

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.  
Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Hana Dostálová**

Funkce alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při stresové  
odpovědi u *Corynebacterium glutamicum*

Function of alternative sigma factors of RNA polymerase in stress  
response of *Corynebacterium glutamicum*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Jan Nešvera, CSc. (Mikrobiologický ústav AV ČR)  
Praha, 2012

**Prohlášení:**

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

V Praze, 3.5.2012

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat RNDr. Janu Nešverovi, CSc. a Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady během mého vypracovávání diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Radoslavu Šilarovi, Mgr. Jiřímu Holátkovi, Ph.D., Daně Lukavské, Mgr. Martině Pičmanové, Ing. Lence Rucké a Adamu Pavlíkovi za ochotu, pomoc a tvorbu příjemného pracovního prostředí.

Práce byla vypracována v Laboratoři molekulární genetiky bakterií, Sektoru buněčné a molekulární mikrobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze v období prosinec 2009 – duben 2012 v rámci projektu GA ČR 204/09/J015 „Mechanismy regulace transkripce řízené sigma faktory v *Corynebacterium glutamicum*“.

## Abstrakt

Cílem práce bylo přispět k poznání funkce alternativních sigma faktorů RNA polymerasy  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  při stresové odpovědi u *Corynebacterium glutamicum*, zejména při transkripci genu *sigM*, který kóduje  $\sigma^M$ , a operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, jehož geny kódují proteiny účastnící se odpovědi buňky *C. glutamicum* na tepelný stres. Promotory těchto testovaných genů byly klonovány do „promoter-probe“ vektoru pET2 a jejich aktivita byla stanovována měřením specifické aktivity reportérového enzymu chloramfenikolacetyltransferasy. Byl zjištěno, že tepelný stres má slabý pozitivní efekt na aktivitu promotoru genu *sigM* (P-*sigM*), zatímco efekt oxidativního stresu působením diamidu nebyl potvrzen. Bylo prokázáno, že delece samotného genu *sigH* nebo *sigM* nevede ke snížení aktivity promotoru P-*sigM* za standardních podmínek ani po tepelném stresu. Naproti tomu u kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH\Delta sigM$  došlo k úplnému potlačení aktivity tohoto promotoru. Promotor genu *sigM* je tedy rozeznáván za standardních podmínek i po tepelném stresu jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ , ale nikoli primárním sigma faktorem  $\sigma^A$ . Bylo zjištěno, že mutageneze v -10 oblasti promotoru genu *sigM* vede k jeho inaktivaci a byla prokázána nezbytnost trinukleotidu GTT 8 bp „upstream“ od počátku transkripce genu *sigM* pro funkci promotoru P-*sigM*. Z těchto výsledků vyplývá, že gen *sigM* je přepisován z jediného promotoru. Zjištění, že v kmenech *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  došlo po tepelném stresu k výraznému snížení promotorové aktivity fragmentů s promotory operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* poukazuje na to, že po tepelném stresu je funkční převážně promotor P2-*dnaK*, který je, stejně jako P-*sigM*, rozeznáván zřejmě nejen sigma faktorem  $\sigma^H$ , ale i sigma faktorem  $\sigma^M$ . U obou testovaných promotorů byla tedy poprvé prokázána vzájemná zastupitelnost dvou alternativních sigma faktorů *C. glutamicum* při transkripci z promotorů rozeznávaných alternativními sigma faktory.

Klíčová slova: *Corynebacterium glutamicum*, sigma faktor, promotor, transkripce, *cat*, tepelný stres

## Abstract

The aim of this thesis was to contribute to understanding of the functions of the alternative sigma factors of RNA polymerase,  $\sigma^H$  and  $\sigma^M$ , during stress response of *C. glutamicum*. The role of  $\sigma^H$  and  $\sigma^M$  in the transcription of the gene *sigM* encoding  $\sigma^M$  and the genes of the operon *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* which encode proteins involved in heat-shock response of *C. glutamicum* was studied. The promoters of the tested genes were cloned into the „promoter-probe“ vector pET2 and their activity was determined by the measuring of specific activity of the reporter enzyme chloramfenicol acetyltransferase. It was found, that the heat stress has a moderate positive effect on the activity of the promoter of the gene *sigM* (P-*sigM*), whereas no effect of the oxidative stress induced by diamide was found. It was proved, that deletion of the gene *sigH* or *sigM* itself does not lead to decrease of activity of the promoter P-*sigM* neither in standard conditions nor after heat-shock. On the other hand, complete abolition of the activity of the promoter P-*sigM* was observed in the strain *C. glutamicum*  $\Delta sigH\Delta sigM$ . The promoter of the gene *sigM* is thus recognized in standard conditions and after heat stress is recognized by both sigma factors  $\sigma^H$  and  $\sigma^M$ , but not by the sigma factor  $\sigma^A$ . It was shown, that mutation in the -10 region of the promoter P-*sigM* leads to its inactivation and that the trinucleotide GTT in the position 8 bp upstream of the transcriptional start point of the gene *sigM* is necessary for the function of P-*sigM*. These results lead us to conclusion that the gene *sigM* is transcribed from a single promoter. A significant decrease of activity of the promoters of the *dnaK* operon was found after the heat-shock in the strains *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  and *C. glutamicum*  $\Delta sigM$ . This findings lead to conclusion that after heat-shock is functional mainly promoter P2-*dnaK* which is recognized (as well as P-*sigM*) not only by sigma factor  $\sigma^H$ , but also by sigma factor  $\sigma^M$ . This work shows for the first time that two alternative sigma factors,  $\sigma^H$  and  $\sigma^M$ , can be mutually substituted during transcription from a *C. glutamicum* promoter recognized by an alternative sigma factor.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, sigma factor, promoter, transcription, *cat*, heat stress

# Obsah

Abstrakt .....	5
Abstract .....	6
Obsah.....	7
Seznam použitých zkratk.....	9
1. Úvod.....	10
2. Přehled literatury.....	11
2.1. Rod <i>Corynebacterium</i> .....	11
2.1.1. Využití <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	11
2.2. Transkripce a její regulace.....	12
2.2.1. RNA polymerasa .....	13
2.2.2. Promotory.....	13
2.2.3. Sigma faktory .....	14
3. Materiál a metody .....	25
3.1. Materiál.....	25
3.1.1. Kultivační půdy .....	25
3.1.2. Bakteriální kmeny.....	25
3.1.3. Plazmidy.....	26
3.1.4. Primery pro PCR .....	30
3.1.5. Komerční soupravy.....	30
3.1.6. Použitý software .....	30
3.1.7. Přístroje .....	30
3.2. Metody.....	31
3.2.1. Kultivace <i>E. coli</i> a <i>C. glutamicum</i> .....	31
3.2.2. Identifikace klonů <i>E. coli</i> s rekombinantními plazmidy $\alpha$ -komplementací $\beta$ -galaktosidasy.....	31
3.2.3. Izolace nukleových kyselin .....	32
3.2.4. Transformace.....	35
3.2.5. Dlouhodobé uchování buněk v glycerolu při -70 °C.....	37
3.2.6. Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu .....	37
3.2.7. Izolace plazmidové DNA a jejich fragmentů z agarosového gelu .....	38
3.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	38
3.2.9. Štěpení DNA restričními endonukleasami.....	41
3.2.10. Ligace fragmentů plazmidové DNA.....	41

3.2.11. Testování vlivu delece v genu v závislosti na různých stresech vyvolaných vnějším prostředím .....	42
4. Výsledky .....	45
4.1. Testování aktivity promotoru genu <i>sigM</i> za různých podmínek a v různých kmenech <i>C. glutamicum</i> .....	45
4.1.1. Aktivita promotoru genu <i>sigM</i> v různých kmenech <i>C. glutamicum</i> za standardních podmínek .....	45
4.1.2. Aktivita promotoru genu <i>sigM</i> v různých kmenech <i>C. glutamicum</i> po oxidativním stresu diamidem .....	46
4.1.3. Aktivita promotoru genu <i>sigM</i> v různých kmenech <i>C. glutamicum</i> po tepelném stresu .....	48
4.2. Konstrukce kmene <i>C. glutamicum</i> s mutantním promotorem genu <i>sigM</i> .....	50
4.2.1. Mutageneze promotoru genu <i>sigM</i> .....	50
4.2.2. Klonování mutantního fragmentu do vektoru pKSAC45 .....	53
4.2.3. Klonování mutantního fragmentu do vektoru pET2 a přenos do <i>C. glutamicum</i> .....	54
4.3. Konstrukce kmene <i>C. glutamicum</i> s mutantním promotorem operonu <i>dnaK-grpE-</i> <i>dnaJ-hspR</i> .....	55
4.3.1. Příprava mutantního promotoru operonu <i>dnaK-grpE-dnaJ-hspR</i> a klonování mutantního fragmentu do vektoru pET2.....	55
4.4. Testování aktivity mutantních promotorů P- <i>sigMmut</i> a P- <i>dnaKmut</i> v kmenech <i>C. glutamicum</i> .....	58
4.4.1. Aktivita promotorů P- <i>sigM</i> a P- <i>sigMmut</i> v různých kmenech <i>C. glutamicum</i> za standardních podmínek a po tepelném stresu.....	59
4.4.2. Aktivita promotorů P- <i>dnaK</i> a P- <i>dnaKmut</i> v různých kmenech <i>C. glutamicum</i> za standardních podmínek a po tepelném stresu .....	60
5. Diskuze .....	62
6. Souhrn.....	67
7. Seznam citované literatury .....	69



## Seznam použitých zkratek

A – adenin

Amp – ampicilin

bp – páry bází

BSA – hovězí sérový albumin

C – cytosin

CAT - chloramfenikolacetyltransferasa

CIRCE – controlling inverted repeat of chaperone expression

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfát

DTNB – 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina

EC – *Escherichia coli*

EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová

G – guanin

HAIR – HspR-associated inverted repeat

IPTG – Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid

Kb – tisíce párů bází

Km – kanamycin

Km30 – kanamycin o koncentraci 30  $\mu$ g/ml

OD<sub>600</sub> – optická denzita při vlnové délce 600 nm

PCR – polymerázová řetězová reakce

P-*sigM*mut – promotor genu *sigM* s mutagenezí

RNAP – RNA polymerasa

SDS – sodiumdodecylsulfát

$\sigma$  – sigma, označení pro sigma faktory

T – thymin

Tris – tris-hydroxymethyl-aminomethan

WT – divoký typ (wild type)

X-gal – Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

## 1. Úvod

*Corynebacterium glutamicum* je fakultativně anaerobní bakterie mající rovné nebo zakřivené tyčinky, která je využívána jako producent aminokyselin např. L-lysinu, L-valinu, L-isoleucinu, L-threoninu, L-alaninu a kyseliny L-asparagové. Díky svým vhodným biotechnologickým vlastnostem má *C. glutamicum* velký potenciál pro širokou škálu produkce dalších bakteriálních metabolitů, např. nukleových kyselin, vitamínů a při biokonverzi organických sloučenin.

Pro iniciaci transkripce jsou potřeba malé podjednotky RNA polymerasy – sigma faktory – které navádějí RNA polymerasu na promotorovou oblast genu. Každý sigma faktor je zodpovědný za rozpoznání promotorů genů patřících regulonům působících ve specifických buněčných funkcích. *C. glutamicum* má 7 sigma faktorů (primární  $\sigma^A$ , primárním podobný  $\sigma^B$  a alternativní  $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ ).

Cílem této práce bylo prozkoumat funkci alternativních sigma faktorů *C. glutamicum*, konkrétně  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ , při transkripci genu *sigM*, který kóduje  $\sigma^M$  a operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, jehož geny kódují proteiny účastníci se odpovědi buňky *C. glutamicum* na tepelný stres. Oba sigma faktory byly již popsány jako účastníci regulace odpovědi na oxidativní a tepelný stres. K prozkoumání jejich úlohy při rozeznávání testovaných promotorů byla použita metoda měření specifické aktivity chloramfenikolacetyltransferasy, jelikož hodnota aktivity tohoto reportérového enzymu odpovídá aktivitě příslušného promotoru, klonovaného před reportérový gen. Pro zjištění funkce sigma faktorů byla měřena aktivita promotorů v divokém kmeni *C. glutamicum* a v jeho mutantách s delecemi v genech kódujících alternativní sigma faktory jak za standardních podmínek, tak po působení oxidativního a tepelného stresu. Získané výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou.

## 2. Přehled literatury

### 2.1. Rod *Corynebacterium*

Rod *Corynebacterium* se řadí do kmene *Actinobacteria*, řád *Actinomycetales*, který také obsahuje rody *Mycobacterium* a *Streptomyces*. Jedná se o gram pozitivní nesporulující bakterie bohaté na GC páry, které nejsou acidoresistentní (Bednář et al., 1996).

Tento rod zahrnuje lidské a zvířecí patogeny i nepatogenní druhy (Šilhánková, 2002). Mezi patogeny se řadí *Corynebacterium diphtheriae* (původce záškrtu), *Corynebacterium ulcerans* (u lidí původce angín), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (zvířecí patogen vyvolávající lymfadenitidy a pneumonie), *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (původce endokarditidy), *Corynebacterium jeikeium* (způsobující infekce u imunopresivních pacientů po kardiokirurgických zákrocích) a *Corynebacterium urealyticum* (původce močové infekce) (Bednář et al., 1996).

*Corynebacterium glutamicum* je fakultativně anaerobní bakterie mající rovné nebo zakřivené tyčinky, často kyjově rozšířené a seskupené do pravoúhlých útvarů nebo palisádovitě. Toto seskupení vzniká posunutím buněk při buněčném dělení (Šilhánková, 2002). Výchozí buňka se po prodloužení a vzniku septa štěpí na 2 dceřinné buňky, které v místě dělení zůstávají na čas spojeny a svírají úhel 90-100° (Bednář et al., 1996).

Genetické manipulace v *C. glutamicum* byly zahájeny v roce 1984, kdy byly izolovány malé nativní plazmidy z různých kmenů *C. glutamicum*. Od té doby byly vyvinuty další nástroje pro genetické manipulace a úspěšně použity pro analýzi funkcí genů, pro konstrukci a vylepšení produkčních kmenů. Pokrok se zrychlil po odhalení kompletní genomové sekvence dvou kmenů *C. glutamicum* (Kalinowski et al., 2003; Yukawa et al., 2007).

#### 2.1.1. Využití *Corynebacterium glutamicum*

V roce 1950 byl *C. glutamicum* objeven jako velmi efektivní producent kyseliny L-glutamové. Je využíván jako producent i dalších aminokyselin například L-lysinu, L-valinu, L-isoleucinu, L-threoninu, L-alaninu a kyselina L-asparagové.

Aplikace aminokyselin sahají od krmiva po potravinářské a farmaceutické výrobky (Hermann, 2003). Lysin slouží v krmivářství jako přídatek k rostlinným krmivům, která jsou vesměs chudá na lysin (Šilhánková, 2002). Kyselina glutamová se

neutralizací přeměňuje na mono-glutamát sodný, který se používá v potravinářství jako látka zvýrazňující chuť (Hermann, 2003).

V současné době je za rok vyrobeno zhruba více než 2 miliony tun aminokyselin, z nichž je většina vyrobena bioprocem koryneformních bakterií (Hermann, 2003).

Díky svým vhodným biotechnologickým vlastnostem má *C. glutamicum* velký potenciál pro širokou škálu produkce dalších bakteriálních metabolitů, např. nukleových kyselin, vitamínů a při biokonverzi organických sloučenin (Nešvera a Pátek, 2011).

## **2.2. Transkripce a její regulace**

Základním centrálním dogmatem molekulární biologie je přenos genetické informace z DNA na RNA a následně na protein. Přenos informace z DNA na RNA se nazývá transkripce. Při transkripci se jedno vlákno DNA genu použije jako templát pro syntézu komplementárního vlákna RNA – transkriptu – katalyzovanou komplexním multimerním holoenzymem RNA-polymerasy.

Proces transkripce se rozděluje u prokaryot do tří stadií – iniciace transkripce, elongace řetězce RNA a terminace s uvolněním vzniklé molekuly RNA. Během iniciace se váže holoenzym RNA-polymerasy (obsahující  $\sigma$  faktor) na promotorovou oblast DNA, lokálně se rozvinou obě vlákna DNA za vzniku volného templátového vlákna a tvoří se fosfodiesterové vazby mezi prvními třemi ribonukleotidy. Během vytváření prvních osmi nebo devíti vazeb zůstává holoenzym navázán na promotorové oblasti. Poté se uvolní sigma faktor a jádro enzymu zahájí elongační fázi syntézy RNA.

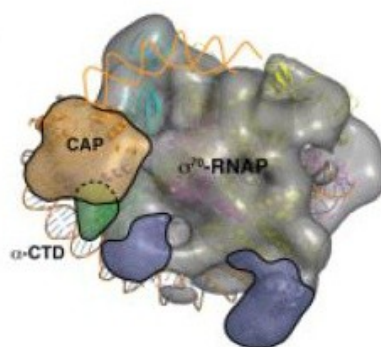
Elongace probíhá v transkripční bublině, tj. v části, kde došlo k lokálnímu rozvinutí DNA. RNA-polymerasa při svém pohybu po DNA průběžně rozvíjí dvoušroubovici DNA před místem polymerace a obnovuje svinutí komplementárních vláken za místem polymerace. Vznikající řetězec je vytěsňován od templátového vlákna DNA.

Terminace řetězců RNA nastává v místě terminátoru transkripce, kdy se terminační komplex rozpadne a uvolní vzniklou molekulu RNA (Snustad a Simmons, 2009).

### 2.2.1. RNA polymerasa

Bakteriální RNA polymerasa ve formě holoenzymu se skládá z 6 podjednotek, zahrnující  $\alpha$  dimer,  $\beta$ ,  $\beta'$  a  $\omega$  podjednotky, tvořící jádro RNA polymerasy, a disociovatelné  $\sigma$  podjednotky (Obr.1). Celková struktura jádra bakteriální RNA polymerasy se podobá krabímu klepetu (Ghosh et al., 2010).

Přestože jádro RNA polymerasy obsahuje všechny katalytické determinanty nezbytné pro transkripci, může se jen slabě a neurčitě vázat k promotoru DNA. Teprve vazba se  $\sigma$  podjednotkou vytváří plně funkční holoenzym RNA polymerasy schopný iniciace transkripce (Ghosh et al., 2010).



**Obrázek 1. Model holoenzymu RNA polymerasy s navázanou  $\sigma^{70}$  rodinou alternativních sigma faktorů v jádře.** Modře je znázorněna  $\sigma^{70}$  podjednotka, zeleně  $\alpha$ -CTD (C-terminální doména) a oranžově CAP (katabolický aktivační protein) (Ghosh et al., 2010).

### 2.2.2. Promotory

Typické eubakteriální promotory vegetativních genů byly detailně popsány v *Escherichia coli* a byly charakterizovány dvěma konzervovanými oblastmi DNA umístěnými 35 a 10 nukleotidů „upstream“ od místa startu transkripce (TSP, označené jako pozice +1) oddělené spacerem o délce  $17 \pm 1$  nukleotid. Konsenzus sekvence *E. coli* -35 oblasti (TTGACA) a -10 oblasti (TATAAT) byly definovány na základě statistické analýzy a mutačních studií. Základní struktura promotorů vegetativních genů *C. glutamicum* je podobná společné struktuře eubakteriálních promotorů rozpoznávanými hlavním sigma faktorem.

Sekvence vně oblasti statistického konsenzusu (např. uvnitř spaceru) mohou ovlivňovat sílu promotoru. Například TG dimer nacházející se jednu bázi „upstream“ od -10 hexameru (Burr et al., 2000) a různé UP elementy (AT bohaté oblasti) „upstream“ od -35 hexameru (Ross et al., 2001) mohou v *E. coli* výrazně zvýšit promotorovou aktivitu (Pátek a Nešvera, 2011).

### 2.2.3. Sigma faktory

#### 2.2.3.1. Role sigma faktorů při iniciaci transkripce

Téměř všechny bakteriální druhy kódují několik různých sigma faktorů, které se mohou alternativně připojit k jádru enzymu RNA polymerasy (Pátek a Nešvera, 2011).

Sigma faktor je zodpovědný za rozpoznání promotoru holoenzymem RNA polymerasou a tím dodává specifitu procesu iniciace transkripce rozeznáním promotorových elementů genů a operonů. Sigma faktory jsou také cílem transkripčních aktivátorů, které jsou zapojené do promotorového mízení blízko počátku transkripce, blokují nespecifickou iniciaci, řídí ranou transkripci a uvolňují promotor z RNA polymerasy (Ghosh et al., 2010).

Substituce jednoho sigma faktoru za jiný může přesměrovat RNA polymerasu k iniciaci exprese genů, které by jinak zůstaly netranskribovány (Kim et al., 2005).

Sigma faktory fungují jako globální regulátory transkripce, jelikož přepínají exprese velkých genových skupin (regulony nebo sigmulony) při odpovědi na různé environmentální stimuly nebo působením změn extracelulárních či intracelulárních podmínek.

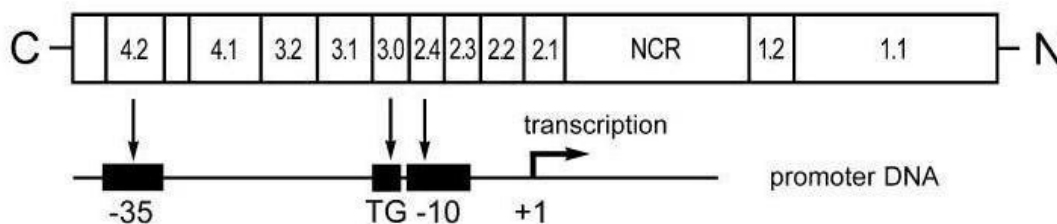
Bakterie mají vždy primární sigma faktor, který je zodpovědný za transkripci většiny genů, které jsou aktivní především během exponenciální fáze růstu. Tento hlavní sigma faktor je esenciální a příslušné regulované geny jsou označeny jako vegetativní („housekeeping“) geny. Kromě toho bakteriální genomy kódují variabilní počet neesenciálních alternativních sigma faktorů. Ty rozpoznávají promotory genů, které jsou aktivní při odpovědi na různé stresové podmínky, ve stacionární fázi růstu nebo během hladovění na různé živiny (Pátek a Nešvera, 2011).

#### 2.2.3.2. Rozdělení $\sigma$ -faktorů

Bakteriální sigma faktory byly rozděleny do dvou strukturně a funkčně odlišných rodin pojmenovaných  $\sigma^{70}$  a  $\sigma^{54}$ . Sigma faktory rodiny  $\sigma^{70}$  byly nalezeny ve všech známých bakteriálních druzích, zatímco sigma faktory rodiny  $\sigma^{54}$ , která vyžaduje ATP a působení enhanceru, jsou poměrně vzácné.

### 2.2.3.2.1. Rodina $\sigma^{70}$

Sigma faktory rodiny  $\sigma^{70}$  jsou modulární proteiny skládající se ze čtyř konzervovaných oblastí. DNA vazebné domény sigma proteinů, rozpoznávající -10 a -35 konzervované motivy promotoru, se nacházejí v podoblastech 2.4 a 4.2. Podoblast 3.0 rozpoznává rozšířený -10 region promotorů některých bakterií (Obr. 2).



**Obrázek 2. Konzervované oblasti a domény rodiny  $\sigma^{70}$  sigma faktorů.**

NCR je nekonzervovaná oblast. Vertikální šipky označují kontakt jednotlivých oblastí s -35 a rozšířením -10 promotorového motivu. Ohnutá šipka označuje bod transkripčního startu (+1) a směr transkripce. TG je dimer umístěný jednu bázi v protisměru od -10 hexameru (Pátek a Nešvera 2011).

Rodina  $\sigma^{70}$  sigma faktorů byla rozdělena do čtyř skupin podle jejich struktury a fyziologické role.

Skupina 1 obsahuje všechny čtyři konzervované oblasti a patří sem esenciální primární sigma faktory nezbytné pro transkripci vegetativních genů.

Skupina 2 obsahuje sigma faktory, které mají strukturu podobnou primárním sigma faktorům, ale nejsou esenciální. Mohou fungovat jako záloha pro udržení transkripce vegetativních genů za stresových podmínek, např. ve stacionární fázi růstu.

Skupina 3 neobsahuje konzervovanou oblast 1 a kontroluje geny zapojené do specifických funkcí, např. sporulace, biosyntéza bičíku a odpověď na teplotní šok. U rodu *Corynebacterium* tato skupina nebyla nalezena.

Skupina 4 obsahuje jen konzervované oblasti 2 a 4. Tyto sigma faktory jsou často zapojené do odpovědi na vnější stresy a jsou též označovány sigma faktory s extracytoplazmatickou funkcí (ECF) (Pátek a Nešvera, 2011). ECF sigma faktory jsou malé regulační proteiny, které jsou nápadně odlišné od skupiny 1 a 2 v aminokyselinové sekvenci. Řídí hlavně transkripci genů, které jsou zapojeny do funkce buněčných obalů, jako je proteinový transport, v sekrečních procesech a v odpovědi na extracytoplazmatické stresové podmínky. Mohou být regulovány na transkripční, translační a posttranslační úrovni. Transkripční regulace může být komplexní a vyvíjena hierarchickou regulační kaskádou sigma faktorů (Nakunst et al., 2007). Regulace aktivity

některých sigma faktorů prostřednictvím reverzibilních interakcí se specifickými anti-sigma faktory hraje důležitou roli v odpovědi bakteriálních buněk na vnější stres.

Geny sigma faktorů 19 korynebakteriálních druhů, u nichž je známa sekvence genomu, byly určeny převážně podle sekvenční homologie příslušných sigma faktorů s příbuznými dobře charakterizovanými sigma faktory *Mycobacterium tuberculosis* (Pátek a Nešvera, 2011)

V korynebakteriích byly objeveny též geny kódující předpokládané anti-sigma faktory „downstream“ od *sigE*, *sigH* a *sigK* genů (Pátek a Nešvera, 2011). V *Corynebacterium glutamicum* byla prokázána přímá interakce SigE s jeho anti-sigma faktorem CseE (Park et al., 2008).

### 2.2.3.2.1.1. Sigma faktory *Corynebacterium glutamicum*

#### Sigma faktor $\sigma^A$

$\sigma^A$  protein je považován za hlavní sigma faktor v *C. glutamicum*, který je zodpovědný za transkripci vegetativních genů. Exprese genu *sigA* je vysoká po celou exponenciální fázi růstu a snižuje se s počátkem přechodné fáze mezi exponenciální a stacionární fází růstu (Larisch et al., 2007; Oguiza et al., 1997). Proto se předpokládá, že mnoho promotorů, které jsou aktivní během exponenciální fáze růstu, jsou  $\sigma^A$ -dependentní. Nelze ale vyloučit, že některé tyto promotory požadují další sigma faktory pro svou funkci nebo mohou být alternativně rozpoznány dvěma a nebo více sigma faktory. Jelikož inaktivace genu *sigA* je pro buňku letální, je obtížné potvrdit závislost promotorů na  $\sigma^A$  (Pátek a Nešvera, 2011).

Sekvence DNA vazebných oblastí  $\sigma^A$  (zejména 2.4 a 3.0) jsou velmi podobné příslušným sekvencím uvnitř hlavních sigma faktorů ostatních bakterií.

Po kombinaci výsledků up- a downmutací promotorů a statistického konsenzusu *C. glutamicum* byl určen funkční konsenzus  $\sigma^A$ -dependentních promotorů pro rozšířenou -10 oblast TGNTATAATNG (jádro hexameru podtrženě) a pro -35 oblast TTGA/CCA (Pátek a Nešvera, 2011).

#### Sigma faktor $\sigma^B$

Jedná se o sigma faktor patřící do skupiny 2, který se je neesenciální. Během exponenciální fáze růstu je exprese genu *sigB* nižší než exprese *sigA* (Oguiza et al., 1997). Úroveň transkripce genu *sigB* je zvýšená během přechodné fáze mezi exponenciální a stacionární fází růstu (Larisch et al., 2007). Současně se snižuje transkripce *sigA* a  $\sigma^A$  je



nahrazen  $\sigma^B$  podjednotkou v holoenzymu RNA polymerasy. Bylo prokázáno, že zvýšenou expresí mnoha genů *C. glutamicum* během přechodné fáze mezi exponenciální a stacionární fází růstu je závislá na přítomnosti  $\sigma^B$  v buňce (Larisch et al., 2007).

Expres *sigB* je zvýšená v odpovědi na stres působením kyseliny, solí, ethanolu, chladu a tepla (Barreiro et al., 2009; Halgasova et al., 2002), během kyslíkové deprivace (Ehira et al., 2008), během adaptace na kyselinu mléčnou (Jakob et al., 2007) a při stringentní odpovědi (Brockmann-Gretza and Kalinowski, 2006).

Promotor genu *sigB* *C. glutamicum* je  $\sigma^H$ -dependentní což souvisí s jeho funkcí při odpovědi na různé typy stresů (Ehira et al., 2009). Vzhledem k tomu, že  $\sigma^B$  se účastní exprese některých genů během exponenciální fáze se předpokládá, že je v *sigB* promotorové oblasti přítomen další, zatím neznámý, promotor rozpoznávaný  $\sigma^A$  nebo  $\sigma^B$  (Pátek a Nešvera, 2011).

SigB-dependentní promotory obsahují -10 sekvence, které jsou nerozeznatelné od konsenzusu  $\sigma^A$ -dependentních promotorů. Nukleotidy T(1), A(2) a T(6) v -10 hexameru jsou značně konzervované (více než 80%), přičemž A/C(3), A(4) a A(5) jsou mírně konzervované (více než 40%) a TGA nukleotidy „downstream“ od -10 hexameru se také zdají být konzervované (více než 50%). Hlavní motiv -35 oblasti není odlišný. Počet předpokládaných  $\sigma^B$ -dependentních promotorů je příliš malý k určení statistického konsenzusu sekvence (Weber et al., 2005).

### Sigma faktor $\sigma^C$ a $\sigma^D$

Funkce  $\sigma^C$  a  $\sigma^D$  v *C. glutamicum* a struktura příslušných promotorů nebyla ještě prokázána. Je domněnka, že  $\sigma^D$  je zapojen v transkripci genů odpovědných za adaptaci buněk na nízkou koncentraci kyslíku (Ikeda et al., 2009).

### Sigma faktor $\sigma^E$

SigE se v *C. glutamicum* účastní odpovědi na povrchový buněčný stres, tepelný stres a pravděpodobně také v dalších procesech regulace buněčné adaptace na neoptimální růstové podmínky.  $\sigma^E$ -deficitní kmen byl citlivý vůči SDS, EDTA, lysozymu a tepelnému stresu (Park et al., 2008).

Expres *sigE* je během exponenciální fáze poměrně nízká, zvyšuje se ale po povrchovém buněčném stresu (Park et al., 2008) a tepelném stresu (Barreiro et al., 2009; Park et al., 2008). Kromě toho se úroveň transkripce *sigE* zvyšuje během adaptace na kyselinu mléčnou (Jakob et al., 2007), při hladovění na dusík (Silberbach et al., 2005),

nedostatku hořčíku (Park et al., 2008) a v *rel*-knock-out kmeni, který je schopen vyvolat stringentní odpověď (Brockmann-Gretza a Kalinowski, 2006). To naznačuje jeho roli v expresi genů během pomalého růstu za limitovaných nutričních podmínek.

Kromě transkripční regulace je aktivita *sigE* regulována jeho anti-sigma faktorem CseE, který je kódován „downstream“ *cseE* genem. Ten je kotranskribován v *sigE-cseE* transkriptu (Park et al., 2008). Zdá se, že  $\sigma^E$  *C. glutamicum* má podobnou roli jako  $\sigma^E$  v *M. tuberculosis*, který hraje roli v buněčném přežití za podmínek tepelného a povrchového stresu a je regulován anti-sigma faktorem (Rodrigue et al., 2006). Konsenzus motivů  $\sigma^E$ -dependentních mykobakteriálních promotorů (Sachdeva et al., 2010) jsou podobné těm, které jsou rozpoznávané  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  v *C. glutamicum*.

### Sigma faktor $\sigma^H$

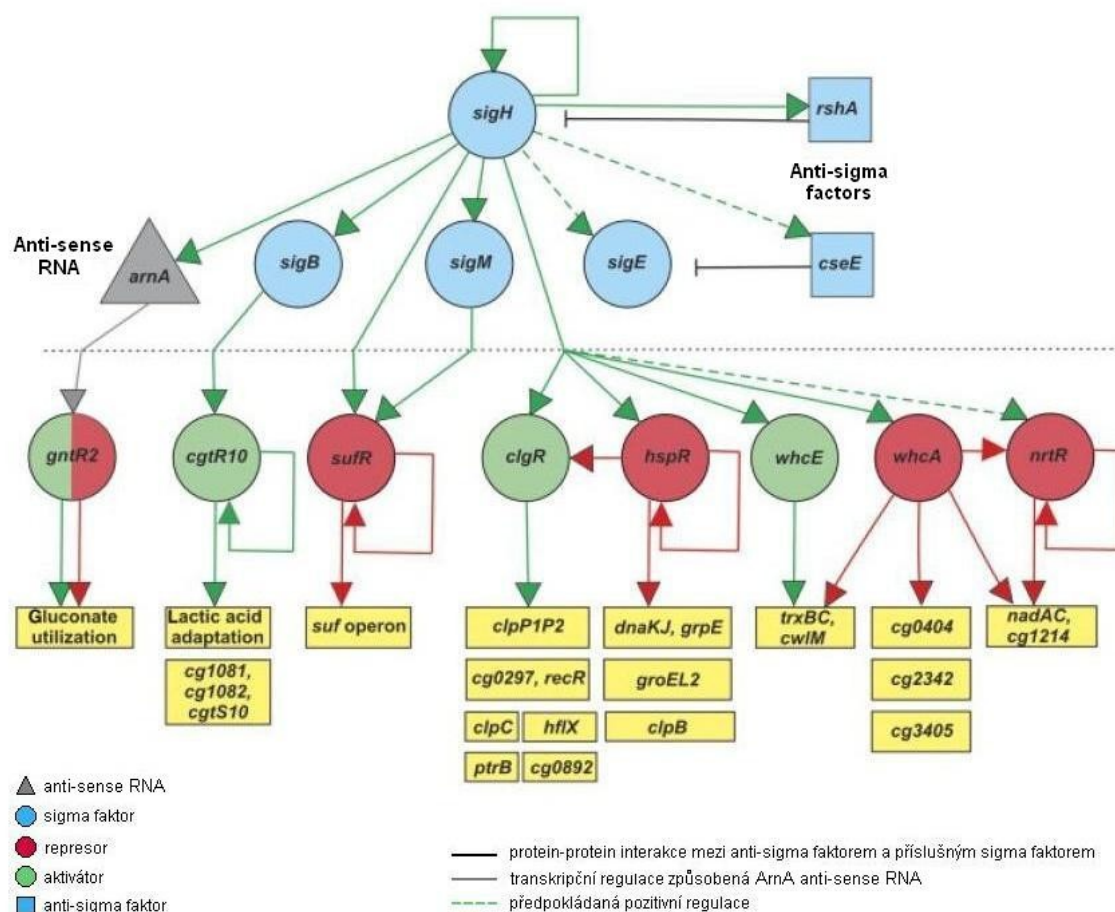
Jedná se o sigma faktor skupiny 4 (ECF), který reguluje odpověď na tepelný a oxidativní stres. Je zapojen do transkripce *sigB* (Ehira et al., 2008) a *sigM* (Nakunst et al., 2007) a do vlastní regulace (Kim et al., 2005) (Obr. 3).

$\sigma^H$  regulon zahrnuje geny regulátorů stresové odpovědi HspR (Barreiro et al., 2009), ClgR (Engels et al., 2004), SufR (Ehira et al., 2009), WhcA (Choi et al., 2009) a WhcE (Kim et al., 2005) (Obr.3). Předpokládá se, že  $\sigma^H$  je globální regulátor genů *C. glutamicum*, který se účastní regulace odpovědi na oxidativní a tepelný stres, stejně jako na celou řadu podnětů vyvolaných stresem na počátku stacionární růstové fáze (Schröder and Tauch, 2010). Tento předpoklad podporuje fakt, že gen *sigH* je přítomen ve všech sekvencích genomů korynebakterií a je vysoce konzervován v korynebakteriích a mykobakteriích.

Aktivita  $\sigma^H$  v *C. glutamicum* je s největší pravděpodobností regulována anti-sigma faktorem RshA prostřednictvím mechanismů na posttranslační úrovni (Pátek a Nešvera, 2011).

Bylo objeveno, že delece *sigH* způsobuje senzitivitu *C. glutamicum* k diamidu (*trxB* gen kódující thioredoxin reduktázu je pod kontrolou  $\sigma^H$ ) (Kim et al., 2005).

Byl navržen konsenzus sekvence  $\sigma^H$ -dependentních promotorů -10 (G/TGGAA) a -35 oblastí (T/CGTT) se spacerem 17-20 nukleotidů. Sekvence -10 a -35 oblastí jsou vysoce konzervované a jsou identické s konsenzusem sekvence  $\sigma^H$ -dependentních promotorů u *M. tuberculosis* a  $\sigma^R$ -dependentních promotorů u *S. coelicolor* (Paget et al., 2001; Raman et al., 2001).



**Obrázek 3. Transkripční regulační síť řídící stresovou odpověď v *C. glutamicum*.**

Vrchní úroveň struktury regulační sítě se skládá ze sigma faktorů a nižší úroveň z lokálních transkripčních regulátorů HspR, ClgR, SufR, WhcE a WhcA, které se účastní v *C. glutamicum* odpovědi na tepelný a oxidativní stres. Další regulační vazby byly rozpoznány při utilizaci glukonátu (GntR2), adaptaci na kyselinu mléčnou (CgtR10) a biosyntéze NAD (NrtR) (Schröder a Tauch, 2010).

### Sigma faktor $\sigma^M$

Jedná se o sigma faktor skupiny 4, který se účastní odpovědi *C. glutamicum* na regulaci oxidativního a tepelného stresu (Nakunst et al., 2007). Kmen nereprodukující  $\sigma^M$  je mnohem citlivější na tepelný, chladový, disulfidový a peroxidový stres.

Gen *sigM* je exprimován z  $\sigma^H$ -dependentního promotoru (Nakunst et al., 2007). Geny regulované  $\sigma^M$  tvoří poměrně malou skupinu  $\sigma^H$  regulonu. Identifikované geny *trxB*, *trxBI* a *trxC*, operon *suf* a *sufR* gen se účastní odpovědi na disulfidový stres (Nakunst et al., 2007).

Na základě výsledků, že některé  $\sigma^H$ -dependentní promotory byly aktivní, i když na nízké úrovni i v  $\sigma^H$ -deficitním kmeni, lze usuzovat, že tyto promotory může rozeznávat další sigma faktor, např.  $\sigma^M$  (Pátek a Nešvera, 2011).

Konsenzus sekvence  $\sigma^M$ -dependentních promotorů byla odvozena mapováním transkripčních počátků. Jádro obsahuje GGAA (-35) a GTT (-10) se spacerem 19 nebo

20 nukleotidů, které jsou identické s objevenými  $\sigma^H$ -dependentními promotory *C. glutamicum*. Protože konsenzus motivu  $\sigma^M$  a  $\sigma^H$  specifických promotorů si jsou velmi podobné, RNAP+  $\sigma^M$  a RNAP+  $\sigma^H$  lze předpokládat, že mohou rozpoznávat stejné promotory za specifických podmínek (Pátek a Nešvera, 2011).

#### 2.2.3.2.1.2. Anti-sigma faktory *Corynebacterium glutamicum*

Alternativní sigma faktory jsou regulovány na transkripční, translační a posttranslační úrovni. Jeden z běžných mechanismů je vratná interakce sigma faktoru s proteinovým inhibitorem zvaným anti-sigma faktor (Helmann 1999). Podle homologie s anti-sigma faktory z *M. tuberculosis* byly v genomu *C. glutamicum* identifikovány tři geny kódující domnělé anti-sigma faktory, dva z nich leží „downstream“ od genů *sigH* a *sigE* a třetí zatím nebyl přiřazen k žádnému ze sigma faktorů *C. glutamicum* (Pátek, 2005). Anti-sigma faktor pro  $\sigma^E$  je označován CseE a anti-sigma faktor pro  $\sigma^H$  je označován RshA.

##### CseE pro $\sigma^E$

Aktivita SigE proteinu je pravděpodobně regulována působením anti-sigma faktoru CseE. Anti-sigma faktor inhibuje funkci sigma faktoru vratnou protein-protein interakcí. CseE *C. glutamicum* je protein tvořený 164 aminokyselinami končící čtyřmi konzervovanými cysteinovými zbytky a to může být esenciální pro funkci CseE při inhibici aktivity SigE (Park et al., 2008).

##### RshA pro $\sigma^H$

Gen *rshA* kóduje anti-sigma faktor řídící funkci na stres odpovídajícího sigma faktoru SigH *C. glutamicum*. Tento gen je relativně malý (267 nukleotidů) a jeho proteinový produkt RshA nese konzervované cysteinové zbytky, které nepřímo interagují se SigH a RshA v ZAS doméně.

Geny *sigH* a *rshA* jsou lokalizovány spolu v genovém klastru. Transkripční analýzy odhalily, že *sigH* a *rshA* geny jsou kotranskribovány ze čtyř vegetativních promotorů u *C. glutamicum*. Gen *rshA* je kromě toho transkribován ještě z vlastního  $\sigma^H$ -dependentního promotoru. Transkripční uspořádání *sigH-rshA* operonu *C. glutamicum* je podobné, ne však identické, k těm v *M. tuberculosis* (Song et al., 2003) a *S. coelicolor*. Tento operon má pravděpodobně mnohonásobný promotor, jako má operon *sigR-rsrA* *S. coelicolor* (Kang et al., 1999).

Transkripce *rshA* z vlastního  $\sigma^H$ -dependentního promotoru může sloužit k rychlému vypnutí SigH-dependentní stresové odpovědi buněk po překonání stresové podmínky. Za stresových podmínek je SigH inhibován redukovanou formou RshA. Rozrušení SigH-RshA komplexu se objevuje za silného tepelného šoku nebo disulfidového stresu změnou ve struktuře během oxidace RshA. Uvolněné SigH formy se vážou s jádrem RNAP holoenzymu a vyvolávají stresovou odpověď transkripcí  $\sigma^H$ -dependentních genů včetně genů účastnících se odpovědi na disulfidový a tepelný stres. Regulační indukce anti-sigma faktoru RshA umožňuje buňce rychle vyřadit stresovou odpověď, založenou na  $\sigma^H$ -dependentní transkripci, po povrchovém stresu. RshA, jako stresový redox senzor, je jedním z cílů biochemické dráhy kódované geny SigH sítě, zejména redukčních sloučenin thioredoxinu a mycothiolu. Přímá indukce *trxBIC* genu generuje thiol thioredoxinu a produkty genů *trxB*, *mtr*, *mca* a *mshC*, redukuje a/nebo recykluje thioredoxin a mycothiol, které jsou schopné spolu s ostatními reduktasami a redukovanými komponentami obnovit thiol redox rovnováhu a zvrátit oxidaci cysteinových zbytků v RshA. V této uzavřené smyčce se redukcí RshA obnoví jeho funkčnost a váže SigH po redox homeostázi (Busche et al., zasláno do tisku).

#### 2.2.3.2.2. Rodina $\sigma^{54}$

Sigma faktory rodiny  $\sigma^{54}$  asociují se stejným jádrem RNA polymerasy jako rodina sigma faktorů  $\sigma^{70}$ , ale regulují transkripci podstatně odlišným mechanismem (Hong et al., 2009). Promotorové elementy pro  $\sigma^{54}$  obsahují dvě vysoce konzervované sekvence umístěné -12 (TGC) a -24 (GG) párů bází „upstream“ od místa počátku transkripce genu (Doucleff et al., 2007). K otevření promotorové DNA a iniciace transkripce potřebuje  $\sigma^{54}$ -RNAP holoenzym vazbu speciálního aktivátorového proteinu, který hydrolyzuje ATP, a uvolněnou energii potřebuje k přetvoření jejich substrátu (Rappas et al., 2007).

Transkripční aktivace  $\sigma^{54}$ -dependentních promotorů je absolutně závislá na aktivačních proteinech, jež jsou členy AAA+ (ATPasy asociované s různými buněčnými aktivitami) proteinové rodiny (Zhang et al., 2002). Jejich funkce spočívá v použití energie získané z ATP hydrolýzy na isomerizaci  $\sigma^{54}$ -RNAP holoenzymu z uzavřeného na otevřený komplex (Schumacher et al., 2004).  $\sigma^{54}$  aktivátory jsou také známé jako bakteriální enhancer vazebné proteiny (bEBPs) (Hong et al., 2009).

$\sigma^{54}$  je děleno na 3 oblasti na základě funkce (Bordes et al., 2003). Oblast I interaguje s aktivátorovými proteiny a -12 elementem promotoru, kde vyvolává tání DNA (Bose et al., 2008). Oblast II je variabilní a občas chybí. Oblast III obsahuje množství

funkčních modulů, včetně determinant, které vážou jádro RNA polymerasy a promotorovou DNA (Burrows et al., 2004). Oblast, která může být spojena s DNA a charakteristický motiv  $\sigma^{54}$  proteinů, zvaný RpoN box, jsou lokalizovány v C-terminální oblasti (Wigneshweraraj et al., 2005).

Rodina  $\sigma^{54}$  je zapojena v řízení transkripce genů spojených s metabolismem dusíku, s různými stresy a za podmínek limitování růstu včetně fágových stresů, cytotoxicity způsobené dusíkovým stresem a patogenicitou (Ghosh et al., 2010). Je také esenciální pro virulenci mnoha živočišných patogenů, např. pro původce lymfské boreliózy, *Borrelia burgdorferi* (Hong et al., 2009). U korynebakterií nebyly sigma faktory rodiny  $\sigma^{54}$  dosud popsány.

### 2.2.3.3. Role sigma faktorů při odpovědi na tepelný stres

Všechny organizmy reagují na náhlé zvýšení teploty zvýšenou expresí sady vysoce konzervovaných proteinů, nazývaných „*heat shock proteins*“ (HSPs). Tyto proteiny zahrnují molekulární chaperony (DnaK, DnaJ, GrpE, ClpB, GroEL, GroES), které asistují při skládání nascentních proteinů a opravují poškození proteinů, a ATP-dependentní proteasy, které degradují špatně složené proteiny.

Odpověď na tepelný šok je řízena kombinací působení alternativních sigma faktorů a transkripčních regulátorů. Alternativní sigma faktory rozpoznávají specifické „*heat shock*“ promotory „upstream“ od „*heat shock*“ genů. Transkripční regulátory fungují jako represory nebo aktivátory vazbou na promotorové oblasti určitých „*heat shock*“ genů.

V *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma faktor SigH hraje centrální roli v regulační síti odpovědi na tepelný a oxidativní stres. Dva transkripční represory, HrcA a HspR, jsou odpovědné za regulaci „*heat shock*“ genů v asociaci s DNA elementy nazvanými CIRCE (controlling inverted repeat of chaperone expression) a HAIR (HspR-associated inverted repeat).

V *C. glutamicum* byla prokázána aktivace 18 genů (kódujících transkripční regulátory) tepelným stresem, což naznačuje existenci komplexní regulační sítě odpovídající na tepelný stres. Detailní analýza transkripční regulace *clpP1-clpP2* operonu a genu *clpC* (každý kóduje podjednotku ATP-dependentní proteasy) prokázala zapojení ECF sigma faktoru SigH v jejich expresi. Mimo to, sekvenční analýzou promotorových oblastí *groES*, *groEL2* a *dnaK* byly identifikovány CIRCE a HAIR elementy blízko -10 a -35 oblastí promotorů prokazující zapojení HrcA a HspR v regulaci odpovědi na tepelný

šok u *C. glutamicum*. Bylo prokázáno, že transkripční regulátor HspR snižuje expresi operonů *clpB* a *dnaK* a HrcA snižuje expresi *groES* a *groEL2* (Ehira et al., 2009).

SigH reguluje kromě části buněčných chaperonů a transkripčního regulátoru HspR také ClgR protein, který spouští proteolýzu a mechanismy opravující DNA (Brinkrolf et al., 2007).

#### 2.2.3.4. Role sigma faktorů při odpovědi na disulfidový stres

Disulfidový stres je považován za podkategorii oxidativního stresu a je vyvolán oxidací thiolu. Stejně jako tepelný a chladový stres způsobuje nesprávné skládání proteinů (Nakunst et al., 2007). Redoxní komponenty, jako je diamid, menadion či plumbagin, svým toxickým efektem buď stimulují intracelulární produkci superoxidových radikálů a peroxidu vodíku, nebo uvolňují elektrony z redukčních dějů, čímž navozují zvýšení úrovně nežádoucích disulfidových vazebných forem v buňce. Thioredoxin reductasa redukuje oxidovaný thioredoxin pomocí NADPH jako kofaktoru a redukovaný thioredoxin může reaktivovat oxidované proteiny (Kim et al., 2005).

Bylo zjištěno, že většina SigM-dependentních genů je zapojena do odpovědi na disulfidový stres v *C. glutamicum*. SigM-dependentní geny se dají rozdělit do dvou skupin.

První skupina genů se účastní odpovědi na disulfidový stres a patří sem geny *sufR*, *sufB*, *sufD*, *sufC*, *sufS*, *sufU*, *trxB1*, *trxB*, *trxC*, *cwlM*, *clpB*, *groES* a *groEL*. Geny *trx* kódují opravné funkce pro oxidované thiolové skupiny proteinů (Nakunst et al., 2007). Exprese genu *trxB*, kódujícího thioredoxin reductasu, je pod nepřímou kontrolou genu *sigH* (Obr. 4) (Kim et al., 2005). *whcE* gen není esenciální pro základní přežití *C. glutamicum*, ale je důležitý pro přežití po oxidativním a tepelném stresu. Pod jeho pozitivní kontrolu patří gen *trxB* a sám je pod kontrolou *sigH*. Také se zdá být zapojen do odpovědi na tepelný stres (Kim et al., 2005). Geny *whcE* a *whcA* sdílí několik vlastností, cílové geny a regulačních dějů obou těchto genů se účastní SigH. Na rozdíl od *whcE* gen *whcA* má negativní roli v odpovědi na oxidativní stres. Pod jeho negativní regulaci patří geny kódující thioredoxin reductasu, NADH oxidasu, alkohol dehydrogenasu a chinon reductasu. Byl zjištěn náznak, že alternativní  $\sigma^H$  je ve stejné regulační kaskádě s WhcA (Choi et al., 2008).





## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Kultivační půdy

##### Půda 2xTY (1 000 ml)

Bylo odváženo 16 gramů tryptonu (Oxoid), 10 gramů yeast extraktu (Serva) a 5 gramů chloridu sodného (Lachema) a doplněno destilovanou vodou do jednoho litru, sterilizováno autoklávováním. Kultivační půda měla pH 6,8, která nebyla upravována. Pro přípravu pevné půdy bylo na jeden litr půdy přidáno 15 gramů agaru (Liofilchem).

Pro selekci na antibiotikum kanamycin (Serva) bylo po sterilizaci přidáno 150  $\mu\text{l}$  (pro koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$ ) či 50  $\mu\text{l}$  (pro koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ ) zásobního roztoku (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

Pro selekci na ampicilin (Carl Roth GmbH) se přidalo po sterilizaci 500  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ampicilinu pro výslednou koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Tato kultivační půda se používala pro antibiotikovou selekci vektoru pMA-T dodaného s nasyntetizovaným mutovaným fragmentem firmou GeneArt.

##### Pevná půda 2xTY+Km30+IPTG+x-gal

Na misku půdy 2xTY se selekcí na kanamycin o koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$  bylo rovnoměrně rozetřeno 40  $\mu\text{l}$  X-gal (20 mg/ml v dimethylsulfoxidu; Serva) a 4  $\mu\text{l}$  IPTG (200 mg/ml; Serva). Tato půda byla použita pro selekci transformantů s rekombinantními plazmidy vzniklými po klonování do vektoru pKSAC45.

#### 3.1.2. Bakteriální kmeny

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*,  $\Delta$ *lacU169*, [ $\Phi$ 80*lacZ*  $\Delta$ *M15*], *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) – kmen umožňující  $\alpha$ -komplementaci  $\beta$ -galaktosidasy (Hanahan, 1985)

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (typový kmen)

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ *sigH* (diplomová práce Radoslav Šilar, 2007)

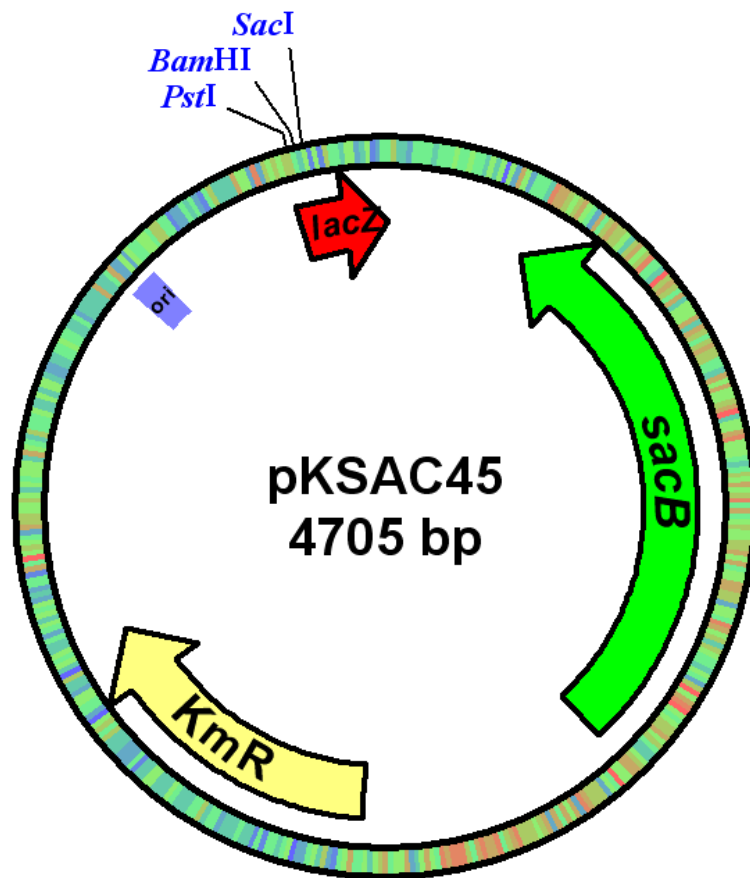
*Corynebacterium glutamicum* RES167  $\Delta$ *sigM* (Tobias Busche, Biefeld; nepublikováno)

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ *sigH*  $\Delta$ *sigM* (Tobias Busche, Biefeld; nepublikováno)

### 3.1.3. Plazmidy

- pKSAC45 – kanamycin rezistentní, *sacB*, *lacZ*, nereplikující se v *C.glutamicum* (Holátko et al., 2006)
- pET2 – kanamycin rezistentní, podvojný (*E. coli* a *C. glutamicum*), „*promoter-probe*“ vektor (Vašicová et al., 1998)
- pET2/P-*dnaK* – promotor genu *dnaK* z *C. glutamicum* (Barreiro et al., 2004)
- pET2/P-*sigM* – promotor genu *sigM* z *C. glutamicum* (Pavla Kadeřábková, Praha; nepublikováno)
- pET2/P-*dnaK*mut – promotor genu *dnaK* s nefunkčním *sigH*-dependentním promotorem z *C. glutamicum* (tato práce)
- pET2/P-*sigM*mut – mutace v promotoru genu *sigM* z *C. glutamicum* (tato práce)

## Plazmid pKSAC45

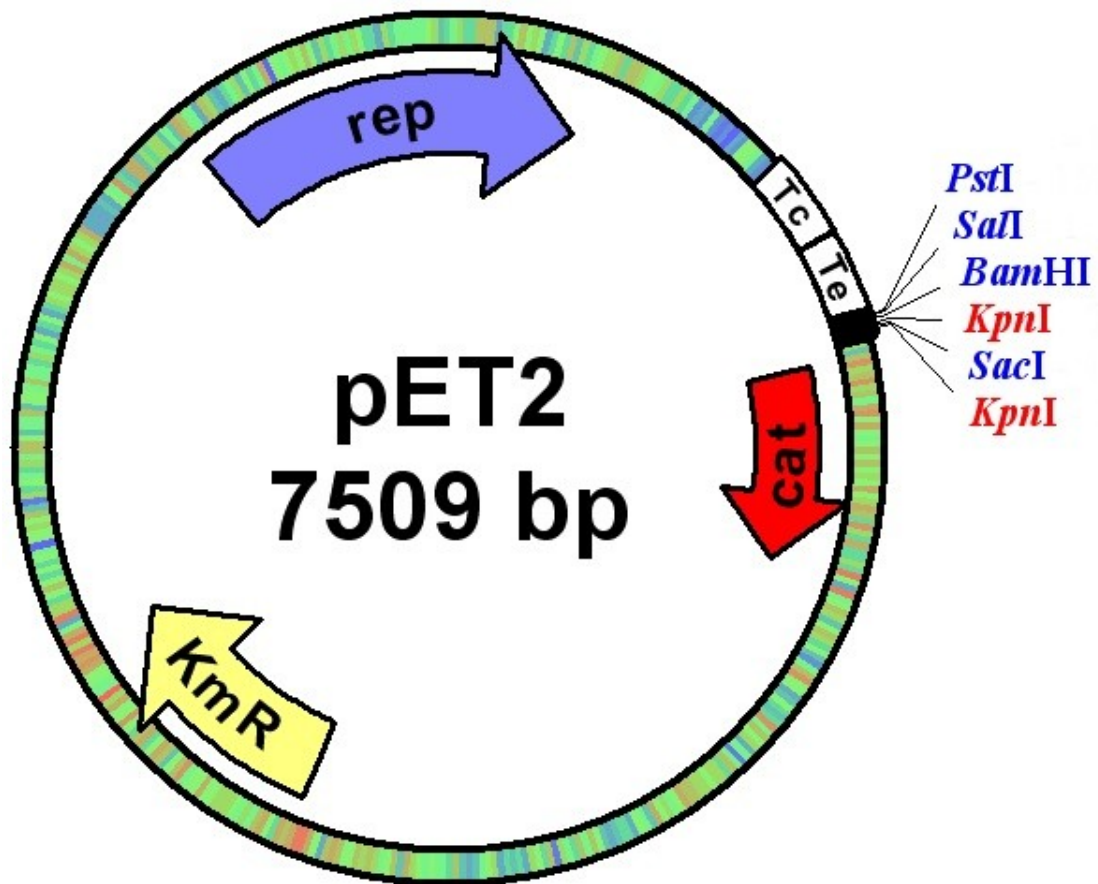


**Obrázek 5.** Genetická a restrikční mapa „*promoter-probe*“ vektoru pKSAC45.

Replikativní plazmid v *E. coli* a integrativní v *C. glutamicum*. Je možno použít pro zavádění chromosomálních mutací v *C. glutamicum*.

- *ori* – transkripční počátek
- *lacZ* – gen kódující  $\beta$ -galaktosidasu
- *sacB* – gen kódující levansukrasu
- Km<sup>R</sup> = *aph* - gen kódující enzym aminoglycosid fosfotransferasu, která determinuje rezistenci ke kanamycinu

## Plazmid pET2

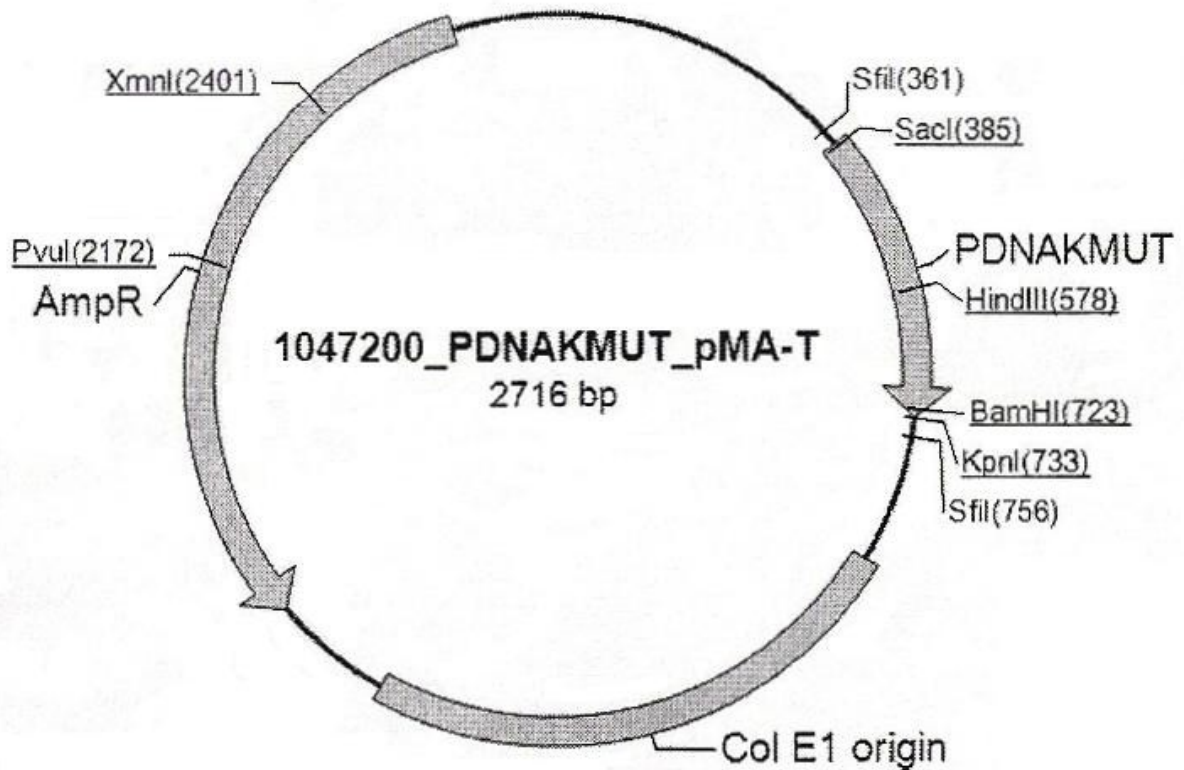


**Obrázek 6. Genetická a restriční mapa „promoter-probe“ vektoru pET2.**

Podvojný replikativní vektor pET2 (Vašicová *et al.*, 1998) je možno použít pro měření síly promotorů v *E. coli* a *C. glutamicum*. Vektor pET2 je nositelem pěti unikátních klonovacích míst (*Pst*I, *Sa*II, *Bam*HI, *Kpn*I a *Sac*I).

- *cat* – bezpromotorový gen (reportérový gen) kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu, která determinuje rezistenci k chloramfenikolu
- $Km^R = aph$  - gen kódující enzym aminoglycosid fosfotransferasu, která determinuje rezistenci ke kanamycinu
- *rep* – gen kódující replikasu
- $T_C$  – transkripční terminátor genu *leuB* z *C. glutamicum*
- $T_E$  – transkripční terminátor genu *rrnBT<sub>1</sub>T<sub>2</sub>* z *E. coli*

## Plazmid pMAT-PDNAKMUT



**Obrázek 7. Genetická a restriční mapa plazmidu pMAT/PDNAKMUT.**

Firmou GeneArt nasyntetizovaný mutovaný fragment promotoru genu *dnaK* klonovaný do vektoru pMA-T přes *Sfi*L a *Sfi*L klonovací místa a transformovaný do *E. coli*.

- PDNAKMUT – mutovaný fragment promotoru genu *dnaK* (354 bp)
- AmpR – gen kódující  $\beta$ -laktamasu, která determinuje rezistenci k ampicilinu
- Col E1 origin – počátek replikace

### 3.1.4. Primery pro PCR

Tabulka 1. Seznam použitých primerů (Sigma).

Primer	Sekvence oligonukleotidu (5' - 3')
PSIGMF	atctgcagattcaacgacgcctca
PSIGMM10R	gtttgtgaggaaacgggtctgatcgac
PSIGMM10F	gtcgatcagaccggtcctcacia
PSIGMR	ccggatccaaactgtttgacgagt

### 3.1.5. Komerční soupravy

QIAquick® Gel Extraction Kit, Promega

DNA Clean & Concentrator-25, Zyma Research Exbio

PureYield Plazmid Miniprep System, Promega

### 3.1.6. Použitý software

MS Office 2003 CZ, MS Office 2010 CZ (<http://office.microsoft.com>)

pDRAW32 – analýza a zpracování sekvencí (<http://www.acaclone.com>)

KODAK 1D *Image analysis Software*

### 3.1.7. Přístroje

Tabulka 2. Použité přístroje.

Název	Výrobce
Automatický autokláv MAC-235EX	Sanyo, USA
Biochrom WPA CO 8000 Biowave Cell Density Meter	Biochrom Ltd, UK
Blockthermostat BT100	KLEINFELD Labortechnik, Germany
Digitální kamera KODAK DC290 Zoom	KODAK
Electrophoresis power supply ST 305	Life Technologies, USA
Elektroporátor Bio-Rad Gene Pulser	Bio-Rad, USA
Fast Prep FP120	Thermo Electron Comporation, USA
Laboratorní váhy L610D	Sartorius, SRN
Odstředivka EBA 12R	Hettich, SRN
Odstředivka PMC-880 Capsulefuge	Gilson, Inc., USA
Odstředivka RT6000B	Sorwall, USA
Odstředivka Sigma 112	Sigma, SRN
pH-metr PHM210	Radiometer Analytical S.A., Francie
Savant DNA 120 SpeedVac System	Thermo sciencetific, USA
Spektrofotometr Biomate 5	Thermospectronics, UK
TC-3000 Thermal Cycler	Barloworld Scientific, USA
Termocykler s teplotním gradientem	Biometra, SRN
Vortex Zx3	P-LAB a.s., ČR

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Kultivace *E. coli* a *C. glutamicum*

#### Materiál

Půda 2xTY

Antibiotikum kanamycin (Serva)

#### Postup

Kmen *E. coli* byl kultivován při 37 °C na pevné půdě či v tekutém mediu 2xTY. Kmen *C. glutamicum* byl kultivován při 30 °C na pevné půdě či tekutém mediu 2xTY. Pro selekci kmenů nesoucí plazmidy s rezistencí na kanamycin bylo do kultivačního media přidáno antibiotikum kanamycin s výslednou koncentrací 10 µg/ml (Km10) nebo 30 µg/ml (Km30). Kultivace v tekutém mediu probíhala na rotační třepačce.

### 3.2.2. Identifikace klonů *E. coli* s rekombinantními plazmidy

#### **α- komplementací β-galaktosidasy**

#### Materiál

Pevná půda 2xTY Km30

X-gal [Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid ] (20 mg/ml)

IPTG [Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid ] (200 mg/ml)

#### Postup

Na misku s půdou 2xTY Km30 bylo rovnoměrným rozetřením přidáno 40 µl X-gal a 4 µl IPTG. Po vysušení bylo na misku vyseto 200 µl suspenze buněk EC DH5α/pKSAC45/P-*sigM*mut. Inkubace probíhala 12 hodin ve 37 °C a poté byly vizuálně identifikovány kolonie bílé (obsahovaly rekombinantní plazmidy, tedy pKSAC45/P-*sigM*mut) a modré kolonie (obsahovaly pouze vektor pKSAC45).

### 3.2.3. Izolace nukleových kyselin

#### 3.2.3.1. Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

##### Materiál

Pufir GET (50 mM glukosa (Lachema), 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), 25 mM Tris-HCl (Sigma); pH 8,0)

Čerstvě připravený NaOH-SDS 0,2 M-1 % (2 M NaOH (Lachema) a 10 % SDS (Serva))

Octan draselný (3 M acetát K (Sigma), pH 4,8 upraveno k. octovou)

Isopropanol (Lachema)

LiCl (5 M LiCl (Sigma) v 50 mM Tris-HCl, pH 7,5)

96 % EtOH (Fagron)

RNasa (20 mg/ml) (Serva)

Fenol (Serva):chloroform 1:1

Chloroform:isoamylalkohol 24:1

70 % EtOH

Pufir TE (10-1)(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0)

##### Postup

Přes noc narostlá kultura *E. coli* v 50 ml tekutého media 2xTY Km30 byla zchlazena na 5 minut v ledu a po převedení do falkony centrifugována 10 minut při 4 °C. Odpipetoval se supernatant a pelet se resuspendoval v 5 ml ledového pufru GET a ponechal 5 minut v ledu. Přidalo se 10 ml 1 % roztoku NaOH-SDS a vzorek se promíchal rychlým převrácením. Po chlazení 10 minut v ledu se přidalo 7,5 ml 3 M octanu draselného a velmi pomalým převrácením se promíchalo. Po 10 minutovém chlazení v ledu se vzorek zcentrifugoval a supernatant se přes sterilní gázu přelil do nové falkony. Plazmidová DNA v supernatantu se srážela 12 ml isopropanolu 10 minut při laboratorní teplotě. Vysušený pelet se rozpustil ve 2 ml sterilní vody, přidal se 2 ml LiCl a po promíchání se vzorek chladil 15 minut v ledu. Po centrifugaci se supernatant prepipetoval do nové falkony. Supernatant obsahoval plazmidovou DNA a pelet RNA. Plazmidová DNA se precipitovala 10 ml 96 % EtOH po 30 minut při -20 °C. Vysušený pelet se rozpustil ve 400 µl pufru TE a přenesl do mikrozkuhavky Eppendorf (dále jen mikrozkuhavka). Přidaly se 3 µl RNasy (20 mg/ml) a inkubovalo se 30 minut při 37 °C. DNA byla přečištěna extrakcí fenolem, chloroformem, srážena ethanolem a rozpuštěna v 50 µl sterilní vody.



### 3.2.3.2 Miniizolace plazmidové DNA z *E. coli*

#### Materiál

Pufr GET (50 mM glukosa, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 25 mM Tris-HCl; pH 8,0)

Čerstvě připravený NaOH-SDS (0,2 M-1 %)

KAc (3 M acetát K, pH 4,8 upraveno k.octovou)

RNasa (40 µg/ml)

96 % EtOH

70 % EtOH

#### Postup

Kmen *E. coli* byl kultivován přes noc na pevné půdě 2xTY Km30 při 37 °C. Poté byla odebrána klička buněk a resuspendována v 100 µl pufru GET připraveném v mikrozkuhavce. Mikrozkuhavka byla ponechána na 5 minut v ledu a poté bylo přidáno 200 µl čerstvě připraveného 1 % roztoku NaOH-SDS. Mikrozkuhavka byla krátce (1 sec) homogenizována a ponechána 5 minut v ledu. Po chlazení v ledu bylo přidáno 150 µl ledového 3M octanu draselného, obsah byl pomalým převrácením promíchán a byl chlazen 15 minut v ledu. Po chlazení byla mikrozkuhavka centrifugována při 4 °C po dobu 9 minut. Supernatant obsahující plazmidovou DNA byl přepipetován do nové mikrozkuhavky, která byla ihned vložena do ledu a bylo přidáno 850 µl 96 % EtOH. Obsah byl promíchán a ponechán precipitaci plazmidové DNA při -20 °C po 10 minut. Po precipitaci byl pelet promyt 200 µl 70 % EtOH při pokojové teplotě a vysušen. Vysušený pelet byl rozpuštěn 20 µl roztoku RNasy (40 µg/ml) a inkubován 30 minut při 37 °C.

### 3.2.3.3. Miniizolace plazmidové DNA z *C. glutamicum*

#### Materiál

SET (300 mM sacharosa, 10mM Na<sub>2</sub>EDTA, 25 mM Tris-HCl ; pH 8,0)

SET+L (SET+lysozym 5 mg/ml SET (lze zamrazit v -20 °C))

KAc (3 M acetát K, pH 4,8 upraveno k. octovou)

20 % SDS

2 M NaOH

Isopropanol

96 % EtOH

70 % EtOH

RNasa 40 mg/ml

### Postup

Z misky 2xTY Km30 přes noc narostlé kultury *C. glutamicum* byla odebrána klička a resuspendována v 300 µl SET+L v mikrozkuhavce. Po 2 hodinách inkubace při 37 °C bylo přidáno 400 µl čerstvě připraveného 1 % roztoku NaOH-SDS, promícháno převrácením a inkubováno 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 300 µl 3 M octanu draselného a pomalým převrácením bylo promícháno. Po chlazení 15 minut v ledu byla mikrozkuhavka centrifugována 5 minut při 4 °C a 17 000x G. Po centrifugaci se supernatant, obsahující plazmidovou DNA, přepipetoval do nových mikrozkuhovek a precipitoval 900 µl 96 % EtOH po 10 minut při -20 °C. Po precipitaci byl pelet promyt 200 µl 70 % EtOH a po vysušení rozpuštěn 5 µl RNasy (40 mg/ml) a 10 min inkubován.

#### **3.2.3.4. Extrakce DNA fenolem**

##### Materiál

Fenol:chloroform 1:1

Chloroform:isoamylalkohol 24:1

##### Postup

K roztoku DNA byl přidán stejný objem fenolu, obsah byl důkladně promíchán třepáním a centrifugován 2 minuty na 13 000x G. Poté byla do nové mikrozkuhavky odebrána pouze horní fáze, do níž byl přidán stejný objem směsi chloroform/isoamylalkoholu jako byl objem roztoku DNA a obsah byl důkladně protřepán a centrifugován 2 minuty na 13 000x G. Horní fáze byla odebrána do nové mikrozkuhavky a získaná DNA byla přečištěna srážením ethanolem.

#### **3.2.3.5. Srážení DNA ethanolem**

##### Materiál

3 M octan draselný

96 % ethanol

70 % ethanol

##### Postup

Před srážením byla k roztoku DNA přidána 1/10 objemu 3 M octanu draselného v objemu 1/10 a DNA byla srážena 96 % ethanolem při -20 °C po dobu alespoň 20 minut.

Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet vysrážené DNA promyt přidáním 100  $\mu$ l 70 % ethanolu. Suspenze byla opět centrifugována a supernatant byl pečlivě odpipetován. Pelet byl vysušen na SpeedVac Concentratoru a resuspendován ve sterilní vodě.

### 3.2.4. Transformace

#### 3.2.4.1. Transformace *E. coli* (Hanahan, 1983)

##### Materiál

Roztok RF1 100 ml (1,2 g RbCl (Sigma), 0,99 g MnCl<sub>2</sub> (1,56 g MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O) (Lachema), 0,15 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (International enzymes limited), 0,29 g octan K, 15 g glycerol (Lachema); pH 5,8 upraveno kyselinou octovou (Lachema), sterilizováno filtrací)  
Roztok RF2 100 ml (0,21 g MOPS (Serva), 0,12 g RbCl, 1,1 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 15 g glycerol; pH 6,8 upraveno NaOH, sterilizováno filtrací)  
MG (1 M MgCl<sub>2</sub> (Lachema), 1 M MgSO<sub>4</sub> (Lachema))

##### Postup

##### Příprava kompetentních buněk

Z přes noc kultivovaných buněk *E. coli* v 5 ml tekutého media 2xTY v 50 ml baňce při 30 °C bylo zaočkováno do 50 ml media 2xTY v 500 ml baňce na OD<sub>600</sub>=0,2. Kultivace probíhala za stálého třepání na OD<sub>600</sub>=0,6 při 30 °C. Po kultivaci se ihned zchladilo v ledu a poté centrifugovalo na chlazené centrifuze 10 minut. Supernatant byl pečlivě odstraněn a pelet byl resuspendován v 17 ml ledového RF1. Po chlazení 15 minut v ledu se následně opět centrifugovalo na 10 minut v chlazené centrifuze. Supernatant byl odlit, pelet resuspendován ve 4 ml ledového RF2 a ponechán 15 min v ledu. Takto připravené kompetentní buňky byly rozplněny do předchlazených mikrozkušavek po 200  $\mu$ l. Kompetentní buňky byly buď hned použity pro transformaci nebo zamrazeny v -70 °C.

##### Transformace

Ke 200  $\mu$ l kompetentních buněk bylo přidáno 10  $\mu$ l ligační směsi nebo 1  $\mu$ l plazmidové DNA (0,1 až 1  $\mu$ g) a ponechalo se 30 minut v ledu. Poté se buňky stresovaly teplotním šokem po 90 sekund při 42 °C a ihned zchladily v ledu. Přidalo se 800  $\mu$ l tekutého media 2xTY, přeneslo se do skleněné zkumavky a inkubovalo za stálého třepání

45 minut při 37 °C. Po inkubaci byl obsah přenesen do mikrozkušavky a centrifugován 2 minuty na 10 000x G. Supernatant byl odpipetován a pelet resuspendován v 200 µl sterilní vody. 100 µl transformační směsi bylo vyseto na pevnou půdu 2xTY Km30 a kultivováno při 37 °C.

### 3.2.4.2. Transformace *C. glutamicum* elektroporací

#### Materiál

Pufr GT (10 % glycerol, 8 mM Tris-HCl; pH 7,4)

Roztok G (10 % glycerol)

#### Postup

##### Příprava kompetentních buněk

Z přes noc kultivovaných buněk *C. glutamicum* v 10 ml tekutého media 2xTY v 100 ml baňce při 30 °C bylo zaočkováno do 100 ml tekutého media 2xTY v 500 ml baňce na OD<sub>600</sub>=0,2. Kultivovalo se za stálého třepání při 30 °C do OD<sub>600</sub>=0,4-0,6 a poté ihned byly kultury zchlazeny v ledu. Buněčná suspenze byla centrifugována v chlazené centrifuze 10 minut a poté byl supernatant důkladně odstraněn. Pelet byl resuspendován v 50 ml pufru GT a následně opět centrifugován v chlazené centrifuze 10 minut. Toto promytí 50 ml pufru GT se opakovalo dvakrát. Po poslední centrifugaci se pelet resuspendoval v 1 ml roztoku G a rozdělil po 200 µl do mikrozkušavek. Kompetentní buňky byly buď přímo použity pro transformaci nebo zamrazeny v -70 °C.

##### Transformace elektroporací

Elektroporační kyvety byly vymyty etanolem, vysušeny a sterilizovány UV zářením po dobu 1 minuty. Elektroporační přístroj Gene Pulser byl nastaven na napětí 2,5 kV, kapacitance 25 µF a odpor 200 Ω.

K 200 µl kompetentních buněk v ledu bylo přidáno 1-5 µl plazmidové DNA, podle její koncentrace, převrácením promícháno a ponecháno inkubovat 1 minutu. Poté byla buněčná suspenze přepipetována do předem vychlazených sterilních elektroporačních kyvet (šířka 0,2 cm) a vystavena elektrickému pulzu trvajícím 4,5-5,5 milisekund. Poté byl ihned přidán 1 ml tekutého media 2xTY a suspenze byla převedena do mikrozkušavky. Buňky byly stresovány při 46 °C 5 minut a poté sterilně převedeny do skleněných zkumavek. Kultivovalo se 2 hodiny při 30 °C za stálého třepání. Po ukončení kultivace, převedení do mikrozkušavek a centrifugování byl odpipetován supernatant.

Pelet se resuspendoval v 300 µl sterilní vody a 100 µl suspenze bylo vyseto na pevnou půdu 2xTY Km30. Kultivace probíhala při 30 °C.

### 3.2.5. Dlouhodobé uchování buněk v glycerolu při -70 °C

#### Materiál

Glycerol sterilní 50 %

#### Postup

Buňky *E. coli* či *C. glutamicum* byly kultivovány přes noc na rotační třepačce v malém objemu media 1-2 ml při 30 °C. Po kultivaci bylo 300 µl buněčné kultury opatrně smícháno s 700 µl 50 % glycerolu. Uchováno při -70 °C.

### 3.2.6. Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu

#### Materiál

Pufř TAE (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA (Sigma), upraven na pH 8 kyselinou octovou)

Agarosa (SeaKem LE)

Indikační směs (30 % glycerol, 0,25 % bromfenolová modř (Serva))

Ethidiumbromid 100 µg/ml v H<sub>2</sub>O (Serva)

GelRed 5 µl/100 ml agarosového gelu (LabMark USA)

#### Postup

Elektroforetická separace plazmidové a chromosomální DNA či fragmentů DNA byla prováděna na agarosovém gelu o koncentraci 0,7 – 1 %, která byla volena podle velikosti analyzované DNA, v pufřu TAE. Ke vzorkům bylo před nanesením na gel přidáno 1-5 µl sterilní vody a 3-4 µl indikační směsi. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 50-90 V po různou dobu podle velikosti DNA. Poté byl gel přenesen do roztoku ethidiumbromidu a ponechán 10-20 minut barvit podle tloušťky a hustoty gelu. Ethidiumbromid byl posléze nahrazen GelRedem, který se přidával přímo do agarosového gelu (5 µl/ 100 ml TAE). Po obarvení byla DNA vizualizována UV zářením a zobrazena pomocí digitální kamery KODAK a počítačovým programem KODAK 1D *Image Analysis Software*.

### 3.2.7. Izolace plazmidové DNA a jejích fragmentů z agarosového gelu

#### Materiál

Kolonky *GenElute* pro purifikaci DNA (Supelco)

QIAquick® Gel Extraction Kit, Promega

#### Postup

DNA byla izolována komerční soupravou QIAquick Gel Extraction kit (250) podle návodu doporučeného výrobcem. Po elektroforetické separaci byl pás gelu obsahující požadovaný fragment DNA vyříznut pomocí skalpelu a přenesen do 2 ml mikrozkuhavky. Dále se postupovalo podle návodu komerční soupravy, kde byl gel ztekucen a přenesen do kolonky *GenElute*. Kolonka byla nasazena volně na mikrozkuhavce a centrifugována 13 000x G. Vodný roztok získaný po centrifugaci v mikrozkuhavce obsahoval izolovanou DNA, případně byl zakoncentrován na SpeedVac Concentratoru na objem 10 µl.

### 3.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

#### Materiál

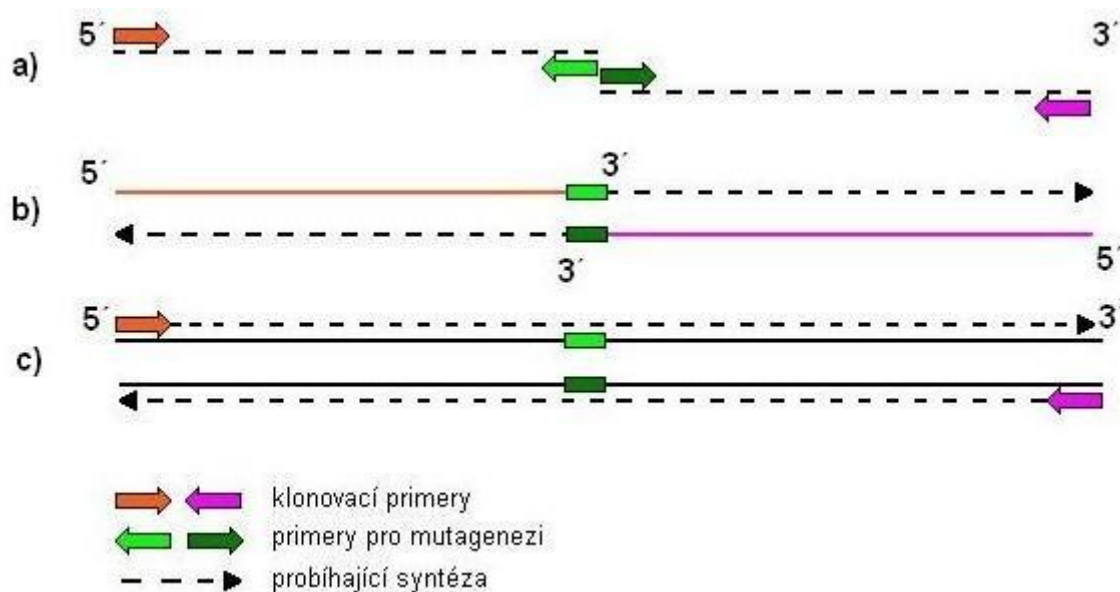
DNA polymerasa a pufr Green Go Taq

Pfx polymerasa a pufr INVITROGEN

dNTP 10 mM (TopBio)

10x zředěné primery

PCR a dvoustupňová PCR byly použity pro mutagenezi -10 hexameru promotoru genů *sigM* vedoucí k jeho vyřazení. PCR reakce pro konstrukci polovin fragmentu (Obr. 8a,b) proběhly v reakční směsi (Tab. 3) v navoleném PCR programu (Tab. 4) a ty pak byly dále použity v dvoustupňové PCR v reakční směsi (Tab. 5) a PCR programu (Tab. 6) pro konstrukci finálního fragmentu (Obr. 8c) viz. Výsledky podkapitola 4.2. Konstrukce kmene *C. glutamicum* s mutantním promotorem genu *sigM*.



**Obrázek 8. Schéma PCR a dvoustupňové PCR pro mutagenezi.**

Poloviční fragmenty z PCR (a) posloužily jako templát ve dvoustupňové PCR, kdy v prvním stupni (b) fragmenty v místě sekvenční odpovídající mutačním primerům zhybridizují tak, že sekvenční každého z polovičky fragmentu je templátem pro syntézu druhého polovičního fragmentu vycházejícího z 3' konce. Ve druhém stupni (c) byl kompletní fragment nesoucí mutaci amplifikován pomocí koncových klonovacích primerů.

### 3.2.8.1 Polymerázová řetězová reakce

**Tabulka 3. Složení reakční směsi pro PCR.**

Komponenta	Objem ve 100 $\mu\text{l}$ <sup>I</sup>
Reakční pufr <sup>II</sup>	10-20 $\mu\text{l}$
dNTP	2 $\mu\text{l}$
Polymerasa <sup>II</sup>	0,5-2 $\mu\text{l}$
Templát <sup>IV</sup>	1-2 $\mu\text{l}$
Primer 1	1-3 $\mu\text{l}$
Primer 2	1-3 $\mu\text{l}$
MgSO <sub>4</sub> <sup>III</sup>	2 $\mu\text{l}$
Voda	Doplnit do 100 $\mu\text{l}$

<sup>I</sup>Objem byl rozdělen poté po 20  $\mu\text{l}$ , jelikož byla reakce prováděna za teplotního gradientu.

<sup>II</sup>Použité množství bylo voleno podle použité polymerasy a příslušného pufru.

<sup>III</sup>MgSO<sub>4</sub> bylo použito pouze při použití Pfx polymerasy.

<sup>IV</sup>Jako templát byla použita nepurifikovaná totální buněčná DNA (buněčný lyzát ze získaných transformantů).

**Tabulka 4. Program PCR reakce.**

Cyklus	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	94 °C	2 min	1
2	Denaturace	94 °C	30 sec	25
	Hybridizace <sup>I</sup>	$T_m \pm 5$ °C	30 sec	
	Syntéza <sup>II</sup>	68 nebo 72 °C	40 sec <sup>III</sup>	
3	Závěrečná syntéza <sup>II</sup>	68 nebo 72 °C	5 min	1

<sup>I</sup>Ve fázi hybridizace oligonukleotidové primery hybridizují s řetězcem templátové DNA na principu komplementarity. Teplota hybridizace byla volena podle výpočtu teploty tání jednotlivých primerů ( $T_m$ ) podle vzorce  $T_m [°C] = (2(A+T) + 4(G+C)) - 1,5(\text{mismatch}) - 5$ . Jelikož se teplota pro oba primery různila, byla použita ta nižší. Hybridizace probíhala za teplotního gradientu, volené  $T_m \pm 5$  °C.

<sup>II</sup>Pro syntézu a závěrečnou syntézu byla použita teplota volená podle optimální teploty pro aktivitu polymerasy. Při použití Pfx polymerasy byla použita teplota 68 °C, u GreenGoTaq 72 °C.

<sup>III</sup>Doba syntézy byla odvozena podle závislosti na velikosti syntetizovaných fragmentů, kdy syntéza 1 kb DNA trvá 1 minutu.

### 3.2.8.2. Dvoustupňová PCR (cross-over PCR)

**Tabulka 5. Složení reakční směsi.**

Komponenta	Objem ve 100 $\mu\text{l}$ <sup>I</sup>
Reakční pufr <sup>II</sup>	10 $\mu\text{l}$
dNTP	3 $\mu\text{l}$
Polymerasa <sup>II</sup>	2 $\mu\text{l}$
Templát	5 $\mu\text{l}$
Primer 1	3 $\mu\text{l}$
Primer 2	3 $\mu\text{l}$
MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu\text{l}$
Voda	Doplnit do 100 $\mu\text{l}$

<sup>I</sup>Objem byl rozdělen poté po 20  $\mu\text{l}$ , jelikož byla reakce prováděna za gradientové teploty.

<sup>II</sup>Byla použita Pfx polymerasa a reakční pufr INVITROGEN.



**Tabulka 6. Program PCR reakce.**

Cyklus	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	94 °C	2 min	1
2	Denaturace	94 °C	30 sec	5
	Syntéza	68 °C	2 min	
3	Denaturace	94 °C	30 sec	25
	Hybridizace <sup>I</sup>	$T_m \pm 5 \text{ °C}$	30 sec	
	Syntéza	68 °C	1 min <sup>II</sup>	
4	Závěrečná syntéza	68 °C	5 min	1

<sup>I</sup>Ve fázi hybridizace oligonukleotidové primery hybridizují s řetězcem templátové DNA na principu komplementarity. Teplota hybridizace byla volena podle výpočtu teploty tání jednotlivých primerů ( $T_m$ ) podle vzorce  $T_m [°C] = (2(A+T) + 4(G+C)) - 1,5(\text{mismatch}) - 5$ . Jelikož se teplota pro oba primery různila, byla použita ta nižší. Hybridizace probíhala za Teplotního gradientu, volené  $T_m \pm 5 \text{ °C}$ .

<sup>II</sup>Doba syntézy byla odvozena podle závislosti na velikosti syntetizovaných fragmentů, kdy syntéza 1 kb DNA trvá 1 minutu.

### 3.2.9. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

#### Materiál

Restrikční endonukleasy použité v této práci (*Pst*I, *Bam*HI, *Sac*I; New England Biolabs)

Komerční set DNA Clean & Concentrator-25 (Zyma Research Exbio)

#### Postup

Plazmidová DNA byla štěpena restrikčními endo-deoxyribonukleasami v 10x naředěném pufru dodaného výrobcem (pufr č.3) při 37 °C 2-4 hodiny. Po štěpení byla DNA přečištěna přes komerční set DNA Clean & Concentrator-25.

### 3.2.10. Ligace fragmentů plazmidové DNA

#### Materiál

T4 DNA ligasa BioLabs NewEngland

Reakční ligační pufr dodaný výrobcem

## Postup

V mikrozkuhavce bylo smícháno (podle koncentrace vektoru a fragmentu viz. výpočet níže) 4 µl vody, 1 µl vektoru, 3 µl směs fragmentové klonované DNA a 1 µl ligačního pufru. Inkubace probíhala v termocykleru 5 minut při 45 °C, poté když na 1 minutu teplota klesla na 4 °C, byl přidán 1 µl ligačního enzymu T4 DNA ligasa. Poté byla teplota zvýšena na 22 °C a inkubace probíhala 2 hodiny. Ligační směs byla použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli*.

Pro ligaci bylo použito pro celkový objem vzorku 20 µl obvykle 100 – 200 ng vektoru. Množství přidaného fragmentu bylo vypočítáno podle vzorce:

$$m_I = (m_V \cdot L_I/L_V) \cdot MR$$

$m_I$ .....množství insertu [ng]

$m_V$ .....množství vektoru [ng]

$L_I$ .....velikost insertu [kb]

$L_V$ .....velikost vektoru [kb]

MR.....zvolení molární poměr insert/vektor (většinou 3:1)

### **3.2.11. Testování vlivu delece v genu v závislosti na různých stresech vyvolaných vnějším prostředím**

K testování byla použita kultivační metoda v tekutém mediu a stresové podmínky detailně popsány v kapitole Výsledky (4.1. a 4.6.).

#### **3.2.11.1. Měření promotorové aktivity**

##### **3.2.11.1.1. Stanovení specifické aktivity chloramfenikolacetyltransferasy (CAT)**

Enzymová aktivita chloramfenikolacetyltransferasy (CAT) byla stanovena kolorimetricky za použití spektrofotometru BioMate 5. Princip metody (Shaw, 1975) je založen na přenosu acetylové skupiny acetylkoenzymu A na chloramfenikol. Vzniklý koenzym A reaguje s kyselinou 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoovou (DTNB) za vzniku disulfidu koenzymu A, kyseliny thionitrobenzoové a ekvivalentního množství volné kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB), jež je žlutě zbarvena. Množství vznikající kyseliny nitrobenzoové bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm.

### Příprava bezbuněčného extraktu

#### Materiál

Roztok KPP

#### Postup

Do 125 ml v litrové baňce tekuté půdy 2xTY Km30 byla zaočkována čerstvá kultura na  $OD_{600}=0,3$ . Kultivace probíhala za stálého třepání při 30 °C do  $OD_{600}=3$ . Po kultivaci byla kultura ihned zchlazena v ledu po dobu 10 minut a centrifugována v chlazené centrifuze 10 minut při 4000x G. Supernatant byl důkladně odpipetován a pelet resuspendován v 25 ml chladného roztoku KPP. Po opětovné centrifugaci byl supernatant odlit a pelet resuspendován v 1 ml chladného roztoku KPP. Suspenze byla rozdělena na poloviny (po 500  $\mu$ l) do speciálních mikrozkušavek pro drcení buněk. Do mikrozkušavek bylo přidáno 200  $\mu$ l kuliček Balotina velikosti 9. Drcení probíhalo na přístroji Fast Prep při rychlosti drcení 6,5 po dobu 20 sekund a poté chlazen 5 minut v ledu. Tento cyklus byl opakován ještě 5x. Následovala chlazená centrifugace 10 minut při 18 000x G a supernatant byl opatrně přepipetován do nových mikrozkušavek. Centrifugace se opakovala pro případ, že bylo napipetováno ještě nějaké množství kuliček Balotina. Supernatant se přenesl opět do nových mikrozkušavek a získaný bezbuněčný extrakt byl uchováván při -20 °C.

### Měření proteinové koncentrace

#### Materiál

Roztok Protein 1 (4,5 g vinan sodno-draselný (Lachema), 1,5 g  $CuSO_4 \times 5 H_2O$  (Lachema), 2,5 g KI (Lachema), doplněno do 500 ml 0,2N NaOH)

BSA (bovine serum albumin 10 mg/ml) (Sigma)

#### Postup

Celková koncentrace proteinů v bezbuněčném extraktu byla stanovena biuretovou metodou. K 30-100  $\mu$ l (do celkového objemu 100  $\mu$ l doplněno sterilní vodou) bezbuněčného extraktu bylo přidáno 900  $\mu$ l roztoku Protein 1. Obsah byl promíchán a inkubován za tmy po dobu 30 minut. Pak byla změřena absorbance vzorku na spektrofotometru při vlnové délce 580 nm. Výsledná celková koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena odečtením z grafu kalibrační křivky.

Kalibrační řada byla připravena stejným způsobem, avšak místo vzorku byla použita řada vodných roztoků BSA o různé koncentraci 0-1 mg/ml.

### Měření specifické aktivity CAT

#### Materiál

Roztok KPP (9 dílů 0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lachema), 1 díl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachema); pH 7,8)

5 mM chloramfenikol (Sigma)

Pufr RM 10 ml (4 mg DTNB (Serva) v 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,8, 200 μl 5 mM acetyl-koenzym A (Sigma), doplněno vodou do 10 ml)

#### Postup

Do spektrofotometrické kyvety bylo k 970 μl pufru RM přidáno 10-50 μl bezbuněčného extraktu. Po dobu jedné minuty byla měřena absorbance extraktu bez substrátu. Poté bylo přidáno 50 μl substrátu 5 mM chloramfenikolu, obsah byl promíchán pomocí parafilmu a po inkubaci 1 minutu byla měřena změna absorbance v průběhu jedné minuty.

Hodnota změny absorbance byla držena v rozmezí 0,05-0,1/min. Pokud bylo rozmezí překročeno, vzorek byl zředěn roztokem KPP. Každý vzorek byl měřen alespoň 3x.

### Výpočet specifické aktivity CAT

Specifická aktivita CAT byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$SA = (\Delta E \cdot V_c) / (\epsilon \cdot V_e \cdot c)$$

SA.....specifická aktivita [U/mg proteinu], U=μmol/min

ΔE.....změna absorbance za 1 min [1/min]

V<sub>c</sub> .....celkový objem reakční směsi [ml]

ε .....extinkční koeficient [ml/μM]

V<sub>e</sub> .....objem bezbuněčného extraktu [ml]

c .....koncentrace proteinů [mg/ml]

## 4. Výsledky

Diplomová práce je zaměřena na studium funkce alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při stresové odpovědi u *Corynebacterium glutamicum*, zejména na poznání struktury a funkce promotoru genu *sigM* a úlohy alternativního sigma faktoru  $\sigma^M$  při odpovědi buňky na tepelný stres.

### 4.1. Testování aktivity promotoru genu *sigM* za různých podmínek a v různých kmenech *C. glutamicum*.

K měření aktivity promotoru genu *sigM* (P-*sigM*), jsem použila plazmid pET2/P-*sigM*, který byl zkonstruován vložением fragmentu DNA obsahujícím promotorovou oblast genu *sigM* do „promoter-probe“ vektoru pET2 před bezpromotorový reportérový gen *cat*, který kóduje chloramfenikolacetyltransferasu (CAT), enzym inaktivující antibiotikum chloramfenikol acetylací. Aktivita studovaného promotoru je měřena úrovní exprese genu *cat*, jež se vyhodnocuje přímo měřením specifické aktivity CAT. Aktivita o hodnotě 0,005  $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{protein}$  a méně byla brána jako zanedbatelná, jelikož aktivita kmene *C. glutamicum* s prázdným vektorem pET2 byla 0,005  $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{protein}$ .

#### 4.1.1. Aktivita promotoru genu *sigM* v různých kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek

Pro zjišťování funkce jednotlivých sigma faktorů při transkripci z promotoru P-*sigM* byl plazmid pET2/P-*sigM* přenesen elektroprací (popsána v kapitole Materiál a metody) do kmenů *C. glutamicum*  $\Delta\text{sigH}$ , *C. glutamicum*  $\Delta\text{sigM}$  a *C. glutamicum*  $\Delta\text{sigH}\Delta\text{sigM}$ , v nichž byly geny kódující alternativní sigma faktory  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  deletovány. Hodnoty aktivity CAT promotoru P-*sigM* za standardních podmínek (30 °C) jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7). Z těchto výsledků je zřejmé, že delece samotného genu *sigH* nebo *sigM* nemá za standardních podmínek negativní vliv na aktivitu P-*sigM*. Naproti tomu u kmene *C. glutamicum*  $\Delta\text{sigH}\Delta\text{sigM}$  došlo k úplnému potlačení aktivity tohoto promotoru. Z těchto výsledků lze odvodit, že promotor genu *sigM* je rozeznáván za standardních podmínek jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ .

Kmen	Specifická aktivita CAT (U/mg protein)			
	Měření	30°C	Průměr (Ø)	Směrodatná odchylka (s)
<i>C. glutamicum</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0341	<b>0,0331</b>	<b>0,0099</b>
	2.	0,0283		
	3.	0,0229		
	4.	0,0211		
	5.	0,0397		
	6.	0,0270		
	7.	0,0464		
	8.	0,0455		
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigH</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0321	<b>0,0336</b>	<b>0,0067</b>
	2.	0,0336		
	3.	0,0248		
	4.	0,0248		
	5.	0,0360		
	6.	0,0453		
	7.	0,0345		
	8.	0,0376		
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigM</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0652	<b>0,0868</b>	<b>0,0253</b>
	2.	0,0494		
	3.	0,1061		
	4.	0,1086		
	5.	0,1047		
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigH</i> $\Delta$ <i>sigM</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,005	<b>0,005</b>	<b>0,0000</b>
	2.	0,005		

Tabulka 7. Aktivita promotoru P-*sigM* za standardních podmínek.

#### 4.1.2. Aktivita promotoru genu *sigM* v různých kmenech *C. glutamicum* po oxidativním stresu diamidem

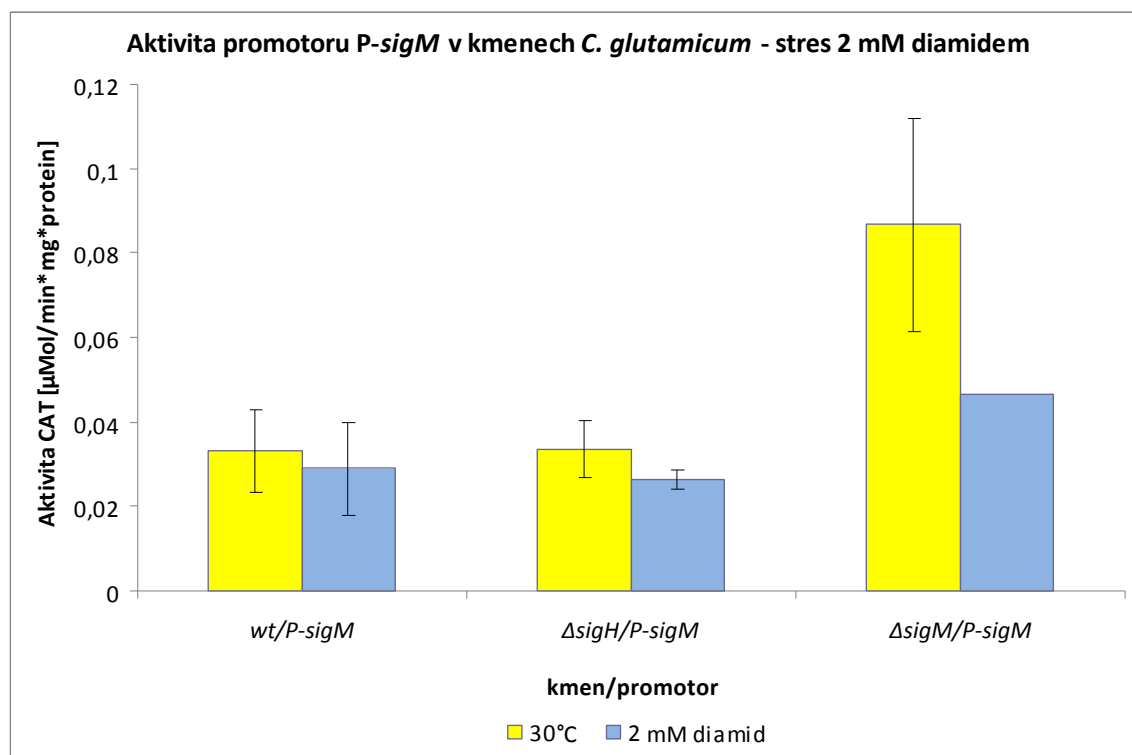
Vliv oxidativního stresu na aktivitu promotoru P-*sigM* jsem testovala působením 2 mM a 10 mM diamidu (N,N,N',N\*-tetramethylazodicarboxamid, Sigma). Kultury jsem kultivovala v komplexním mediu 2xTY s kanamycinem o koncentraci 30 µg/ml (kromě kmene  $\Delta$ *sigM*/pET2/P-*sigM*, kdy jsem použila koncentraci kanamycinu 10 µg/ml) do OD<sub>600</sub>=3 při 30 °C (optimální kultivační teplota pro *C. glutamicum*). Poté jsem kulturu rozdělila po 50 ml do 500 ml kultivačních baněk. Jednu polovinu jsem kultivovala při 30 °C, do druhé jsem přidala diamid ve finální koncentraci 2 mM nebo 10 mM a kultivovala 30 minut při 30 °C. Po uplynutí doby kultivace jsem kulturu zpracovala pro stanovení aktivity CAT (viz. kapitola Materiál a metody).

Hodnoty aktivity CAT promotoru P-*sigM* po oxidativním stresu (2 mM a 10 mM diamid) jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8). Průměrné hodnoty (Ø) spolu

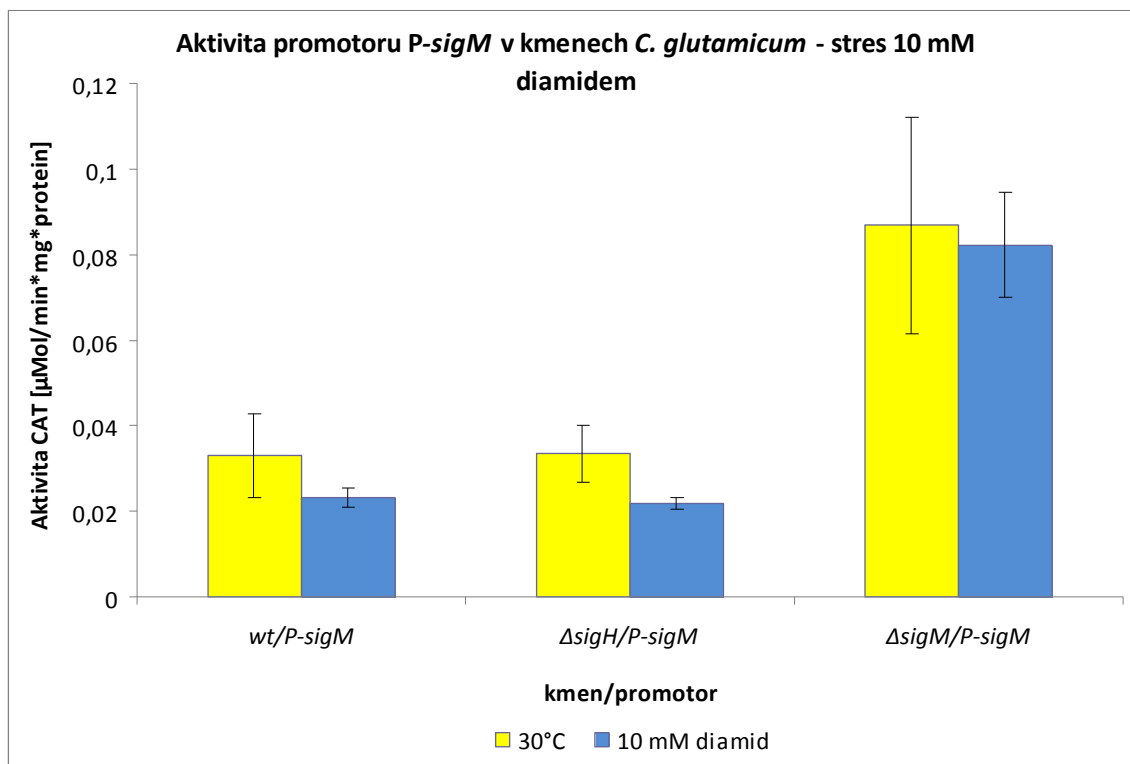
s průměrnými hodnotami za standardních podmínek (Tab. 7) s příslušnými směrodatnými odchylkami ( $s$ ) jsou vyobrazeny v grafech (Obr. 9 a 10).

kmen	Specifická aktivita CAT (U/mg protein)		
	Měření	2 mM diamid	10 mM diamid
<i>C. glutamicum</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0399	0,0253
	2.	0,0181	0,0210
	Ø	<b>0,029</b>	<b>0,02315</b>
	s	<b>0,010943</b>	<b>0,002361</b>
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigH</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0284	0,0211
	2.	0,0243	0,0227
	Ø	<b>0,02635</b>	<b>0,0219</b>
	s	<b>0,00227</b>	<b>0,001261</b>
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigM</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0466	0,0702
	2.		0,0944
	Ø	<b>0,0466</b>	<b>0,0823</b>
	s		<b>0,012139</b>

Tabulka 8. Aktivita promotoru P-*sigM* po oxidativním stresu 2 mM a 10 mM diamidem.



Obrázek 9. Aktivita promotoru P-*sigM* v divokém kmeni a delečních kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po oxidativním stresu 2 mM diamidem.



**Obrázek 10. Aktivita promotoru P-*sigM* v divokém kmeni a delečních kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po oxidativním stresu 10 mM diamidem.**

Z výsledků uvedených na Obr. 9 a Obr. 10 je patrné, že působení diamidu nemá pozitivní efekt na aktivitu promotoru genu *sigM* ani u divokého kmene, ani u delečních kmenů *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a  $\Delta sigM$ .

#### 4.1.3. Aktivita promotoru genu *sigM* v různých kmenech *C. glutamicum* po tepelném stresu

Vliv tepelného stresu na aktivitu promotoru P-*sigM* jsem testovala následujícím způsobem. Kultury jsem kultivovala v komplexním mediu 2xTY s kanamycinem o koncentraci 30 µg/ml (kromě kmene  $\Delta sigM/pET2/P-sigM$  a  $\Delta sigHsigM/pET2/P-sigM$ , kdy jsem použila koncentraci kanamycinu 10 µg/ml) do  $OD_{600}=3$  při 30 °C (optimální kultivační teplota pro *C. glutamicum*). Poté jsem kulturu rozdělila po 50 ml do 500 ml kultivačních baněk. Jednu polovinu jsem kultivovala při 30 °C a druhou při zvýšené teplotě 40 °C po dobu jedné hodiny. Po uplynutí doby kultivace jsem kulturu zpracovala pro stanovení aktivity CAT (viz kapitola Materiál a metody).

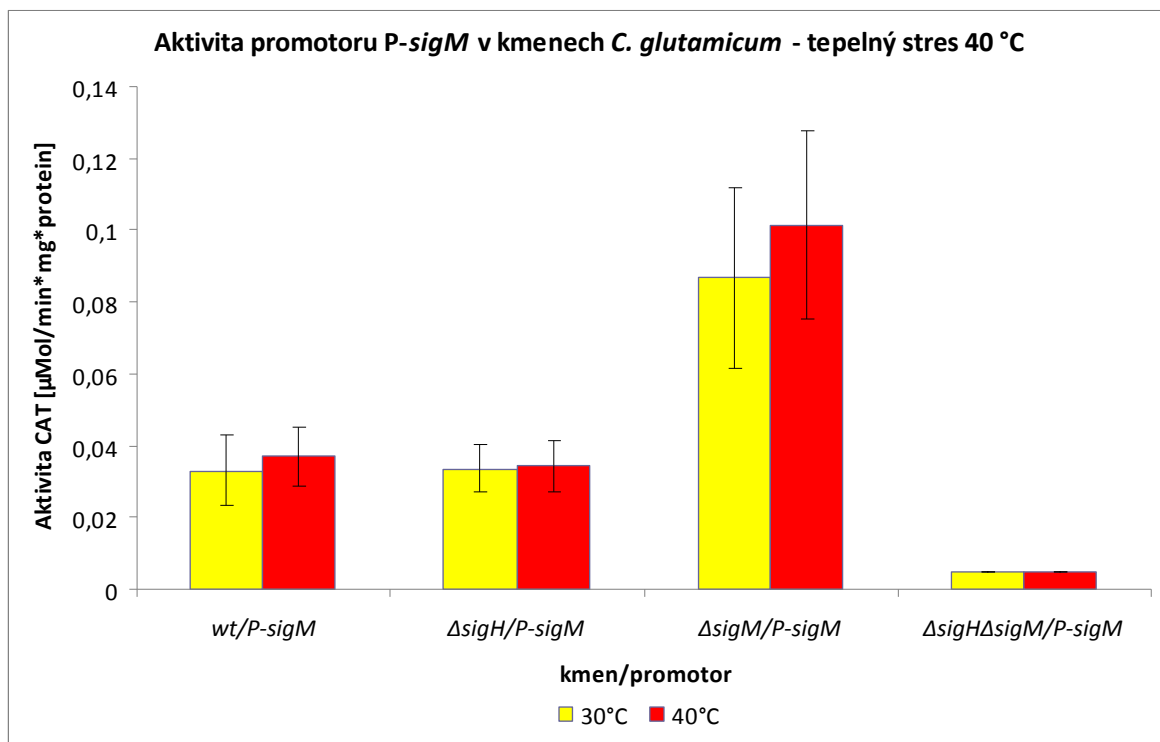
Hodnoty aktivity CAT promotoru P-*sigM* po tepelném stresu (40 °C) jsou uvedeny v tabulce (Tab. 9). Průměrné hodnoty ( $\emptyset$ ) spolu s průměrnými hodnotami za



standardních podmínek (Tab. 7) s příslušnými směrodatnými odchylkami jsou vyobrazeny v grafu (Obr. 11).

Kmen	Specifická aktivita CAT (U/mg protein)			
	Měření	40°C	Průměr (Ø)	Směrodatná odchylka (s)
<i>C. glutamicum</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0593	<b>0,0370</b>	<b>0,0084</b>
	2.	0,0312		
	3.	0,0245		
	4.	0,0317		
	5.	0,0291		
	6.	0,0341		
	7.	0,0511		
	8.	0,0346		
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigH</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0397	<b>0,0343</b>	<b>0,0073</b>
	2.	0,0401		
	3.	0,0275		
	4.	0,0253		
	5.	0,0387		
	6.	0,0454		
	7.	0,0296		
	8.	0,0278		
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigM</i> /pET2/P- <i>sigM</i>	1.	0,0706	<b>0,1015</b>	<b>0,0263</b>
	2.	0,0672		
	3.	0,1130		
	4.	0,1312		
	5.	0,1256		
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>sigH<math>\Delta</math><i>sigM</i>/pET2/P-<i>sigM</i></i>	1.	0,0050	<b>0,0050</b>	<b>0,0000</b>
	2.	0,0050		

Tabulka 9. Aktivita promotoru P-*sigM* po tepelném stresu.



**Obrázek 11. Aktivita promotoru P-sigM v divokém kmeni a delečních kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po tepelném stresu.**

Z Obr. 11 je zřejmé, že po tepelném stresu došlo k mírnému zvýšení aktivity promotoru P-sigM, přičemž nejvíce se tento pozitivní efekt projevil u kmene *C. glutamicum* ΔsigM. Výsledky měření aktivity P-sigM v divokém kmeni *C. glutamicum* a v jeho mutantách s delecemi v genech kódujících alternativní sigma faktory prokázaly, že delece samotného genu sigH nebo sigM nevede ke snížené aktivitě promotoru P-sigM. Naproti tomu u kmene *C. glutamicum* ΔsigHsigM došlo k úplnému potlačení aktivity tohoto promotoru. Z těchto výsledků lze odvodit, že promotor genu sigM je rozeznáván za standardních podmínek i po tepelném stresu jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ , ale nikoli primárním sigma faktorem  $\sigma^A$ .

## **4.2. Konstrukce kmene *C. glutamicum* s mutantním promotorem genu sigM**

### **4.2.1. Mutagenese promotoru genu sigM**

Pro určení sekvencí DNA důležitých pro aktivitu promotoru genu sigM byla provedena mutagenese -10 hexameru tohoto promotoru. Pro mutagenezi byl zvolen trinukleotid GTT, který je vysoce konzervovanou částí -10 hexameru promotorů

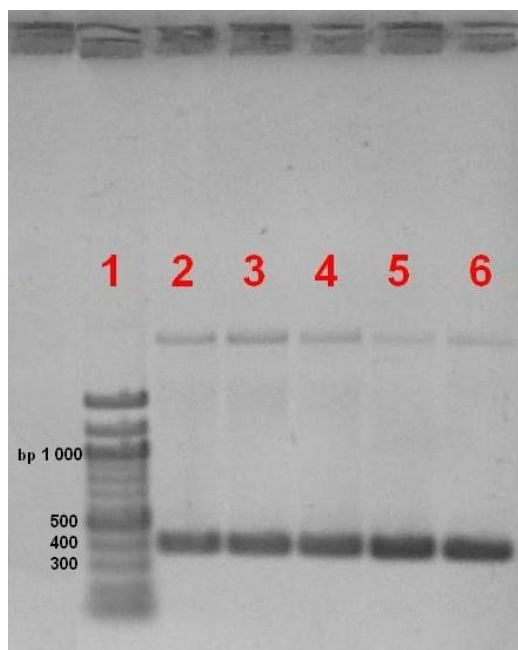
rozeznávaných alternativními sigma faktory SigH a SigM u *C. glutamicum* (Pátek a Nešvera, 2011) (Obr. 12). Jak je patrné z Obr. 12, v sekvenci DNA před počátkem transkripce (TSP) genu *sigM* (+1) jsou přítomny dva trinukleotidy GTT. Na základě jejich vzdálenosti od TSP (5 bp resp. 9 bp) bylo předpokládáno, že pro funkci promotoru je důležitější trinukleotid vzdálený 9 bp, který byl proto mutagenizován.

-35
-10
+1  
**AGGTGGAATCCGTGGTGATTCTGGT**C**GATGAGG**TTC**GTT**CCTC**CAAAA**  
**CAGACC**

**Obrázek 12. Mutagenize -10 hexameru promotoru genu *sigM*.**

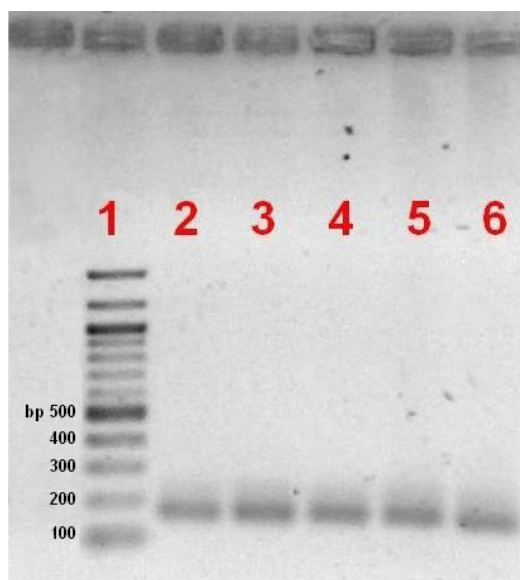
Záměny bází v námi navržené -10 promotorové oblasti jsou zvýrazněny červeně. +1 označuje bod startu transkripce. Podtržení promotorových oblastí podle Pátek a Nešvera (2011).

Metodou PCR jsem nasynthetizovala fragmenty odpovídající polovinám klonovaného mutovaného fragmentu za použití primerů PSIGMM10F a PSIGMR, pro polovinu fragmentu „downstream“ („zadní“), a PSIGMF a PSIGMM10R, pro polovinu fragmentu „upstream“ („přední“) k místu mutagenize (PSIGMM10F a PSIGMM10R jsou vzájemně komplementární mutační primery). Použila jsem Pfx polymerasu pro polovinu fragmentu „downstream“ a Green Go Taq pro polovinu fragmentu „upstream“. Syntéza probíhala za teplotního gradientu. Metoda je blíže popsána v kapitole Materiál a metody. Elektroforézou v 1 % agarosovém gelu jsem ověřila nasynthetizování a velikost „předního“ (Obr. 14) a „zadního“ (Obr. 13) fragmentu. Fragmenty jsem vyizolovala z gelu komerčním setem QIAquick® Gel Extraction Kit a jejich směs jsem následně použila jako templát do dvoustupňové PCR popsané detailně v kapitole Materiál a metody. Syntéza finálního mutovaného fragmentu probíhala amplifikací pomocí koncových klonovacích primerů PSIGMF a PSIGMR za pomoci Pfx polymerasy a za teplotního gradientu. Po izolaci komerčním setem QIAquick® Gel Extraction Kit jsem provedla kontrolní elektroforézu v 1 % agarosovém gelu (Obr. 15).



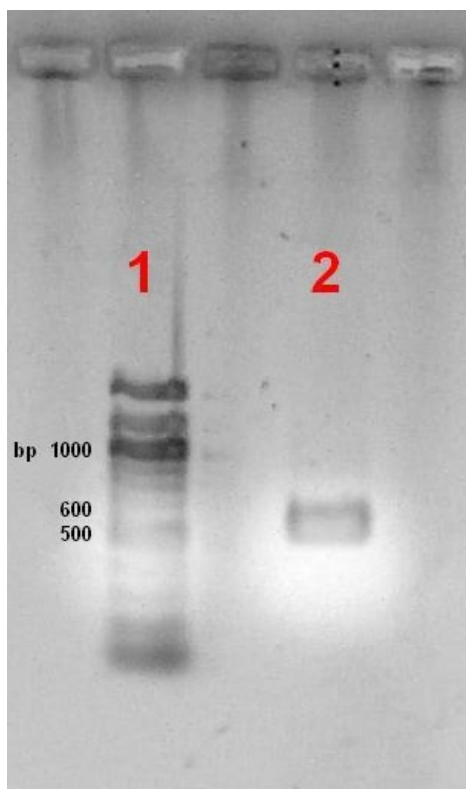
**Obrázek 13.** „Downstream“ polovina mutovaného fragmentu genu *sigM*.

Elektroforeogram v 1 % agarosovém gelu. V dráze číslo 1 je 100 bp DNA ladder (New England Biolabs). V dráze číslo 2 až 6 je „downstream“ PCR fragment.



**Obrázek 14.** „Upstream“ polovina mutovaného fragmentu genu *sigM*.

Elektroforeogram v 1 % agarosovém gelu. V dráze číslo 1 je 100 bp DNA ladder (New England Biolabs). V dráze číslo 2 až 6 je „upstream“ PCR fragment.

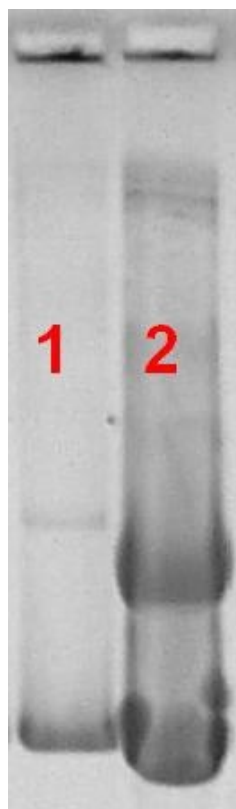


**Obrázek 15. Důkaz finálního mutovaného fragmentu promotoru genu *sigM*.**

Elektroforeogram v 1 % agarosovém gelu. V dráze číslo 1 je 100 bp DNA ladder (New England Biolabs). V dráze číslo 2 je finální mutovaný PCR fragment o velikosti 543 bp.

#### **4.2.2. Klonování mutantního fragmentu do vektoru pKSAC45**

Finální mutovaný fragment promotoru genu *sigM* (543 bp) (*P-sigMmut*) jsem štěpila restrikcími enzymy *Bam*HI a *Pst*I a ligovala do vektoru pKSAC45 (4 705 bp), štěpeného stejnými restrikcími enzymy (metoda popsána v kapitole Materiál a metody). Ligační směsí jsem transformovala kompetentní buňky *E. coli* (metoda popsána v kapitole Materiál a metody). Transformanty jsem vysela na misky s kanamycinem o koncentraci 30 µg/ml a IPTG/XGAL (klonování do vektoru pKSAC45 umožňuje přímou selekci rekombinantních plazmidů na této půdě). Klony nesoucí rekombinantní plazmid pKSAC45/*P-sigMmut* s klonovaným fragmentem měly bílou barvu, klony bez klonovaného fragmentu byly modré. Několik náhodně vybraných bílých kolonií jsem přeočkovala na nové misky a ověřovala jsem přítomnost rekombinantního plazmidu (Obr. 16). Přítomnost mutace byla ověřena sekvenací DNA klonovaných fragmentů *P-sigMmut* ze dvou klonů. V další práci jsem pokračovala s klonem označeným číslem 3.

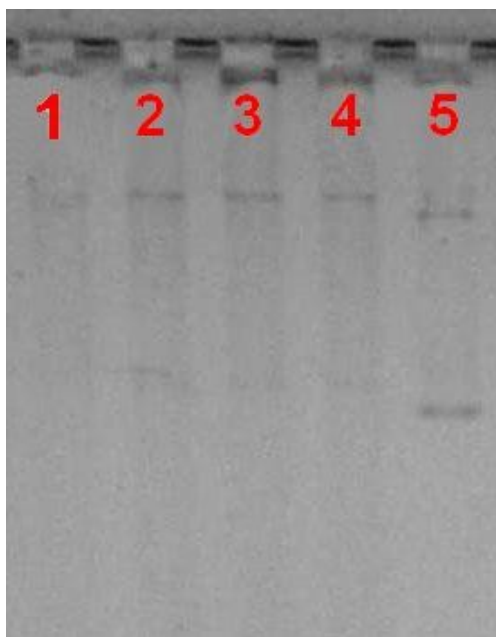


**Obrázek 16. Průkaz rekombinantního plazmidu.**

Elektroforeogram v 1 % agarosovém gelu. V dráze číslo 1 je vektor pKSAC45 nesoucí mutovaný fragment genu *sigM*. V dráze číslo 2 je prázdný vektor pKSAC45.

#### **4.2.3. Klonování mutantního fragmentu do vektoru pET2 a přenos do *C. glutamicum***

Z rekombinantního plazmidu pKSAC45/P-*sigM*mut z klonu č. 3 jsem vyštěpila fragment P-*sigM*mut pomocí *Bam*HI a *Pst*I a klonovala do „*promoter-probe*“ vektoru pET2 (7 500 bp), naštěpeném stejnými restrikčními enzymy. Poté jsem zligovala vektor pET2 s mutovaným fragmentem P-*sigM*mut za účasti T4 DNA ligasy a ligační směsí jsem transformovala buňky *E. coli*. Vektor pET2 nesoucí mutovaný fragment P-*sigM*mut jsem pak izolovala z buněk *E. coli* a přenesla do buněk *C. glutamicum* elektroporací (metoda popsána v kapitole Materiál a metody). Transformační směs jsem vysela na misky s pevnou půdou 2xTY s kanamycinem o koncentraci 30 µg/ml. Přítomnost plazmidů v transformantech *C. glutamicum* jsem potvrdila elektroforézou na 1 % agarosovém gelu (Obr. 17). U vybraného kmene CG/pET2/P-*sigM*mut jsem pak testovala vliv mutace na aktivitu promotoru.



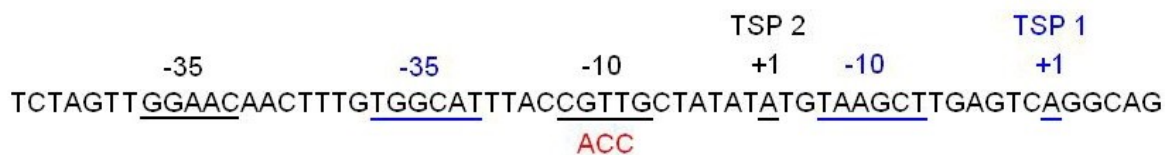
**Obrázek 17. Průkaz transformace pET2/P-*sigM*mut do *C. glutamicum*.**

Elektroforeogram v 1 % agarosovém gelu. V dráze číslo 1 až 4 je vektor pET2 nesoucí mutovaný fragment P-*sigM*mut. V dráze číslo 5 je prázdný vektor pET2.

### **4.3. Konstrukce kmene *C. glutamicum* s mutantním promotorem operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR***

#### **4.3.1. Příprava mutantního promotoru operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* a klonování mutantního fragmentu do vektoru pET2**

Jako další promotor, o němž je známo, že je rozeznáván alternativním sigma faktorem  $\sigma^H$ , byl pro mutační analýzu vybrán jeden ze dvou promotorů operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* (P2-*dnaK*) (Barreiro et al., 2004). Geny tohoto operonu kódují proteiny účastníci se odpovědi buňky *C. glutamicum* na tepelný stres. Pro mutagenézi byl zvolen (stejně jako v případě promotoru P-*sigM*) trinukleotid GTT, který je vysoce konzervovanou částí -10 hexameru promotorů rozeznávaných alternativními sigma faktory SigH a SigM u *C. glutamicum* (Pátek a Nešvera, 2011). Syntéza fragmentu DNA (354 bp) s navrženou mutací (Obr. 18), byla provedena firmou GeneArt a fragment byl naklonován do vektoru pMA-T.

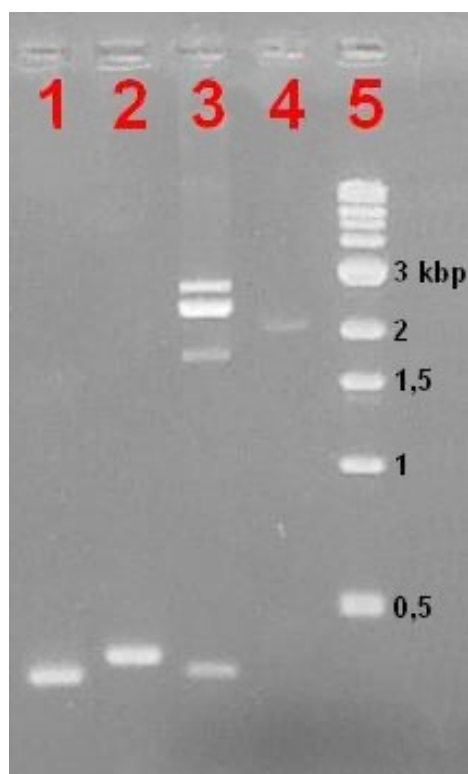


**Obrázek 18. Mutageneze -10 oblasti stresového promotoru genu *dnaK* (P2-*dnaK*).**

Konzervované motivy promotorů jsou podtrženy černě (stresový promotor) a modře (vegetativní promotor). +1 označuje bod startu transkripce promotoru vegetativního (TSP1) a stresového (TSP2). Záměny bází v -10 oblasti stresového promotoru jsou zvýrazněny červeně (Barreiro et al., 2004).

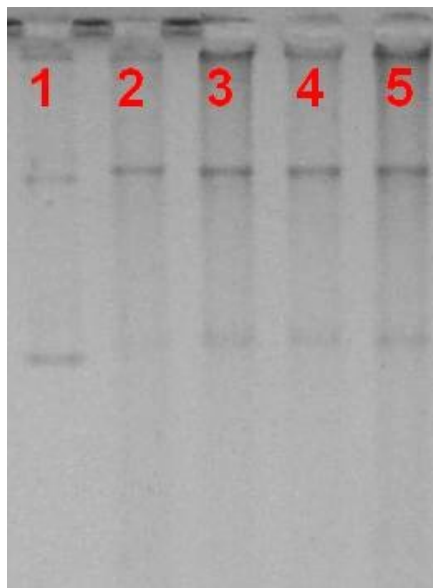
Tento plazmid pMA-T/P-*dnaK*mut jsem štěpila restričními enzymy *Bam*HI a *Pst*I (Kontrolní elektroforéza viz. Obr. 19), izolovala z gelu komerčním setem QIAquick® Gel Extraction Kit a ligovala T4 DNA ligasou do „*promoter-probe*“ vektoru pET2 (7 500 bp), který jsem také štěpila stejnými restričními enzymy. Ligační směsí jsem transformovala buňky *E. coli* a transformační směs jsem vysela na misky s pevnou půdou 2xTY s kanamycinem o koncentraci 30 µg/ml. Provedla jsem kontrolní elektroforézu transformantů a dále jsem pracovala s klonem označeným číslo 1. Z tohoto klonu jsem vyizolovala plazmidovou DNA a přenesla do buněk *C. glutamicum* elektroporací. Přítomnost plazmidů v transformantech *C. glutamicum* jsem potvrdila elektroforézou na 1 % agarosovém gelu (Obr. 20). U vybraného kmene CG/pET2/P-*dnaK*mut jsem pak testovala vliv mutace na aktivitu promotoru za různých podmínek.





**Obrázek 19. Kontrolní elektroforéza po vyštěpení fragmentu *PdnaKmut* z vektoru pMA-T.**

Elektroforeogram 1,5 % agarosového gelu. V dráze číslo 1 je standard o známé velikosti 334 bp a v dráze číslo 2 standard o známé velikosti 379 bp. V dráze číslo 3 je restrikčními enzymy štěpený vektor pMA-T/P-*dnaKmut* (je vidět prázdný vektor pMA-T a vyštěpený fragment o správné velikosti 354 bp). V dráze číslo 4 je neštěpený vektor pMA-T/P-*dnaKmut* a v poslední dráze je žebřík 1 kb DNA ladder (New England Biolabs).



**Obrázek 20. Průkaz transformace pET2/PdnaKmut do buněk *C. glutamicum*.**

Elektroforeogram 1 % agarosového gelu. V dráze číslo 1 je prázdný vektor pET2. V drahách číslo 2 až 5 je plazmid pET2/P-*dnaKmut*.

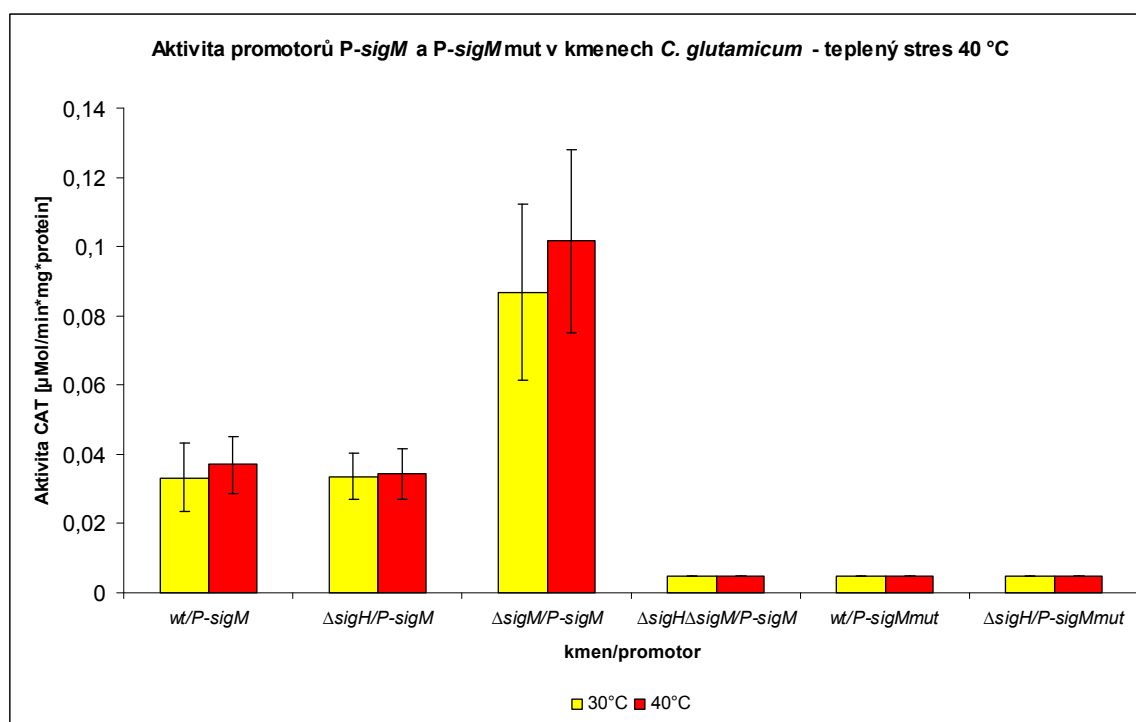
#### **4.4. Testování aktivity mutantních promotorů P-*sigMmut* a P-*dnaKmut* v kmenech *C. glutamicum***

Aktivita mutantních promotorů byla stanovována měřením aktivity reportérového enzymu CAT v kmenech *C. glutamicum* nesoucích rekombinantní plazmidy pET2/P-*sigMmut* a pET2/P-*dnaKmut*.

Buněčné kultury kmenů *C. glutamicum*, *C. glutamicum*  $\Delta sigH$ , *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigH\Delta sigM$  s vektorem pET2 nesoucím fragmenty obsahující promotory P-*sigM*, P-*sigMmut*, P1-*dnaK* + P2-*dnaK* a P1-*dnaK* + P2-*dnaKmut* jsem testovala na vliv tepelného stresu. Kultury jsem kultivovala v komplexním mediu 2xTY s kanamycinem o koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$  (kromě kmenů  $\Delta sigM/pET2/P-sigM$  a  $\Delta sigH\Delta sigM/pET2/P-sigM$ , kdy jsem použila koncentraci kanamycinu 10  $\mu\text{g/ml}$ ) do  $OD_{600}=3$  při 30 °C (optimální kultivační teplota pro *C. glutamicum*). Poté jsem kulturu rozdělila po 50 ml do 500 ml kultivačních baněk. Jednu polovinu jsem kultivovala při 30 °C a druhou při zvýšené teplotě 40 °C po dobu jedné hodiny. Po uplynutí doby kultivace jsem kulturu zpracovala pro stanovení aktivity CAT (viz. kapitola Materiál a metody).

#### 4.4.1. Aktivita promotorů *P-sigM* a *P-sigMmut* v různých kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po tepelném stresu

Hodnoty aktivity CAT promotoru *P-sigMmut* po tepelném stresu (40 °C) byly ve všech případech (měření probíhalo vždy dvakrát) nižší než 0,005, tedy na úrovni pozadí. Z toho vyplývá, že mutace v promotoru způsobila úplnou ztrátu aktivity. Průměrné hodnoty ( $\bar{x}$ ) (Tab. 9) spolu s průměrnými hodnotami za standardních podmínek (Tab. 7) s příslušnými směrodatnými odchylkami ( $s$ ) jsou vyobrazeny v grafu (Obr. 21).



Obrázek 21. Aktivita promotorů *P-sigM* a *P-sigMmut* v divokém kmeni a delečních kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po tepelném stresu.

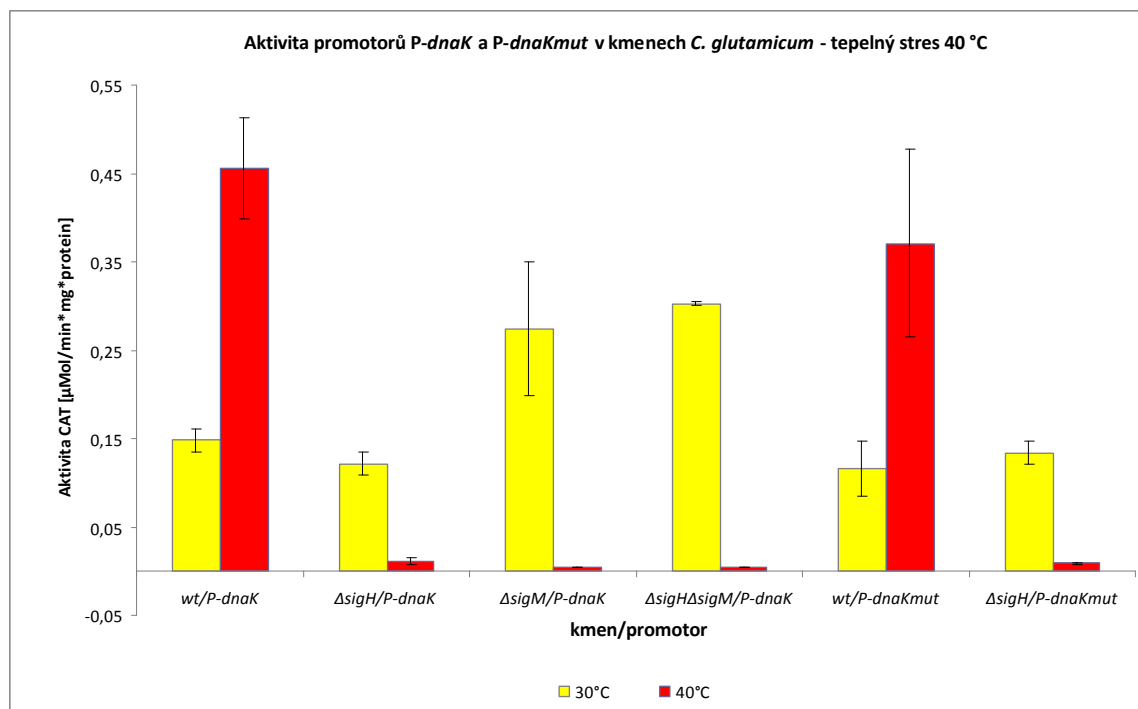
Z výsledků uvedených na Obr. 21 je patrné, že mutagenese v -10 oblasti promotoru genu *sigM* vedla k inaktivaci tohoto promotoru. Tento výsledek prokazuje, že gen *sigM* je přepisován z jediného promotoru rozeznávaného alternativními sigma faktory. Provedená mutagenese v -10 oblasti *P-sigM* prokázala, že trinukleotid GTT nacházející se 8 bp „upstream“ od počátku transkripce genu *sigM* je pro funkci promotoru nezbytný.

#### 4.4.2. Aktivita promotorů P-dnaK a P-dnaKmut v různých kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po tepelném stresu

Hodnoty aktivit CAT promotorů P1-dnaK + P2-dnaK (P-dnaK) a P1-dnaK + P2-dnaKmut (P-dnaKmut) po tepelném stresu (40 °C) jsou uvedeny v tabulce (Tab. 11). Průměrné hodnoty ( $\emptyset$ ) s příslušnými směrodatnými odchylkami (s) jsou vyobrazeny v grafu (Obr. 21).

Kmen	Specifická aktivita CAT (U/mg protein)		
	Měření	30°C	40°C
<i>C. glutamicum</i> /pET2/P-dnaK	1.	0,1608	0,3979
	2.	0,1353	0,5128
	$\emptyset$	0,14805	0,45535
	s	0,012787	0,057458
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ sigH/pET2/P-dnaK	1.	0,1350	0,0150
	2.	0,1075	0,0074
	$\emptyset$	0,12125	0,0112
	s	0,013784	0,003923
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ sigM/pET2/P-dnaK	1.	0,3500	0,0003
	2.	0,1977	0,0025
	$\emptyset$	0,27385	0,014
	s	0,076156	0,011541
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ sigH $\Delta$ sigM/pET2/P-dnaK	1.	0,3007	0,0016
	2.	0,3047	-0,0002
	$\emptyset$	0,3027	0,0009
	s	0,002225	0,0012026
<i>C. glutamicum</i> /pET2/P-dnaKmut	1.	0,0853	0,2641
	2.	0,1473	0,4776
	$\emptyset$	0,1163	0,37085
	s	0,031015	0,106754
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ sigH/pET2/P-dnaKmut	1.	0,1461	0,0092
	2.	0,1200	0,0071
	$\emptyset$	0,13305	0,00815
	s	0,013086	0,0014328

Tabulka 11. Aktivita promotorů P-dnaK a P-dnaKmut za standardních podmínek a po tepelném stresu.



**Obrázek 22. Promotorová aktivita fragmentů P-dnaK a P-dnaKmut v divokém kmeni a delečních kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po tepelném stresu.**

Jak je patrné z výsledků na Obr. 22, v divokém kmeni *C. glutamicum* je promotorová aktivita fragmentu nesoucího dva promotory operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, vegetativní P1-*dnaK* a  $\sigma^H$ -dependentní P2-*dnaK* (Barreiro et al., 2004), výrazně zvýšena po teplotním stresu. U divokého kmene *C. glutamicum* s fragmentem nesoucím mutantní promotor P2-*dnaKmut* byla zjištěna nižší promotorová aktivita za standardních podmínek i po tepelném stresu. V kmenech *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  došlo po tepelném stresu k výraznému snížení promotorové aktivity testovaných fragmentů. Tyto výsledky poukazují na to, že po tepelném stresu je funkční převážně promotor P2-*dnaK*, který je zřejmě rozeznáván nejen sigma faktorem  $\sigma^H$  (Ehira et al., 2009), ale i sigma faktorem  $\sigma^M$ .

## 5. Diskuze

Cílem práce bylo přispět k poznání funkce alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při stresové odpovědi u *Corynebacterium glutamicum*. Ze šesti alternativních sigma faktorů *C. glutamicum* ( $\sigma^B$ ,  $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ ) (Pátek a Nešvera, 2011) byly pro testování vybrány nejlépe prostudované sigma faktory  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$ . U těchto sigma faktorů je známa jejich účast při odpovědi buňky na tepelný a oxidativní stres, pomocí metody *DNA microarray hybridization* byly zjištěny geny, jejichž exprese je těmito sigma faktory řízena a byly určeny promotorové sekvence rozeznávané těmito sigma faktory (Kim et al., 2005; Nakunst et al., 2007; Ehira et al., 2009).

V diplomové práci jsem testovala vliv delece genů kódujících  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  na aktivitu vybraných promotorů za standardních podmínek a po oxidativním a tepelném stresu. Jako testované promotory byly zvoleny promotor genu *sigM*, který kóduje samotný sigma faktor  $\sigma^M$  (Nakunst et al., 2007), a promotory operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, jehož geny kódují proteiny účastnící se odpovědi buňky *C. glutamicum* na tepelný stres (Barreiro et al., 2004). Testované promotory byly klonovány do „*promoter-probe*“ vektoru pET2 (Vašicová et al., 2008) před bezpromotorový reportérový gen *cat*, který kóduje chloramfenikolacetyltransferasu (CAT) a jejich aktivita byla stanovována měřením specifické aktivity tohoto reportérového enzymu. „*promoter-probe*“ vektor pET2 je běžně používán pro analýzu promotorů *C. glutamicum* a jejich regulace a jeho použití přispělo např. k poznání regulace metabolismu fosfátu (Ishige et al., 2003) a acetátu (Gerstmeir et al., 2004) u této prakticky významné bakterie.

Základní charakterizace funkce sigma faktoru  $\sigma^M$  u *C. glutamicum* byla provedena skupinou pracovníků na univerzitě v Bielefeldu (Nakunst et al., 2007). Tito pracovníci zjistili, že kmen neprodukující  $\sigma^M$  je mnohem citlivější na tepelný, chladový, disulfidový a peroxidový stres. Metodou *DNA microarray hybridization* zjistili geny, které se netranskribovaly v mutantním kmeni DN1 (vyřazený gen *sigM*) v porovnání s divokým kmenem. Tyto geny se účastní odpovědi na oxidativní stres (geny *trxBI*, *trxC*, *trxB*, *sufR*, *sufC*, *sufB*, *sufS*, *sufU*). Dále pak metodou RT-PCR v reálném čase měřili hladinu mRNA genu *sigM* za různých stresových podmínek. Výsledky ukázaly vysoký efekt tepelného a oxidativního stresu, nejvíce pak efekt 10 mM diamidu (Nakunst et al., 2007).

Ve své práci jsem sledovala expresi genu *sigM* na základě měření aktivity reportérového enzymu CAT. Při použití této alternativní metody jsem potvrdila pozitivní efekt tepelného stresu (40 °C/1 h) na expresi genu *sigM*. Naproti tomu pozitivní efekt

oxidativního stresu na expresi genu *sigM* se v našich podmínkách nepodařilo potvrdit. Působení oxidačního činidla diamidu v koncentraci 2 mM a 10 mM nemělo pozitivní vliv na aktivitu promotoru genu *sigM* (P-*sigM*) ani u divokého kmene, ani u delečních kmenů *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigM$ . Rozdílné výsledky oproti výsledkům zjištěným skupinou Nakunst et al. (2007), byly zřejmě způsobeny použitím rozdílných přístupů (měření aktivity reportérového enzymu vs. RT-PCR v reálném čase).

Nakunst et al. (2007) použili dále metodu RT-PCR v reálném čase pro testování vlivu delecí v genech *sigH* a *sigM* na expresi různých genů *C. glutamicum*. Zjistili, že v kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  došlo k výraznému snížení exprese genu *sigM*, z čehož usuzovali, že exprese genu *sigM* je řízena sigma faktorem  $\sigma^H$ .

Vliv delece genů kódujících alternativní sigma faktory na aktivitu promotoru genu *sigM* za standardních podmínek a po oxidativním a tepelném stresu jsem testovala měřením aktivity reportérového enzymu CAT. Tato metoda, na rozdíl od metody RT-PCR v reálném čase, umožňuje sledovat vliv určitého sigma faktoru na expresi genu kódujícího tento sigma faktor, tedy v daném případě vliv delece genu *sigM* na aktivitu promotoru P-*sigM*. Výsledky měření aktivity P-*sigM* v divokém kmeni *C. glutamicum* a v jeho mutantách s delecemi v genech kódujících alternativní sigma faktory prokázaly, že delece samotného genu *sigH* nebo *sigM* nevede ke snížení aktivity promotoru P-*sigM* za standardních podmínek (30 °C) ani po tepelném stresu. Naproti tomu u kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH\Delta sigM$  došlo k úplnému potlačení aktivity tohoto promotoru. Z těchto výsledků lze odvodit, že promotor genu *sigM* je rozeznáván za standardních podmínek i po tepelném stresu jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ , ale nikoli primárním sigma faktorem  $\sigma^A$ . Existenci nesnížené aktivity P-*sigM* v kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  lze tedy vysvětlit tím, že nepřítomnost  $\sigma^H$  je plně kompenzována přítomností funkčního  $\sigma^M$ , zatímco v kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  je tomu naopak.

Nakunst et al. (2007) určili metodou 5'RACE počátek transkripce (TSP) genu *sigM* a na jeho základě odvodili -10 a -35 oblasti příslušného promotoru (Obr. 23, dolní řádek). Přítomnost trinukleotidu GTT v předpokládané -10 oblasti byla v souladu se zjištěním, že exprese genu *sigM* je řízena sigma faktorem  $\sigma^H$ , neboť tato sekvence v -10 oblasti je typická pro  $\sigma^H$ -dependentní promotory. Navržená sekvence -35 oblasti ovšem neodpovídá -35 konsenzus sekvenci  $\sigma^H$ -dependentních promotorů. Vzhledem k tomu, že v oblasti -10 je přítomný ještě další trinukleotid GTT, vzdálenější od TSP *sigM*, byly navrženy alternativní sekvence -10 a -35 oblastí P-*sigM* (Obr. 23, horní řádek) (Pátek a Nešvera, 2011).

Pro určení toho, zda gen *sigM* je přepisován z jediného promotoru a pro určení sekvencí DNA důležitých pro aktivitu promotoru genu *sigM* jsem prováděla mutagenезi -10 hexameru tohoto promotoru. Pro mutagenезi byl zvolen trinukleotid GTT, vzdálený 9 bp od TSP genu *sigM*, u něhož bylo předpokládáno, že je pro funkci P-*sigM* důležitější než trinukleotid GTT vzdálený 5 bp od TSP genu *sigM* (Pátek a Nešvera, 2011). Zjistila jsem, že fragment DNA s uvedenou mutací v promotorové oblasti genu *sigM* nevykazoval promotorovou aktivitu. Z tohoto výsledku je zřejmé, že gen *sigM* je přepisován z jediného promotoru a že trinukleotid GTT 8 bp „upstream“ od TSP genu *sigM* je pro funkci tohoto promotoru nezbytný. Zjištěné výsledky vedou k závěru, že pro funkci promotoru genu *sigM* jsou důležité -10 a -35 sekvence navržené v práci Pátek a Nešvera (2011), odpovídající zhruba konsenzus sekvencím  $\sigma^H$ -dependentních a  $\sigma^M$ -dependentních promotorů, a nikoli sekvence původně odvozené v práci Nakunst et al. (2007). Konsenzus sekvence -35 a -10 oblasti  $\sigma^H$ -dependentních (GGAA a GTT) (Ehira et al., 2009) a  $\sigma^M$ -dependentních (GGAAT a GTTG) (Nakunst et al., 2007; Pátek a Nešvera, 2011) promotorů si jsou velmi podobné. Zjištěné rozeznávání promotoru P-*sigM* jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ , je v souladu s tímto faktem.



**Obrázek 23. Promotorová oblast genu *sigM*. Oblasti -10 a -35 jsou vyznačeny podle Nakunst et al. (2007) (dolní řádek) a Pátek a Nešvera (2011) (horní řádek).**

Vzdálenost mezi tetranukleotidem GGAA v oblasti -35 a trinukleotidem GTT v oblasti -10 je obvykle 18 – 20 nukleotidů u  $\sigma^H$ -dependentních promotorů (Pátek a Nešvera, 2011) a 19 – 20 nukleotidů u  $\sigma^M$ -dependentních promotorů (Nakunst et al., 2007). Jedinou výjimkou v délce “spaceru” mezi sekvencemi GGAA a GTT je právě promotor P-*sigM*, kde je příslušná vzdálenost 24 nukleotidů. Pro určení toho, zda sekvence GGAA je opravdu nezbytná pro aktivitu P-*sigM* byla v současné době navržena v Laboratoři molekulární genetiky MBÚ AV ČR mutace v této sekvenci a bude testován její vliv na aktivitu P-*sigM*.

Z analýzy sekvence promotorové oblasti genu *sigM* je patrné, že provedené mutace (**GAGGTT** → **CAGACC**) vedly nejen k inaktivaci trinukleotidu GTT, který je



nezbytný pro funkci promotorů rozeznávaných alternativními sigma faktory, ale také ke změně sekvencí TGAGGT (na TCAGAC) a TTCGTT (na CCCGTT), které se podobají -10 konsenzus sekvenci vegetativních promotorů *C. glutamicum* rozeznávaných primárním sigma faktorem  $\sigma^A$  (TANANT) (Pátek a Nešvera, 2011). Na základě zjištění, že u kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH\Delta sigM$  došlo k úplnému zrušení aktivity promotoru P-*sigM* je však možné vyloučit jak účast  $\sigma^A$  při transkripci genu *sigM*, tak význam sekvencí TGAGGT a TTCGTT pro aktivitu P-*sigM*.

Jako další promotor, o němž je známo, že je rozeznávaný alternativním sigma faktorem  $\sigma^H$ , byl pro mutační analýzu vybrán jeden ze dvou promotorů operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* (P2-*dnaK*) (Barreiro et al., 2004). Geny *dnaK*, *grpE* a *dnaJ* kódují proteiny typu chaperonů účastnící se odpovědi buňky *C. glutamicum* na tepelný stres. Gen *hspR* kóduje negativní regulátor odpovědi na tepelný stres. Pro mutagenézi byl zvolen (stejně jako v případě promotoru P-*sigM*) trinukleotid GTT, který je vysoce konzervovanou částí -10 hexameru promotorů rozeznávaných alternativními sigma faktory  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  u *C. glutamicum* (Pátek a Nešvera, 2011).

Bylo potvrzeno, že v divokém kmeni *C. glutamicum* je promotorová aktivita fragmentu nesoucího dva promotory operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, vegetativní P1-*dnaK* a  $\sigma^H$ -dependentní P2-*dnaK* (Barreiro et al., 2004), výrazně zvýšena po teplotním stresu. U divokého kmene *C. glutamicum* s fragmentem nesoucím mutantní promotor P2-*dnaKmut* byla zjištěna nižší promotorová aktivita za standardních podmínek i po tepelném stresu, což potvrzuje účast  $\sigma^H$ -dependentního promotoru při odpovědi na tepelný stres. V kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  došlo po tepelném stresu k výraznému snížení promotorové aktivity testovaných fragmentů. V kmenech *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigH\Delta sigM$  byl po tepelném stresu negativní efekt delece genů kódujících alternativní sigma faktory na aktivitu promotoru ještě výraznější (promotorová aktivita byla snížena na úroveň pozadí). Tyto výsledky poukazují na to, že po tepelném stresu je funkční převážně promotor P2-*dnaK*, který je rozeznáván nejen sigma faktorem  $\sigma^H$  (Ehira et al., 2009), ale i sigma faktorem  $\sigma^M$ . Prokázaná účast sigma faktoru  $\sigma^M$  při expresi genů operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* po tepelném stresu je v souladu s výsledky získanými metodou *DNA microarray hybridization*, kdy bylo zjištěno, že geny *grpE*, *dnaJ* a *hspR*, jsou transkribovány v divokém kmeni *C. glutamicum* výrazně silněji než v mutantním kmeni DN1 s vyřazeným genem *sigM* (Nakunst et al., 2007).

Ve své práci jsem prokázala, že oba testované promotory P-*sigM* a P2-*dnaK*, jsou rozeznávány jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ . Jedná se o první popsany

---

případ vzájemné zastupitelnosti dvou alternativních sigma faktorů *C. glutamicum* při transkripci z promotorů rozeznávaných alternativními sigma faktory. Vzhledem k vysoké podobnosti promotorových sekvencí rozeznávaných  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  je pravděpodobné, že různé alternativní sigma faktory jsou vzájemně zastupitelné i při rozeznávání promotorových sekvencí dalších genů účastnících se stresové odpovědi u *C. glutamicum*. Konkrétní stresové podmínky pak mohou rozhodovat o kvantitativním zastoupení příslušných alternativních sigma faktorů v buňce, a tedy o použití příslušného sigma faktoru pro expresi určitého genu v podmínkách daného stresu.

## 6. Souhrn

Studium funkce alternativních sigma faktorů RNA polymerasy  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  při stresové odpovědi u *Corynebacterium glutamicum* probíhalo následujícím způsobem:

- 1) Byl testován vliv delece genů kódujících  $\sigma^H$  a  $\sigma^M$  na aktivitu promotoru genu *sigM*, který kóduje  $\sigma^M$ , za standardních podmínek a po oxidativním a tepelném stresu.
- 2) Cílenou mutagenezí byl připraven mutantní promotor genu *sigM* a byla měřena jeho aktivita v divokém kmeni a delečních kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po tepelném stresu.
- 3) Byl připraven mutantní promotor operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, jehož geny kódují proteiny účastníci se odpovědi buňky *C. glutamicum* na tepelný stres a byla měřena aktivita příslušného promotorového fragmentu v divokém kmeni a delečních kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek a po tepelném stresu.

Všechny testované promotory byly klonovány v „promoter-probe“ vektoru pET2 a jejich aktivita byla stanovována měřením specifické aktivity reportérového enzymu chloramfenikolacetyltransferasy.

V jednotlivých směrech bylo dosaženo těchto výsledků:

- 1) a) Bylo zjištěno, že působení diamidu (činitlo vyvolávající oxidativní stres) v koncentraci 2 mM nebo 10 mM nemá pozitivní efekt na aktivitu promotoru genu *sigM* (P-*sigM*) ani u divokého kmene, ani u delečních kmenů *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigM$ .
- b) Po tepelném stresu (40 °C/1 h) došlo u promotoru P-*sigM* k mírnému zvýšení aktivity, nejvíce se tento pozitivní efekt projevil u kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigM$ .

- c) Výsledky měření aktivity P-*sigM* v divokém kmeni *C. glutamicum* a v jeho mutantách s delecemi v genech kódujících alternativní sigma faktory prokázaly, že delece samotného genu *sigH* nebo *sigM* nevede ke snížení aktivity promotoru P-*sigM* za standardních podmínek (30 °C) ani po tepelném stresu. Naproti tomu u kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH\Delta sigM$  došlo k úplnému potlačení aktivity tohoto promotoru. Z těchto výsledků lze odvodit, že promotor genu *sigM* je rozeznáván za standardních podmínek i po tepelném stresu jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ , ale nikoli primárním sigma faktorem  $\sigma^A$ .
- 2) Bylo zjištěno, že mutagenese v -10 oblasti promotoru genu *sigM* vede k jeho inaktivaci. Byla prokázána nezbytnost trinukleotidu GTT 8 bp „upstream“ od počátku transkripce genu *sigM* pro funkci promotoru P-*sigM*. Tento výsledek prokazuje, že gen *sigM* je přepisován z jediného promotoru rozeznávaného alternativními sigma faktory.
- 3) a) V divokém kmeni *C. glutamicum* s fragmentem nesoucím mutantní promotor P2-*dnaK*mut byla zjištěna nižší promotorová aktivita za standardních podmínek i po tepelném stresu ve srovnání s divokým kmenem *C. glutamicum* nesoucím oba plně funkční promotory operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*.
- b) V kmenech *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  došlo po tepelném stresu k výraznému snížení promotorové aktivity testovaných fragmentů. Tyto výsledky poukazují na to, že po tepelném stresu je funkční převážně promotor P2-*dnaK*, který je zřejmě rozeznáván nejen sigma faktorem  $\sigma^H$ , ale i sigma faktorem  $\sigma^M$ .

Z uvedených výsledků vyplývá, že oba testované promotory P-*sigM* a P2-*dnaK*, jsou rozeznávány jak sigma faktorem  $\sigma^H$ , tak sigma faktorem  $\sigma^M$ . Jedná se o první popsany případ vzájemné zastupitelnosti dvou alternativních sigma faktorů *C. glutamicum* při transkripci z promotorů rozeznávaných alternativními sigma faktory.

## 7. Seznam citované literatury

- 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. *J. Bacteriol.* 186, 4813–4817.
- Barreiro, C., Nakunst, D., Hüser, A.T., dePaz, 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, 359–372.
- Bordes, P., Wigneshweraraj, S., Schumacher, J., Zhang, X., Chaney, M., Buck, M. (2003): The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: identifying a surface that binds sigma 54. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 2278–2283.
- Bose, D., Joly, N., Pape, T., Rappas, M., Schumacher, J., Buck, M., Zhang, X. (2008): Dissecting the ATP hydrolysis pathway of bacterial enhancer-binding proteins. *Biochem. Soc. T.* 36, 83–88.
- 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. *Mol. Cell.* 32, 337–346.
- Brinkrolf, K., Brune, I., Tauch, A. (2007): The transcriptional regulatory network of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 2, 191–211.
- Brockmann-Gretza, O., Kalinowski, J. (2006): Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in presence and absence of the *rel* gene encoding (p)ppGpp synthase. *BMC Genom.* 7, 230.
- Burr, T., Mitchell, J., Kolb, A., Minchin, S., Busby, S. (2000): DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Res.* 28, 1864–1870.
- Burrows, P.C., Severinov, K., Buck, M., Wigneshweraraj, S.R. (2004): Reorganisation of an RNA polymerase-promoter DNA complex for DNA melting. *EMBO J.* 23, 4253–4263.
- Doucleff, M., Pelton, J.G., Lee, P.S., Nixon, B.T., Wemmer, D.E. (2007): Structural basis of DNA recognition by the alternative sigma-factor,  $\sigma^{54}$ . *J. Mol. Biol.* 369, 1070–1078.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 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. *J. Bacteriol.* 191, 2964–2972.

- Engels, S., Schweitzer, J.E., Ludwig, C., Bott, M., Schäffer, S. (2004): *clpC* and *clpPIP2* 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  $\sigma^H$ . Mol. Microbiol. 52, 285–302.
- Gerstmeir, R., Cramer, A., Dangel, P., Schaffe, S., Eikmanns, B.J. (2004): RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 186, 2798-2809.
- Ghosh, t., Bose, D., Zhang, X. (2010): Mechanism for activating bacterial RNA polymerase. FEMS Microbiol Rev. 34, 611-627.
- Halgasova, N., Bukovska, G., Ugorcakova, J., Timko, J., Kormanec, J. (2002): The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. FEMSMicrobiol. Lett. 216, 77–84.
- Hanahan, D. (1985): Techniques for transformation of E. coli. In: Glover, D.M. (1985): DNA cloning. A practical approach vol I. IRL Press, Oxford, 109-135.
- Helmann J.D. (1999): Anti-sigma factors. Cur. Opi. In Microbiol. 2, 135-141.
- Hermann, T. (2003): Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. J. Biotechnol. 104, 155-172.
- Holátko, J., Elišáková, Prouza, M., Nešvera, J., Pátek, M. (2006): Promoter modifications for branched-chain amino acid production. European patent application EP 06010527.7, filed May 22, 2006.
- Hong, E., Doucleff, M., Wemmer, D.E. (2009): Structure of the RNA polymerase core-binding domain of  $\sigma^{54}$  reveals a likely conformational fracture point. J. Mol. Biol. 390, 70-82.
- 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 Microbiol. Lett. 290, 32–38.
- Ikeda, M., Baba, M., Tsukamoto, N., Komatsu, T., Mitsuhashi, S., Takeno, S. (2009): Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 806–2808.
- Ishige, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V.F., Sahn, H. (2003): The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. J. Bacteriol. 185, 4519-4529.
- 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. J. Bacteriol. 189, 5582–5590.

- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkowski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahn, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., Tauch, A. (2003): The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104, 5-25.
- Kim, T.H., Kim, H.J., Park, J.S., Kim, Y., Kim, P., Lee, H.S. (2005): Functional analysis of sigH expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 757-764.
- Kang, J.G., Paget, M.S., Seok, Y.J., Hahn, M.Y., Bae, J.B., Hahn, J.S., Kleanthous, C., Buttner, M.J., Roe, J.H. (1999): RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *Embo. J.* 18, 4292-4298.
- 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 Genom.* 8, 4.
- Nakunst, D., Larisch, C., Hüser, A.T., Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J. (2007): The extracytoplasmatic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 1332 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J. Bacteriol.* 189, 4696-4707.
- Nešvera, J., Pátek, M. (2011): Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90, 1641-1654.
- Oguiza, J.A., Marcos, A.T., Martín, J.F. (1997): Transcriptional analysis of the *sigA* and *sigB* genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 111–117.
- Paget, M.S., Molle, V., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Buttner, M.J. (2001): Defining the disulfide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the  $\sigma^R$  regulon. *Mol. Microbiol.* 42, 1007-1020.
- Park, S.D., Youn, J.W., Kim, Y.J., Lee, S.M., Kim, Y., Lee, H.S. (2008): *Corynebacterium glutamicum*  $\sigma^E$  is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti- $\sigma$  factor CseE. *Microbiology.* 154, 915–923.
- Pátek, M. (2005): Regulation of gene expression. In: Eggeling, L., Bott, M. (2005): *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, 86-87.
- Pátek, M., Nešvera, J. (2011): Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 154, 101-113.

- Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs Jr., W.R., Husson, R.N. (2001): The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 183, 6119–6125.
- Rodrigue, S., Provvedi, R., Jacques, P.E., Gaudreau, L., Manganelli, R. (2006): The  $\sigma$  factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 926–941.
- 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 Dev.* 15, 491-506.
- Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A.K., Singh, Y. (2010): The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.* 277, 605–626.
- 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 Microbiol. Rev.* 34, 685–737.
- Schumacher, J., Zhang, X., Jones, S., Bordes, P., Buck, M. (2004): ATP-dependent transcriptional activation by bacterial PspF AAA+ protein. *J. Mol. Biol.* 338, 863-875.
- Silberbach, M., Hüser, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Walter, B., Kramer, R., Burkovski, A. (2005): DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 119, 357–367.
- Snustad, D., Simmons, M.J. (2009): Transkripce a úpravy RNA. In: *Genetika. Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno*, 293-296.
- Song, T., Dove, S.L., Lee, K.H., Husson, R.N. (2003): RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. *Mol. Microbiol.* 50, 949-959.
- Souček, A. (1996): Nepravidelné nesporeující aerobní bakterie. In: Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (1996): *Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha*, 298-302.
- Šilar, R. (2007): Promotory *Corynebacterium glutamicum* regulované alternativními sigma faktory RNA polymerasy. Praha, Univerzita Karlova v Praze.
- Šilhánková, L. (2002): Nepravidelné nesporeující grampozitivní tyčinky. In: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia, Praha*, 276-277.
- Vašicová, P., Abrahámová, Z., Nešvera, J., Pátek, M., Sahm, H., Eikmanns, B. (1998): Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Tech.* 12, 743-746.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., Hengge, R. (2005): Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* 187, 1591-1603.



Wigneshweraraj, S., Burrows, P., Bordes, P., Schumacher, J., Rappas, M., Finn, R., Cannon, W., Zhang, X., Buck, M. (2005): The second paradigm for activation of transcription. *Prog. Nucleic Acid Re.* 79, 339-369.

Xu, H., Hoover, T.R. (2001): Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 138-144.

Yukawa, H., Omumasaba, C.A., Nonaka, H., Kos, P., Okai, N., Suzuki, N., Suda, M., Tsuge, Y., Watanabe, J., Ikeda, Y., Vertes, A.A., Inui, M. (2007): Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology.* 153, 1042-1058.

Zhang, X., Chaney, M., Wigneshweraraj, S., Schumacher, J., Bordes, P., Cannon, W., Buck, M. (2002): Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol. Microbiol.* 45,895-903.