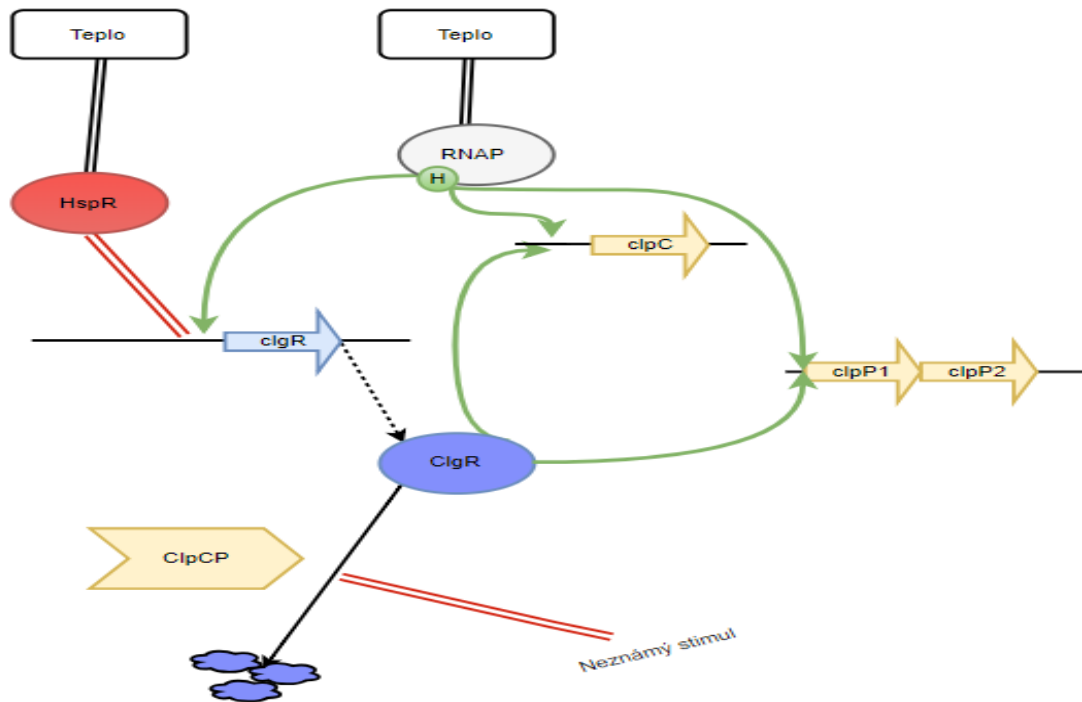
Protein ClgR rozpoznává palindromatické sekvence v DNA, ale vzdálenost mezi vazebným místem a RNAP není pevně dána (Engels et al., 2005). Do regulonu ClgR spadá 16 genů, které lze rozdělit do dvou skupin na geny zahrnuté v proteolytických procesech a geny ovlivňující opravy DNA. ClgR je slabě regulován na úrovni transkripce genu, ale silně posttranslačně na úrovni stability, poněvadž jej degradují enzymy, jejichž transkripci reguluje. Jedná se tedy o negativní regulaci vlastní aktivity (Engels et al., 2004) (Obrázek 10).

4.4.1.2 HspR a HrcA

Úkolem proteinů HspR a HrcA je regulace odpovědi na tepelný stres. Při porovnání různých druhů teplotních šoků, buňky *C. glutamicum* vykazují odlišnou odpověď v závislosti na regulátoru, síle a četnosti tepelného šoku. Při výraznějších teplotních vlivech jsou geny regulované HrcA negativně ovlivněny na rozdíl od genů regulovaných HspR. Oba TR jsou přepisovány jak z σ^H -dependentního promotoru při reakci na tepelný šok, tak i σ^A -dependentního promotoru za běžných růstových podmínek (Barreiro et al., 2009).

Gen regulátoru HspR a geny HSP proteinů se nachází ve společném operonu, u kterého je pozorována zvýšená exprese v reakci na tepelný šok, zatímco u genu *hrcA* nedochází ke změně exprese. Ukazuje se, že HspR je transkripčním represorem operonu pro HSP proteiny a nepřímo i *clp* operonu. Faktor σ^H a HspR regulují transkripci těchto operonů nezávisle na sobě (Ehira et al., 2009) (Obrázek 10). Stejně

jako HspR je protein HrcA transkripčním represorem, neboť za běžných růstových podmínek snižuje expresi genů chaperonů (Barreiro et al., 2009).



Obrázek 10 - Regulace *clp* operonu – Model regulační sítě kontrolující expresi a tvorbu produktu ClpCP v buňkách *C. glutamicum*. Do regulace se zapojují TR HspR a ClgR jakož i σ^H . Výsledkem odpovědi na tepelný šok je transkripce pozitivního regulátoru ClgR, jehož gen přestal být inhibován HspR. I když dojde ke zvýšení syntézy ClgR nevede to ke zvýšení exprese *clpC/P1P2*. Musí dojít ještě k zablokování degradace ClgR pomocí ClpCP neznámými stimuly. Až po této kaskádě může dojít k aktivaci pomocí ClgR (Engels et al., 2004). Žlutá šipka značí gen; zelené šipky značí aktivaci; červená dvojitá linka značí represi; černé dvojitě šipky značí vliv; černé šipky značí směr děje. Upraveno podle S. Engels (2004).

4.4.1.3 Rodina transkripčních regulátorů WhiB

V genomu *C. glutamicum* byly objeveny čtyři proteiny patřící do rodiny WhiB, jedná se o TR WhcA, WhcB, WhcD a WhcE. Z této rodiny se funkcí odlišuje protein WhcD, jehož aktivita se při teplotním šoku ani při oxidativním stresu nezměnila na rozdíl od ostatních proteinů. Při reakci na přítomnost diaminu (oxidativní stres) se snížila transkripce genu *whcA*, zatímco přepis genů *whcE* a *whcB* se zvýšil. Regulátory rodiny WhiB mezi sebou vytváří regulační síť, ze které vyplývá pozitivní vliv proteinu WhcB na transkripci genů *whcE* a *whcA* při stacionární fázi růstu. Ve stacionárním růstu je navíc pozitivně regulována exprese genu *whcA* i ze strany regulátoru WhcE. V exponenciální fázi se z proteinu WhcE stává represor jak pro gen *whcA*, tak i pro gen *whcE* (Lee et al., 2013) (Obrázek 11).

Z experimentů vyplývá, že regulátor WhcE zodpovídá za růstovou adaptaci, přežívání po buněčném stresu včetně tepelného a společně s WhcA reguluje odpověď na oxidativní stres. WhcB hraje regulační roli ve stacionární fázi růstu. Při odpovědi na

oxidativní stres dochází k zvýšené expresi genu *trxB*, jehož produkty eliminují následky oxidativního stresu. Pozitivní regulace transkripce genu *trxB* je řízena WhcE, zatímco represe genu probíhá pomocí WhcA. Regulátor WhcA je aktivní pouze při interakci s proteinem SpiA (Choi et al., 2009; Kim, Park, et al., 2005; Lee et al., 2013).

Ačkoliv jsou známé mechanismy účinku WhcE a WhcA, dráha regulace WhcB ještě není zcela objasněna. Zatím lze říci, že popsané proteiny rodiny WhiB fungují v jedné regulační kaskádě při reakci na oxidativní stres. Funkce WhcD je zatím zcela neznámá.

4.4.2 Kooperace regulátorů při odpovědi na tepelný šok

Bakteriální odpověď na tepelný šok se opírá o koordinaci genové regulační sítě, která řídí expresi vysoce konzervovaných HSP, aby se vyrovnala náhlému zvýšení teploty. Při této odpovědi nedochází pouze k zvýšení exprese genů HSP, ale i k odlišné expresi stovek dalších genů souvisejících s různými fyziologickými funkcemi. Následuje i zvýšení exprese genů TR, což naznačuje přímý nebo nepřímý vliv na regulační síť v buňkách *C. glutamicum*. Odpověď je kontrolována na transkripční úrovni kombinací alternativních FS rozpoznávajících specifické promotory a TR aktivujících nebo inhibujících expresi genů (Barreiro et al., 2009; Ehira et al., 2009; Ventura et al., 2006). V buňkách *C. glutamicum* hraje ústřední roli v odpovědi na tepelný i jiný stres ECF σ^H a jeho FAS RshA. Dále jsou v reakci na tepelný šok zahrnuty TR HrcA, HspR a ClgR (Schröder and Tauch, 2010) (Obrázek 11).

HrcA rozpoznává sekvenci pojmenovanou CIRCE boxu, který byl detekován před geny *groES-groEL1* a *groEL2* kódujícími chaperony (Barreiro et al., 2004). HspR rozpoznává sekvenci nazývanou HAIR box, jenž se nachází před *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* operonem a geny *groEL2* i *clgR*. (Barreiro et al., 2004; Ehira et al., 2009; Engels et al., 2004; Ventura et al., 2006). Před geny regulonu HspR jsou detekovány σ^H -dependentní promotory, jejichž aktivace probíhá při detekci zvýšené teploty (Ehira et al., 2009).

TR ClgR rozpoznává motivy před geny *clp*, kódujícími podjednotky Clp proteázy, u kterých reaguje jako aktivátor. Geny Clp proteázy jsou také součástí σ^H regulonu, do nějž patří i protein ClgR, který je navíc negativně ovlivňován HspR. Při odpovědi na silné tepelné působení byla pozorována exprese genů *clp* nezávislá na ClgR zprostředkována pouze prostřednictvím faktoru σ^H . Geny *clp* je tedy možné přepisovat

dvěma regulačními cestami v závislosti na síle tepelného šoku (Engels et al., 2005) (Obrázek 10).

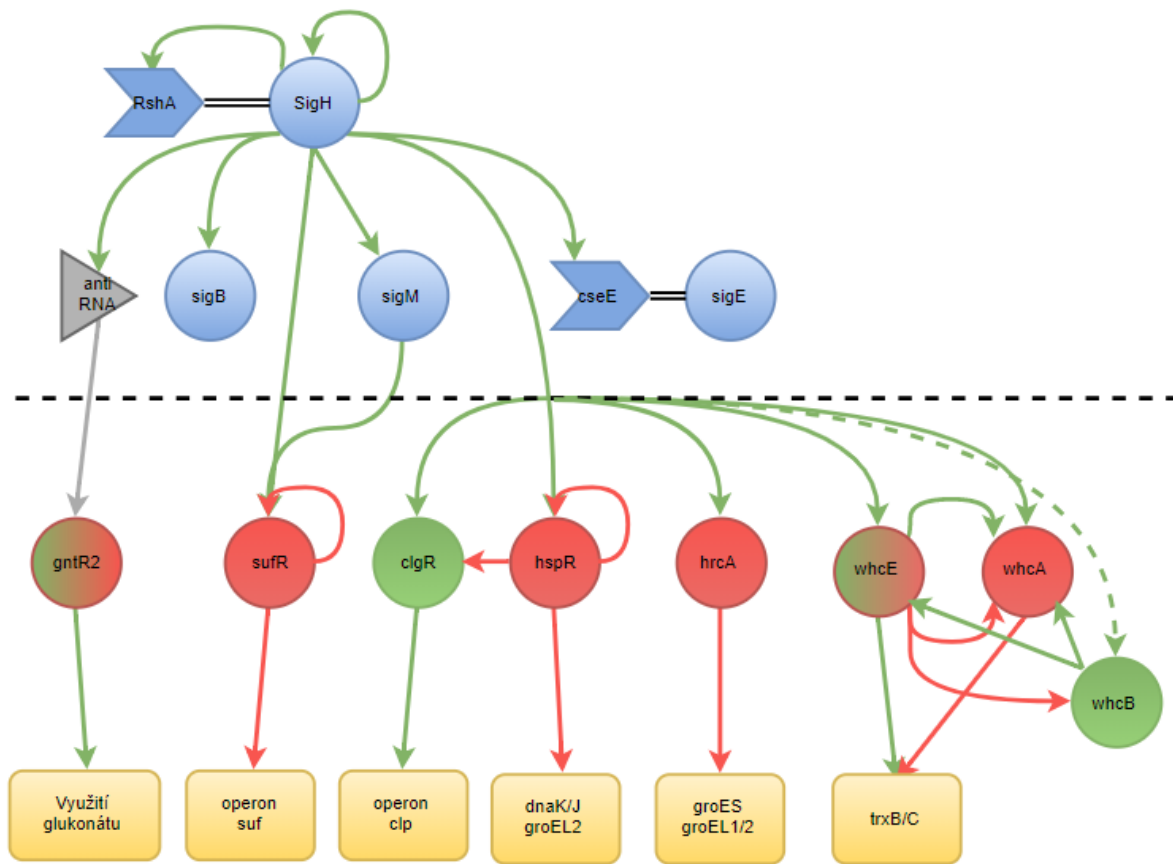
Faktor σ^H řídí i syntézu malých *antisence* RNA, které jsou za běžných teplot syntetizovány přes σ^A -dependentní promotor. Při zvýšené teplotě ale dochází k syntéze řízené faktorem σ^H . *Antisence* RNA ovlivňuje TR, GntR, regulující využití glukonátu, který pozitivně ovlivňuje transkripci tohoto genu. Zatím není znám způsob vlivu *antisence* RNA na regulátor GntR (Frunzke et al., 2008; Zemanová et al., 2008).

4.4.3 Kooperace regulátorů při odpovědi na oxidativní stres

Centrální roli v odpovědi na oxidativní stres u buněk *C. glutamicum* hraje faktor σ^M . Samotný gen *sigM* je pod kontrolou faktoru σ^H a v reakci na oxidativní stres dochází ke zvýšení jeho exprese. V regulonu faktoru σ^M se nachází geny operonu *suf*, které jsou negativně ovlivňovány SufR regulátorem. Pod kontrolu faktoru σ^M patří i geny *trx* systému a geny HSP proteinů (Nakunst et al., 2007).

Transkripční regulátory WhcE a WhcA jsou zahrnuty v regulační kaskádě řídící odpověď na oxidativní stres. Proteiny patří do regulonu σ^H a hrají antagonistickou roli při regulaci genů *trxBC*. Zároveň i další geny regulované těmito proteiny spadají do regulonu σ^H nebo σ^M (Choi et al., 2009; Kim, Park, et al., 2005).

Faktor σ^H řídí expresi vlastního FAS, který inhibuje jeho aktivitu. Po zachycení signálu na stres dojde ke zrušení vazby FAS=SigH a aktivaci faktoru σ^H , jenž začne transkribovat gen pro faktor σ^M , který v tu chvíli spouští expresi genu pro WhcE sloužící jako aktivátor pro thioredoxinový opravný regulon, jenž je také přepisován faktorem σ^M . Produkty tohoto regulonu vedou k redukci cysteinů na RshA, čímž mu umožní obnovení vazby k faktoru σ^H , a tím dochází ke snížení zvýšené exprese všech genů reagujících na oxidativní stres (Nakunst et al., 2007).



Obrázek 11 – Regulační kaskáda při stresové reakci – Na schématu je znázorněna transkripční regulační síť v reakci na tepelný a oxidativní stres v *C. glutamicum*. Vrchní vrstva je složena z FS, spodní vrstva z regulátorů HspR, ClgR, SufR, WhcE a WhcA, které ovlivňují geny pro tepelný a oxidativní stres v *C. glutamicum*. Modrý kruh reprezentuje FS; modrá šipka značí FAS; červený kruh značí represor; zelený kruh značí aktivátor; červeno-zelený kruh značí regulátor s duální funkcí; červená šipka označuje represi; zelená šipka označuje aktivaci; zelená přerušovaná šipka značí předpokládaný vztah; dvojitá černá přímka označuje interakci mezi FS a FAS; šedá šipka označuje regulaci řízenou *antisense* RNA. Převzato ze Schröder a Tauch (2010), doplněno z Lee (2013)

5 Závěr

Buňky bakterie *C. glutamicum* obsahují 7 faktorů sigma, které se řadí do specifické skupiny transkripčních regulátorů řídících regulační síť společně s dalšími regulačními proteiny. V současné mikrobiologii na rozdíl od minulosti dochází mnohdy k analýze regulační sítě buněčného systému jako celku, tedy na úrovni genomu, transkriptomu, proteomu a metabolomu. Přestože je stále málo poznatků, jak se FS a ostatní komponenty navzájem ovlivňují a jakou síť mezi sebou vytvářejí, tak dochází ve výzkumu této problematiky k neustálému pokroku. Nové poznatky o této regulační síti vedou ke zlepšenému chápání genetického pozadí tohoto biotechnologicky významného organismu, který nepřestává vědce udivovat svojí metabolickou flexibilitou. Jedná se jak o již prozkoumané oblasti v podobě produkce aminokyselin, tak nově objevené oblasti ve výrobě biopaliv, degradace aromatických komponent nebo bioremediaci arsenu. Další výzkum transkripčních regulátorů a regulonů faktorů sigma postupně odhaluje globální regulační síť buňky. Tyto poznatky jsou postupně aplikovány v biotechnologických procesech a v budoucnosti mohou silně ovlivnit efektivitu těchto procesů, např. produkci čistých látek nebo degradaci toxických polutantů. Tak, jako se zájem výzkumu přesouvá od klasické biologie zkoumající jednotlivé geny, proteiny a metabolity k systémové biologii (*systems biology*), uplatní se nové poznatky o regulačních sítích buňky v systémové biotechnologii.

6 Seznam použité literatury

- A Darst, S. (2001). Bacterial RNA polymerase. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(2), 155–162. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00185-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00185-8)
- Bae, B., Chen, J., Davis, E., Leon, K., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2015). CarD uses a minor groove wedge mechanism to stabilize the RNA polymerase open promoter complex. *ELife*.
- Balleza, E., López-Bojorquez, L. N., Martínez-Antonio, A., Resendis-Antonio, O., Lozada-Chávez, I., Balderas-Martínez, Y. I., ... Collado-Vides, J. (2009). Regulation by transcription factors in bacteria: Beyond description. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Barreiro, C., González-Lavado, E., Pátek, M., & Martín, J. F. (2004). Transcriptional analysis of the groES-groEL1, groEL2, and dnaK genes in *Corynebacterium glutamicum*: Characterization of heat shock-induced promoters. *Journal of Bacteriology*.
- Barreiro, C., Nakunst, D., Hüser, A. T., de Paz, H. D., Kalinowski, J., & Martín, J. F. (2009). Microarray studies reveal a “differential response” to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 155(2), 359–372.
- Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Sola-Landa, A., & Martín, J. F. (2013). Transcriptional control of the F0F1-ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microbial Biotechnology*.
- *Baumbach, J. (2007). CoryneRegNet 4.0 - A reference database for corynebacterial gene regulatory networks. *BMC Bioinformatics*.
- Borukhov, S., & Severinov, K. (2002). Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Research in Microbiology*.
- Bose, D., Pape, T., Burrows, P. C., Rappas, M., Wigneshweraraj, S. R., Buck, M., & Zhang, X. (2008). Organization of an Activator-Bound RNA Polymerase Holoenzyme. *Molecular Cell*.
- *Browning, D. F., & Busby, S. J. W. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 57–65.
- *Browning, D. F., & Busby, S. J. W. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 638–650.
- *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(15), 4129–4136.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., & Bautz, E. K. F. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*.
- Busche, T., & Kalinowski, J. (2016). The ECF Family Sigma Factor σ_{Hin} in *Corynebacterium glutamicum* Controls the Thiol-Oxidative Stress Response. In *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*.
- 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*.
- Campbell, E. A., Greenwell, R., Anthony, J. R., Wang, S., Lim, L., Das, K., ... Darst, S. A. (2007). A Conserved Structural Module Regulates Transcriptional Responses to Diverse Stress Signals in Bacteria. *Molecular Cell*, 27(5), 793–805.
- Campbell, E. A., Tupy, J. L., Gruber, T. M., Wang, S., Sharp, M. M., Gross, C. A., & Darst, S. A. (2003). Crystal structure of *Escherichia coli* σ_{E} with the cytoplasmic domain of its anti- σ RseA. *Molecular Cell*, 11(4), 1067–1078.

- Campbell, E. A., Westblade, L. F., & Darst, S. A. (2008). Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 121–127.
- Campbell, E. a, Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., ... Darst, S. a. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Molecular Cell*, 9(3), 527–539.
- *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*.
- *Chandrangsu, P., & Helmann, J. D. (2014). Sigma Factors in Gene Expression. In *eLS* (p. přečteno).
- Cho, S., Yang, S., & Rhie, H. (2012). The gene encoding the alternative thymidylate synthase ThyX is regulated by sigma factor SigB in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032. *FEMS Microbiology Letters*, 328(2), 157–165.
- 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(1), 32–38.
- *Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., & MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(2), 89–99.
- 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.
- Dostálová, H., Holátko, J., Busche, T., Rucká, L., Rapoport, A., Halada, P., ... Pátek, M. (2017). Assignment of sigma factors of RNA polymerase to promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express*, 7(1).
- 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(16), 5146–5152.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2009). Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 2964–2972.
- Engels, S., Ludwig, C., Schweitzer, J. E., Mack, C., Bott, M., & Schaffer, S. (2005). The transcriptional activator ClgR controls transcription of genes involved in proteolysis and DNA repair in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M., & Schaffer, S. (2004). clpC and clpP1P2 gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor σ_H . *Molecular Microbiology*, 52(1), 285–302.
- Feklistov, A., & Darst, S. A. (2011). Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase σ subunit. *Cell*, 147(6), 1257–1269.
- *Feklistov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., & Gross, C. A. (2014). Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 357–376.
- *Flentie, K., Garner, A. L., & Stallings, C. L. (2016). Mycobacterium tuberculosis transcription machinery: Ready to respond to host attacks. *Journal of Bacteriology*.
- Frunzke, J., Engels, V., Hasenbein, S., Gätgens, C., & Bott, M. (2008). Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Molecular Microbiology*.

- Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., & Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 63, pp. 141–155).
- *Gruber, T. M., & Bryant, D. a. (1997). Molecular systematic studies of eubacteria, using sigma70-type sigma factors of group 1 and group 2. *Journal of Bacteriology*.
- *Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003). Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 441–466.
- Gusarov, I., & Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Molecular Cell*, 3(4), 495–504.
- *Helmann, J. D., & Chamberlin, M. J. (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Annual Review of Biochemistry*, 57(8), 839–872.
- Herrgård, M. J., Covert, M. W., & Palsson, B. (2004). Reconstruction of microbial transcriptional regulatory networks. *Current Opinion in Biotechnology*.
- Hinton, D. M. (2010). Transcriptional control in the prereplicative phase of T4 development. *Virology Journal*.
- Hubin, E. A., Tabib-Salazar, A., Humphrey, L. J., Flack, J. E., Olinares, P. D. B., Darst, S. A., ... Paget, M. S. (2015). Structural, functional, and genetic analyses of the actinobacterial transcription factor RbpA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- 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*.
- Inui, M., Suda, M., Okino, S., Nonaka, H., Pusk??s, L. G., Vert??s, A. A., & Yukawa, H. (2007). Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology*.
- 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(15), 5582–5590.
- Jochmann, N., Kurze, A. K., Czaja, L. F., Brinkrolf, K., Brune, I., H??ser, A. T., ... Tauch, A. (2009). Genetic makeup of the *Corynebacterium glutamicum* LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and in vitro DNA band shift assays. *Microbiology*.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., ... 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(1–3), 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(4), 1542–1547.
- Kim, T. H., Park, J. S., Kim, H. J., Kim, Y., Kim, P., & Lee, H. S. (2005). The whcE gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(3), 757–764.
- Kinoshita, S., Udaka, S., & Shimono, M. (1957). Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*, 3, 193–205.
- Kohl, T. A., & Tauch, A. (2009). The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: Detection of the corynebacterial core regulon and integration into the transcriptional regulatory network model. *Journal of Biotechnology*.
- 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(1), 4.

- Lee, J. Y., Kim, H. J., Kim, E. S., Kim, P., Kim, Y., & Lee, H. S. (2013). Regulatory interaction of the *Corynebacterium glutamicum* whc genes in oxidative stress responses. *Journal of Biotechnology*.
- *Lee, J. Y., Na, Y. A., Kim, E., Lee, H. S., & Kim, P. (2016). The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. *J Microbiol Biotechnol*, 26(5), 807–822.
- Liebal, U. W., Sappa, P. K., Millat, T., Steil, L., Homuth, G., Völker, U., & Wolkenhauer, O. (2012). Proteolysis of beta-galactosidase following SigmaB activation in *Bacillus subtilis*. *Molecular BioSystems*.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd Ii, K. E., & Buttner, M. J. (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. *Microbiology*, 91, 7573–7577.
- *Lonetto, M., Gribskov, M., & Gross, C. A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of Bacteriology*.
- Maeda, H. (2000). Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 28(18), 3497–3503.
- *Manganelli, R., Proveddi, R., Rodrigue, S., Beaucher, J., Gaudreau, L., & Smith, I. (2004). MINIREVIEW □ Factors and Global Gene Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 186(4), 895–902.
- Merrick, M. J. (1993). In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Molecular Microbiology*, 10(5), 903–909.
- Mettrick, K. A., & Lamont, I. L. (2009). Different roles for anti-sigma factors in siderophore signalling pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1257–1271.
- Morris, L., Cannon, W., Claverie-Martin, F., Austin, S., & Buck, M. (1994). DNA distortion and nucleation of local DNA unwinding within sigma-54 ($\sigma(N)$) holoenzyme closed promoter complexes. *Journal of Biological Chemistry*.
- *Murakami, K. (2015). Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules*, 5(2), 848–864.
- Nakunst, D., Larisch, C., Hüser, A. T., Tauch, A., Pühler, A., & Kalinowski, J. (2007). The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4696–4707.
- Nickels, B. E., Garrity, S. J., Mekler, V., Minakhin, L., Severinov, K., Ebright, R. H., & Hochschild, A. (2005). The interaction between sigma70 and the beta-flap of *Escherichia coli* RNA polymerase inhibits extension of nascent RNA during early elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), 4488–4493.
- Nishimura, T., Teramoto, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2011). Gene expression profiling of *Corynebacterium glutamicum* during anaerobic nitrate respiration: Induction of the SOS response for cell survival. *Journal of Bacteriology*.
- *Österberg, S., Peso-Santos, T. del, & Shingler, V. (2011). Regulation of Alternative Sigma Factor Use. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 37–55.
- *Paget, M. S. (2015). Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: Structure, function and distribution. *Biomolecules*.
- Park, M., Cho, S., Lee, H., Sibley, C. H., & Rhie, H. (2010). Alternative thymidylate synthase, ThyX, involved in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 survival during stationary growth phase. *FEMS Microbiology Letters*.

- Park, S. D., Youn, J. W., Kim, Y. J., Lee, S. M., Kim, Y., & Lee, H. S. (2008). *Corynebacterium glutamicum* σ E is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti- σ factor CseE. *Microbiology*, 154(3), 915–923.
- Pátek, M., Holátko, J., Busche, T., Kalinowski, J., & Nešvera, J. (2013). *Corynebacterium glutamicum* promoters: A practical approach. *Microbial Biotechnology*, 6(2), 103–117.
- Pátek, M., & Nešvera, J. (2011). Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*.
- Pátek, M., Nešvera, J., Guyonvarch, A., Reyes, O., & Leblon, G. (2003). Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*.
- Rhodiou, V. A., Segall-Shapiro, T. H., Sharon, B. D., Ghodasara, A., Orlova, E., Tabakh, H., ... Voigt, C. A. (2013). Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters. *Molecular Systems Biology*, 9.
- Ross, W., Ernst, a., & Gourse, R. L. (2001). Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes & Development*, 15(5), 491–506.
- Sahm, H., Eggeling, L., & de Graaf, A. A. (2000). Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biological Chemistry*.
- Salgado, H., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Millán-Zárate, D., Díaz-Peredo, E., Sánchez-Solano, F., ... Collado-Vides, J. (2001). RegulonDB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 72.
- *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*.
- *Seshasayee, A. S., Bertone, P., Fraser, G. M., & Luscombe, N. M. (2006). Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Current Opinion in Microbiology*.
- Shimada, T., Yamazaki, Y., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2014). The whole set of constitutive promoters recognized by RNA polymerase RpoD holoenzyme of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*.
- Šilar, R., Holátko, J., Rucká, L., Rapoport, A., Dostálová, H., Kadeřábková, P., ... Pátek, M. (2016). Use of In Vitro Transcription System for Analysis of *Corynebacterium glutamicum* Promoters Recognized by Two Sigma Factors. *Current Microbiology*, 73(3), 401–408.
- Srivastava, D. B., Leon, K., Osmundson, J., Garner, A. L., Weiss, L. A., Westblade, L. F., ... Campbell, E. A. (2013). Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- *Staroń, A., Sofia, H. J., Dietrich, S., Ulrich, L. E., Liesegang, H., & Mascher, T. (2009). The third pillar of bacterial signal transduction: Classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. *Molecular Microbiology*, 74(3), 557–581.
- Studholme, D. J., & Buck, M. (2000). The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: Insights from genome sequences. *FEMS Microbiology Letters*.
- Taniguchi, H., Busche, T., Patschkowski, T., Niehaus, K., Pátek, M., Kalinowski, J., & Wendisch, V. F. (2017). Physiological roles of sigma factor SigD in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiology*, 17(1).
- Thakur, K. G., Joshi, A. M., & Gopal, B. (2007). Structural and biophysical studies on two promoter recognition domains of the extra-cytoplasmic function σ factor σ C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*.
- Toyoda, K., & Inui, M. (2016). The extracytoplasmic function σ factor σ C regulates expression of a branched quinol oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum*.

Molecular Microbiology.

- Toyoda, K., & Inui, M. (2018). Extracytoplasmic function sigma factor σ^D confers resistance to environmental stress by enhancing mycolate synthesis and modifying peptidoglycan structures in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 107(3), 312–329.
- Toyoda, K., Teramoto, H., Yukawa, H., & Inui, M. (2015). Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor σ^H in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 483–496.
- *Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2006). How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: Protein players and regulators. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Watanabe, K., Teramoto, H., Suzuki, N., Inui, M., & Yukawa, H. (2013). Influence of SigB inactivation on *Corynebacterium glutamicum* protein secretion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 4917–4926.
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, 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(1), 155–167.
- Wilson, C., & Dombroski, J. (1997). Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 267(1), 60–74.
- *Wösten, M. M. S. M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Yukawa, H., Omumasaba, C. A., Nonaka, H., Kós, P., Okai, N., Suzuki, N., ... Inui, M. (2007). Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology*, 153(4), 1042–1058.
- Zemanová, M., Kadeřábková, P., Pátek, M., Knoppová, M., Šilar, R., & Nešvera, J. (2008). Chromosomally encoded small antisense RNA in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 279(2), 195–201.
- Zhang, G., Campbell, E. a, Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S. a, & Street, J. (1999). Crystal Structure of *Thermus aquaticus* σ Resolution Core RNA Polymerase at 3.3 Å. *Cell*, 98, 811–824.