

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Studijní obor: Mikrobiologie**



**Dizertační práce**

**Pleiotropní efekt proteinů s WD-40 doménami na buněčnou  
diferenciaci a produkci sekundárních metabolitů u *Streptomyces coelicolor***

**Mgr. Aleš Ulrych**

**Praha 2011**

Mikrobiologický ústav AV ČR  
Sektor buněčné a molekulární mikrobiologie  
Laboratoř buněčné signalizace  
Školitel: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Tato dizertační práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři buněčné signalizace pod odborným vedením RNDr. Pavla Brannyho, CSc. v období říjen 2003 – květen 2011.

Práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (2B08064), evropského konsorcia EC Integrated Project ActinoGEN (LSHM-CT-2004-005224) a za podpory institucionálního výzkumného záměru (AV0Z50200510).

**Prohlášení:**

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

V Praze, 25.5.2011

.....  
Mgr. Aleš Ulrych

Nejprve bych rád poděkoval svému školiteli Pavlu Brannymu za odborné vedení dizertační práce.

Za poskytnutí základní myšlenky celého projektu, za poskytnutí plazmidových konstruktů a za cenné rady a postřehy bych chtěl obzvláště poděkovat Kateřině a Miroslavu Petříčkovým.

Za zhotovení elektronmikroskopických snímků bych chtěl poděkovat Oldřichu Benadovi a Olze Kofroňové.

Za podporu bych rád poděkoval Jiřímu Vohradskému.

Dále bych rád poděkoval všem současným i minulým kolegům z laboratoře a rovněž kolegům z okolních laboratoří za vytvoření vynikající pracovní atmosféry, cenné rady, podporu během nekonečného doktorského studia a hlavně za obrovský smysl pro humor.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům a především své manželce Michaele za psychickou podporu a obzvláště v závěrečné fázi studia za trpělivost a pevné nervy; našemu malému synovi Lukáškově pak za častou společnost strávenou při probdělých nocích nad psaním dizertační práce ☺.

## ABSTRAKT

### Pleiotropní efekt proteinů s WD-40 doménami na buněčnou diferenciaci a produkci sekundárních metabolitů u *Streptomyces coelicolor*

WD-40 domény, také známé jako beta-transducinové repetice, jsou vysoce konzervované aminokyselinové repetice, které se nacházejí v mnoha odlišných eukaryotních proteinech, kde plní širokou škálu funkcí. Koncem 90. let minulého století byly identifikovány první proteiny s WD-40 doménami u prokaryot, ale o jejich funkci není známo téměř nic.

*Streptomyces coelicolor* je grampozitivní bakterie s komplikovanou buněčnou morfologií a fyziologickou diferenciací během životního cyklu. Genom *Streptomyces coelicolor* kóduje 6 pravděpodobných genů kódujících proteiny s WD-repetitivními motivy. Pro bližší porozumění funkce dvou z těchto WD-40 genů (*wdpB* a *wdpC*) byly připraveny jejich disrupční mutanty, u kterých byl stanoven fenotypový projev a provedena transkripční analýza. Oba mutantní kmeny vykazovaly aberantní fenotyp závislý na použitém kultivačním médiu s nejvýraznějším fenotypovým projevem mutantů na modifikovaném R3 agaru. Fenotypové studie odhalily, že delece genu *wdpB* způsobuje značnou redukci tvorby vzdušného mycélia a sníženou produkci undecylprodigiosinu. Kromě toho dochází u mutantů *wdpB* k neobvyklému větvení vzdušného mycélia a k defektní sporulaci projevující se předčasnou lyzí vláken a nepravidelnou či opožděnou tvorbou přepážek mezi spórami. Mutant *wdpC* vykazuje předčasnou lyzi vláken a opožděnou sporulaci s rovnými hyfami bez typického spirálovitého stáčení v časně fázi sporulace. Disrupce genu *wdpC* způsobuje snížení produkce undecylprodigiosinu a opoždění produkce aktinorodinu. Analýzou globálního transkriptomu bylo zjištěno, že delece genu *wdpB* ovlivňuje expresi genů zodpovědných za formování vzdušného mycélia (shluk *ram*, chapliny, rodliny, gen *nepA*), sporulaci (*whiH*, *whiI*, *rsfA*) a za syntézu sekundárních metabolitů (kalcium-dependentní antibiotikum, coelichelin, karotenoidy, geosmin a methylisoborneol). Z výsledků transkripční analýzy vyplývá, že WdpB reprimuje přímo či nepřímo vlastní transkripci a také expresi sousedního genu SCO5954. Delece genu *wdpC* způsobuje represí transkripce sporulačního genu *whiE-ORFIII* a několika biosyntetických genových shluků sekundárního metabolismu (aktinorodinu, kalcium-dependentního antibiotika a genového shluku *cpk*). Podobně jako u WdpB, také WdpC reprimuje přímo či nepřímo vlastní transkripci a transkripci sousedního genu SCO2245 a několika dalších genů (SCO2217, SCO4214, operon SCO4173-5). Zatímco nadprodukce genu *wdpB* v divokém typu neměla vliv na fenotyp, nadprodukce genu *wdpC* způsobila zvýšenou biosyntézu aktinorodinu. Tento kmen s vyšší genovou dávkou genu *wdpC* vykazoval opačný trend relativní genové exprese vybraných genů u mutantu  $\Delta wdpC$ . Transkripce obou testovaných genů se zdá být konstitutivně exprimována během životního cyklu. Hladina proteinu WdpC je závislá na stádiu buněčného cyklu *S. coelicolor* s maximem na počátku sporulace. Přítomnost proteinu WdpB se nepodařilo detekovat.

Podle získaných výsledků lze předpokládat, že geny *wdpB* a *wdpC* mají pleiotropní účinek na produkci sekundárních metabolitů a hrají důležitou úlohu v buněčné diferenciaci.

## ABSTRACT

### **The pleiotropic effect of WD-40 domain containing proteins on cellular differentiation and production of secondary metabolites in *Streptomyces coelicolor***

WD-40 domains, also known as beta-transducin repeats, are highly conserved repeating amino acid units, which are found in a wide variety of eukaryotic proteins that have a range of different functions. In the late 1990s, the first WD-40 containing proteins were identified in prokaryotes, however the knowledge about their function is scarce.

*Streptomyces coelicolor* is a gram-positive bacterium with complicated morphological and physiological differentiation in the course of its life cycle. The genome of *Streptomyces coelicolor* encodes 6 potential genes encoding proteins with WD-repeat motifs. To determine the function of two of these WD-40 genes (*wdpB* and *wdpC*), the deletion replacement mutants in both genes were prepared. Both mutants exhibited medium-dependent phenotypes, which are markedly evident on modified R3 plates. Phenotypic studies revealed that deletion of *wdpB* gene resulted in substantial reduction of aerial hyphae formation and reduced production of undecylprodigiosin. In addition, the hyphae of  $\Delta wdpB$  mutant were unusually branched and showed the signs of precocious lysis. Delayed spore-containing hyphae were irregularly septated.  $\Delta wdpC$  deleted mutant demonstrated precocious lysis of hyphae and delayed sporulation with straight hyphae without typical curling of the aerial hyphae in early stages of sporulation. Its disruption resulted in the reduction of an antibiotic undecylprodigiosin and delayed actinorhodin production. Whole-genome transcription analysis revealed that deletion of *wdpB* affected the expression of genes responsible for aerial hyphae differentiation (*ram* cluster, chaplins, rodlines, *nepA* gene), sporulation (*whiH*, *whiI* and *rsfA*) and biosynthetic gene clusters for secondary metabolites (calcium-dependent antibiotic, coelichelin, carotenoids, geosmin and methylisoborneol). Transcriptional analysis suggested that WdpB is involved in repression its own expression and neighbouring SCO5954 gene either directly or indirectly. The deletion of *wdpC* resulted in downregulation of sporulation gene *whiE-ORFIII* and several biosynthetic gene clusters coding for secondary metabolites (actinorhodin, calcium-dependent antibiotic and *cpk* gene cluster). Similarly to WdpB, WdpC is also involved, either directly or indirectly, in repression its own expression and neighbouring SCO2245 gene and several other genes (SCO2217, SCO4214 and operon SCO4173-5). Overexpression of *wdpB* gene in wild type strain did not affect the phenotype, whereas overexpression of *wdpC* resulted in the increase of actinorhodin production. In addition, mutant strain with higher gene dosage of *wdpC* showed opposite trend of relative gene expression of selected genes than that of  $\Delta wdpC$ -disrupted mutant. Both tested genes seemed to be constitutively expressed. Whereas expression of WdpC was temporally controlled, reaching a maximum level concurrently with the formation of spores, the presence of WdpB protein was not established.

The results obtained suggest that both genes studied have pleiotropic effect on the production of secondary metabolites and play an important role in cellular differentiation.

# OBSAH

<b>OBSAH .....</b>	<b>I</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>V</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 WD domény .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 WD-40 domény u eukaryotních hub a jejich vliv na diferenciaci .....	7
2.1.2 WD-40 domény u prokaryot.....	8
<b>2.2 Streptomycety .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Genetická výbava streptomycet.....	10
2.2.2 Životní cyklus streptomycet .....	11
2.2.3 Regulace biosyntézy antibiotik u streptomycet .....	14
2.2.3.1 Geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů uspořádané do genových shluků a jejich regulace .....	15
2.2.3.2 Sekundární poslové – cAMP a ppGpp .....	16
2.2.3.3 Nízkomolekulární autoregulátory – $\gamma$ -butyrolaktony a ostatní .....	17
2.2.3.4 Autoregulační faktory peptidového charakteru .....	20
2.2.3.5 Dvousložkové fosforylační systémy a s nimi související dráhy .....	20
2.2.3.6 Systém AfsK/AfsR.....	21
2.2.3.7 <i>bld</i> mutanty a produkce sekundárních metabolitů.....	23
2.2.4 Formování vzdušného mycélia.....	23
2.2.4.1 <i>bld</i> mutanty a jejich uplatnění v diferenciaci.....	24
2.2.4.2 <i>ramR</i> a genový shluk <i>rag</i> .....	30
2.2.4.3 Autoregulátory uplatňující se v morfologické diferenciaci .....	32
2.2.4.4 Vliv hladiny GTP v buňce na morfologickou diferenciaci.....	33
2.2.5 Morfogeny – SapB, chapliny a rodliny .....	33
2.2.5.1 Protein SapB.....	34
2.2.5.2 Rodliny.....	37
2.2.5.3 Chapliny .....	37
2.2.6 Bílé mutanty a sporulace .....	39
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Příprava sporových suspenzí.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Analýza <i>in silico</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Bakteriální kmeny .....</b>	<b>46</b>

<b>3.4 Vektory .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5 Kultivační půdy .....</b>	<b>47</b>
3.5.1 Složení živných půd pro kultivaci <i>E. coli</i> .....	48
3.5.2 Složení živných půd pro kultivaci streptomycet .....	48
<b>3.6 Manipulace s DNA .....</b>	<b>49</b>
3.6.1 Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> .....	49
3.6.2 Izolace chromozomální DNA ze streptomycet.....	49
3.6.3 Elektroforetická separace DNA a izolace DNA fragmentu z agarózového gelu.....	50
3.6.4 Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> .....	50
3.6.5 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> plazmidovou DNA.....	50
3.6.6 Transformace protoplastů streptomycet plazmidovou DNA.....	51
3.6.7 PCR amplifikace a použité oligonukleotidy .....	52
3.6.8 Southernův přenos.....	52
3.6.9 Příprava sond a hybridizace .....	53
<b>3.7 Manipulace s RNA .....</b>	<b>54</b>
3.7.1 Izolace celkové RNA ze streptomycet .....	54
3.7.2 Reverzní transkripce.....	55
3.7.3 Kotranskripční analýza a RT-PCR.....	55
3.7.4 Microarray analýza.....	56
3.7.5 qRT-PCR.....	57
<b>3.8 Manipulace s proteiny.....</b>	<b>60</b>
3.8.1 Izolace proteinů ze streptomycet.....	60
3.8.2 SDS-PAGE a barvení gelů .....	60
3.8.3 Westernův přenos („Western blotting“) .....	60
3.8.4 Imunodetekce .....	61
3.8.5 Příprava polyklonálních protilátek .....	61
<b>3.9 Stanovení růstové křivky a koncentrace antibiotik.....</b>	<b>62</b>
3.9.1 Stanovení růstové křivky.....	62
3.9.2 Stanovení undecylprodigiosinu .....	62
3.9.3 Stanovení celkového aktinorodinu .....	62
<b>3.10 Rastrovací elektronová mikroskopie .....</b>	<b>63</b>
<b>3.11 Konstrukce disruptivních mutantních kmenů .....</b>	<b>63</b>
3.11.1 Konstrukce mutantu $\Delta wdpB$ .....	63
3.11.2 Konstrukce mutantu $\Delta wdpC$ .....	64
<b>3.12 Konstrukce kmenů s vyšším počtem kopií genů <i>wdpB</i>, resp. <i>wdpC</i> u <i>S. coelicolor</i> .....</b>	<b>64</b>

<b>3.13 Konstrukce nadprodukčních kmenů v <i>E.coli</i> .....</b>	<b>65</b>
3.13.1 Příprava expresních konstruktů .....	65
3.13.2 Exprese genů <i>wdpB</i> , resp. <i>wdpC</i> pomocí expresních plazmidů .....	66
3.13.3 Purifikace fúzních proteinů .....	66
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Genom <i>Streptomyces coelicolor</i> obsahuje 6 genů kódujících potenciální proteiny s WD-40 repetitivními doménami .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Složení funkčních domén u genů <i>wdpB</i> a <i>wdpC</i> a analýza příslušných genových lokusů ..</b>	<b>68</b>
<b>4.3 Disrupce genů <i>wdpB</i> a <i>wdpC</i> u <i>S. coelicolor</i> M145 a jejich fenotypový projev .....</b>	<b>69</b>
4.3.1 Příprava disruptčních mutantních kmenů .....	69
4.3.2 Vliv mutantních kmenů $\Delta wdpB$ a $\Delta wdpC$ na produkci sekundárních metabolitů .....	70
4.3.3 Vliv mutantních kmenů $\Delta wdpB$ a $\Delta wdpC$ na morfologickou diferenciaci .....	72
4.3.3.1 Makroskopické snímky z kultivace na pevných půdách .....	72
4.3.3.2 Snímky z rastrovací elektronové mikroskopie .....	73
<b>4.4 Extracelulární komplementace mutantu <math>\Delta wdpB</math> .....</b>	<b>76</b>
<b>4.5 Přepis genů <i>wdpB</i> a <i>wdpC</i> v průběhu životního cyklu.....</b>	<b>77</b>
<b>4.6 Analýza transkriptomů mutantních kmenů <math>\Delta wdpB</math> a <math>\Delta wdpC</math>.....</b>	<b>78</b>
4.6.1 Transkriptom mutantního kmene $\Delta wdpB$ .....	78
4.6.1.1 Klasifikace genů se zvýšenou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpB$ .....	78
4.6.1.2 Klasifikace genů se sníženou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpB$ .....	79
4.6.2 Transkriptom mutantního kmene $\Delta wdpC$ .....	83
4.6.2.1 Klasifikace genů se zvýšenou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpC$ .....	84
4.6.2.2 Klasifikace genů se sníženou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpC$ .....	85
4.6.3 Ověření výsledných dat získaných z DNA čipů pomocí metody qRT-PCR. ....	88
<b>4.7 Transkripční profily vybraných genů v průběhu životního cyklu.....</b>	<b>90</b>
<b>4.8 Koexpresní analýza .....</b>	<b>94</b>
4.8.1 Koexprese genů SCO5951–5954 .....	95
4.8.2 Koexprese genů SCO2244-2247 .....	96
<b>4.9 Kmeny <i>S. coelicolor</i> s vyšším počtem kopií genu <i>wdpB</i>, resp. <i>wdpC</i>.....</b>	<b>97</b>
4.9.1 Fenotyp mutantních kmenů se zvýšenou genovou dávkou genu <i>wdpB</i> , resp. <i>wdpC</i> .....	97
4.9.2 Stanovení produkce Act u mutantních kmenů se zvýšenou genovou dávkou genu <i>wdpB</i> , resp. <i>wdpC</i> .....	98
4.9.3 Transkripční profil vybraných genů u mutantních kmenů s vyšším počtem kopií genu <i>wdpB</i> , resp. <i>wdpC</i> .....	99
<b>4.10 Detekce WD proteinů v buňkách <i>S. coelicolor</i> polyklonálními protilátkami .....</b>	<b>102</b>



<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>104</b>
<b>5.1 Mutace v genech <math>\Delta wdpB</math> a <math>\Delta wdpC</math> způsobují defekt v morfolo-     gické i ve fyziologické diferenciaci .....</b>	<b>104</b>
<b>5.2 Proteiny WdpB a WdpC ovlivňují expresi celé řady genů <i>S. coelicolor</i> .....</b>	<b>107</b>
5.2.1 Vliv disrupce genu <i>wdpB</i> na expresi genů u <i>S. coelicolor</i> .....	107
5.2.2 Vliv disrupce genu <i>wdpC</i> na expresi genů u <i>S. coelicolor</i> .....	111
<b>5.3 Autorepresní a regulační účinek produktů genů <i>wdpB</i> a <i>wdpC</i> .....</b>	<b>115</b>
<b>5.4 Peptid SapB jako hlavní příčina redukce vzdušného mycélia u <math>\Delta wdpB</math> .....</b>	<b>116</b>
<b>5.5 Protein WdpC je exprimován především na začátku sporulace, protein WdpB se     nepodařilo v <i>S. coelicolor</i> detekovat .....</b>	<b>117</b>
<b>5.6 Vliv nadprodukce genu <i>wdpB</i>, resp. <i>wdpC</i> na diferenciaci <i>S. coelicolor</i> .....</b>	<b>118</b>
5.6.1 Nadprodukce genu <i>wdpB</i> nemá vliv na diferenciaci .....	118
5.6.1 Kmen s vyšším počtem kopií genu <i>wdpC</i> vykazuje opačný fenotyp k mutantnímu kmeni $\Delta wdpC$ .....	118
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>120</b>
<b>6.1 Úloha WdpB v diferenciaci <i>S. coelicolor</i> .....</b>	<b>120</b>
<b>6.2 Úloha WdpC v diferenciaci <i>S. coelicolor</i> .....</b>	<b>120</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>122</b>

**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

A	adenin
A <sub>260</sub> , A <sub>280</sub> , A <sub>530</sub> , A <sub>640</sub>	absorbance při vlnové délce 260, 280, 530, 640 nm
Act	aktinorodin
ADP	adenozin-5'-difosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát (X-fosfát)
C	cytozin
cAMP	cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát
CDA	kalcium-dependentní antibiotikum
cDNA	komplementární DNA
Cy3-, resp. Cy5-dCTP	5-amino-propargyl-2'-deoxycytidin-5'-trifosfát s navázanou Cy3, resp. Cy5 fluorescenční barvou
dATP	2'-deoxyadenozin-5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanozin-5'-trifosfát
dTTP	2'-deoxytymidin-5'-trifosfát
DIG	digoxigenin
DIG-dUTP	digoxigenin-11-2'-deoxyuridin-5'-trifosfát
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	ditiotritol
ECL	zesílená chemiluminiscence (enhanced chemiluminiscence)
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ESTPK	Ser/Thr proteinkináza eukaryotického typu
g	tíhové zrychlení
G	guanin
gDNA	chromozomální DNA
GTP	guanozin-5'-trifosfát
IgG	imunoglobulin G
IPTG	izopropyl-β-D-tiogalaktozid
Leu <sub>t</sub> RNA	transferová RNA přenášející leucin
MBP	vazebný protein pro maltózu (maltose-binding protein)
MOPS	morpholinepropanesulfonic acid
mR3 agar	modifikovaný R3 agar
mRNA	mediátorová RNA
NBT	nitrobluetetrazolium
NHS-Sepharosa	N-hydroxysuccinimide-Sepharosa
nt	nukleotid
OD <sub>600</sub>	optická denzita při 600 nm
ORF	otevřený čtecí rámeček
oriC	replikační počátek
pb	páry bazí
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEG	polyetylen glykol (PEG 1000, číslo značí molekulovou váhu)
ppGpp	guanozin-5'-difosfát-3'-difosfát (zkráceně guanozin tetrafosfát)
PVDF	polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
rcf	relativní centrifugační síla (relative centrifugal force)
RED	tripyrrol undecylprodigiosin
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu (rotation per minute)
RT-PCR	PCR reakce na cDNA templátu (reverse-transcription PCR)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
T	tymin
TES	N-tris(hydroxymetyl)metyl-2-aminoetansulfonová kyselina
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometan
UV záření	ultrafialové záření
wt	divoký typ (wild type)
X-fosfát	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát (BCIP)

# 1. ÚVOD

Jeden ze základních mechanismů buněčných procesů na molekulární úrovni představují protein-proteinové interakce, které jsou zajišťovány celou řadkou proteinových motivů, jako např. PQQ, WD-40, SH2, FHA, KLC apod. K nejrozšířenějším motivům u eukaryot patří WD-40 domény, které se uplatňují v celé škále buněčných procesů, zejména jako regulační bílkoviny. Mimo jiné se podílejí na přenosu signálu, regulaci transkripce či při diferenciaci kvasinek.

Existence WD-40 proteinů u eukaryot byla prokázána již v roce 1986 a jejich výskyt byl dlouhou považován za ryze eukaryotický fenomén. Teprve koncem 90. let minulého století byly první WD-40 domény popsány i u prokaryot. Jelikož je jejich důležitost pro eukaryotické procesy zcela evidentní, dá se předpokládat, že by mohly plnit klíčovou úlohu v regulačních drahách i u prokaryot, ovšem o jejich funkci není dosud téměř nic známo.

Streptomycety jako vláknité půdní bakterie se v mnoha životních projevech podobají eukaryotickým nižším houbám. Jsou relativně jednoduchým prokaryotickým modelem pro studium diferenciačních procesů a rovněž jsou studovány pro jejich nezastupitelný význam v produkci široké škály sekundárních metabolitů (např. antibiotik, antifungálních látek, látek s protinádorovým účinkem, herbicidů atd.) komerčně využívaných v lékařství, průmyslu či zemědělství a v produkci nejrůznějších hydrolytických enzymů.

Oproti buňce eukaryotické poskytují buňky prokaryotické nepoměrně jednodušší model pro studium diferenciace. Ve svých regulačních obvodech však také často využívají „eukaryotické“ prvky, jako jsou např. Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu či v této práci studované WD-40 repetitivní proteiny.

Jako modelový organizmus byl v této práci použit bakteriální kmen *Streptomyces coelicolor*, který je z genetického hlediska nejlépe prostudovaný zástupce streptomycet. Produkuje přinejmenším 10 známých sekundárních metabolitů, jejichž kvantifikace je snadno proveditelná v laboratorních podmínkách. Tato skutečnost jej předurčuje k využití jako modelu pro genetické studie buněčné diferenciace. Dvě barevná antibiotika, červený undecylprodigosin (Red) a modrý aktinorodin (Act), stejně jako šedý spórový pigment slouží jako genetické markery pro studium fyziologické a morfologické diferenciace *S. coelicolor*.

Tato dizertační práce se zabývá úlohou dvou proteinů s WD repeticemi WdpB a WdpC u *S. coelicolor* a navazuje na výsledky získané v rámci grantového projektu GA ČR 204/02-D120 (řešitel K. Petříčková). Byly stanoveny následující cíle:

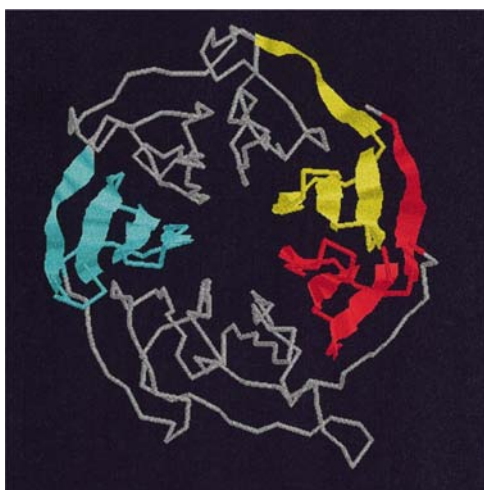
- Připravené disruptční mutanty  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$  podrobit fenotypovým studiím pro určení vlivu mutace v genu *wdpB*, resp. *wdpC* na produkci sekundárních metabolitů a morfologickou diferenciaci.
- Stanovit vliv mutací v genech *wdpB* a *wdpC* na genovou expresi – určit globální transkriptom mutantních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$ .
- Přípravit kmeny s vyšší genovou dávkou genu *wdpB*, resp. *wdpC* a použít je ke stanovení vlivu nadprodukce těchto genů na fenotyp a genovou expresi.
- Detekovat přítomnost proteinů WdpB resp., WdpC v celkovém proteinovém lyzátu pomocí polyklonální protilátky během životního cyklu.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 WD domény

WD-40 domény (tzv.  $\beta$ -transducinové repetice či WD repetice) byly poprvé popsány v roce 1986 (Fong *et al.*, 1986) u  $\beta$ -podjednotky heterotrimerních G proteinů, která tvoří stabilní dimer s  $\gamma$ -podjednotkou G proteinů. G proteiny představují dobře charakterizované komponenty eukaryotických transmembránových signalizačních drah a právě jejich  $\beta$ -podjednotky jsou dosud nejlépe prostudované proteiny s WD-repeticemi, u nichž byla poprvé určena terciární struktura.

Proteiny s WD-doménami se vyznačují velkým stupněm funkční diverzity, ale navzdory tomu mají společné sekvenční motivy a také 3D strukturu  $\beta$ -lodního šroubu (obr. 2-1). Terciární struktura  $\beta$ -lodního šroubu je vysoce symetrická struktura složená z WD repetic. Každá z repetic zaujímá sekundární konformaci malého  $\beta$ -skládaného listu, který je složen ze čtyř antiparalelně uspořádaných polypeptidových řetězců (Lambright *et al.*, 1996; Sondek *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1995). Každá sekvenční repetice koresponduje se strukturální repeticí čtyř polypeptidových řetězců  $\beta$ -skládaného listu. Ovšem ne každá sekvenční repetice je ekvivalentní každé lopatce lodního šroubu, přesněji řečeno, jedna lopatka lodního šroubu se skládá z prvních tří polypeptidových řetězců A, B a C tvořících  $\beta$ -skládaný list jedné repetitivní jednotky a posledního čtvrtého polypeptidového řetězce D z  $\beta$ -skládaného listu předcházející lopatky lodního šroubu. Předpokládá se, že sdílení polypeptidových řetězců jednoho  $\beta$ -skládaného listu mezi dvěma lopatkami lodního šroubu stabilizuje celou molekulu (Neer *et al.*, 1994).

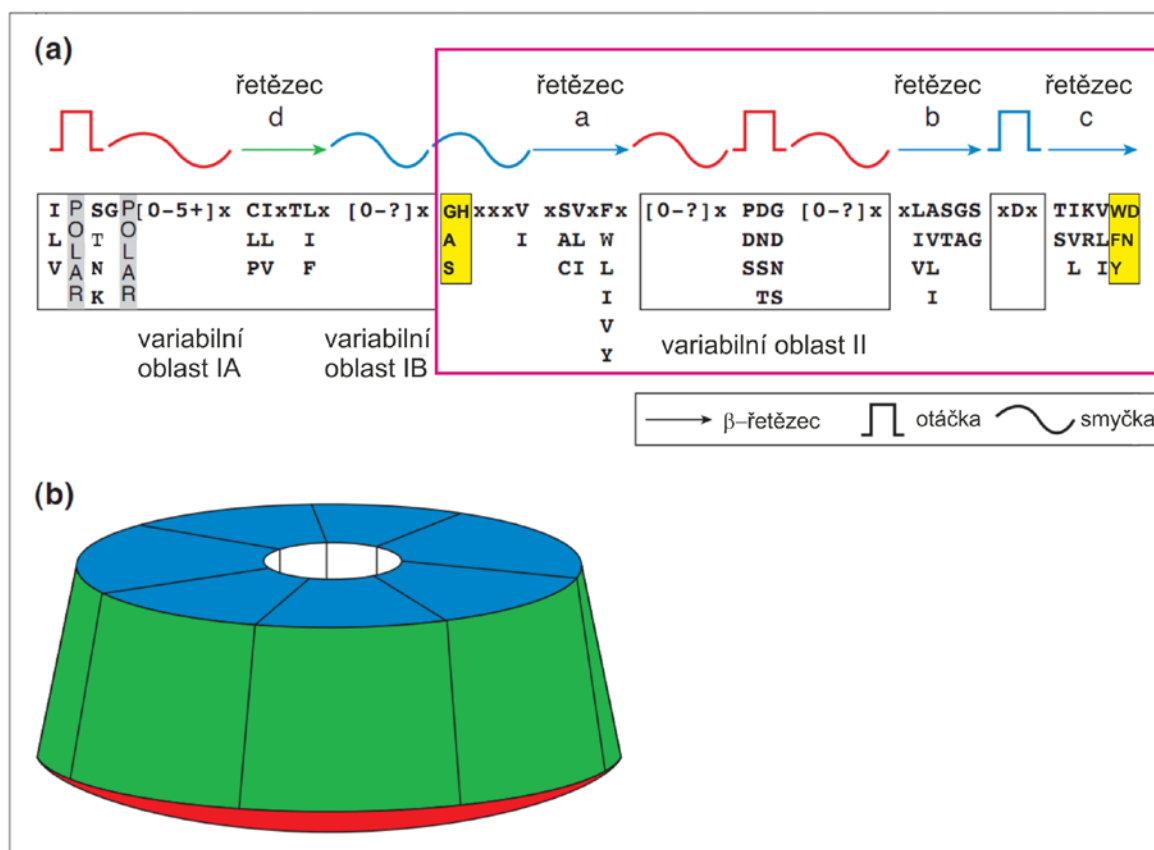


**Obr. 2-1: Struktura WD-40 repetitivního proteinu.** Každá lopatka  $\beta$ -lodního šroubu (označená modře) se skládá ze čtyř antiparalelně uspořádaných řetězců A-D  $\beta$ -skládaného listu, zatímco WD repetice (označené červeně a žlutě) se skládají ze tří řetězců A-C jednoho  $\beta$ -skládaného listu a jednoho čtvrtého řetězce D poskytnutého vedlejším  $\beta$ -skládaným listem. Z toho jasně vyplývá, že strukturální a sekvenční opakování není identické a v tomto případě umožňuje uzavření terciární struktury do kruhu a zvýšenou rigiditu komplexu (Smith *et al.*, 1999).

Základní společnou funkcí všech WD-40 domén je zprostředkování protein-proteinových interakcí. WD-repetitivní proteiny usměřují skládání multiproteinových komplexů, kde repetitivní jednotky fungují jako rigidní lešení pro proteinové interakce, které jsou součástí různých buněčných procesů (Smith *et al.*, 1999). Specifita proteinů je zřejmě dána sekvencemi ležícími mimo samotné repetice. Struktura  $\beta$ -lodního šroubu obsahuje tři potenciální povrchy vhodné pro proteinové interakce: horní, dolní a obvodový (obr. 2-2b). Středový tunel se zdá být pro proteinové interakce příliš úzký, a proto není považován za vhodného kandidáta pro proteinové interakce, ačkoliv může hrát důležitou koordinační roli (Lambright *et al.*, 1996; Neer a Smith, 1996; Wall *et al.*, 1995). Struktura  $\beta$ -lodního šroubu WD-40 domén vytváří stabilní platformu, která umožňuje formovat reverzibilní komplexy s různými proteiny. Např.  $\beta$ -podjednotka G proteinu pevně interaguje s  $\gamma$ -podjednotkou a současně interaguje s jedním z více než 15 různých proteinů (van der Voorn a Ploegh, 1992) a podobně fungují i další WD-repetitivní proteiny – např. Tup1 u kvasinek (Williams *et al.*, 1991) a snRNPs (Bjorn *et al.*, 1989).

WD-40 proteiny obvykle obsahují 4 až 16 vysoce konzervovaných repetitivních jednotek. Každá WD repetice je tvořena sekvencí dlouhou přibližně 40 až 60 aminokyselin s glycin-histidinovým (GH) dipeptidem lokalizovaným 11 až 24 aminokyselin od N-konce a s tryptofan-aspartátovým (WD) dipeptidem na C-konci. Jak je patrné z obr. 2-2a, sekvence ohraničená těmito dipeptidy představuje konzervované jádro WD repetice dlouhé přibližně 40 aminokyselin (Neer *et al.*, 1994). Tento obrázek udává kromě ideální sekvence také možné alternativní zastoupení aminokyselin seřazených podle frekvence výskytu v konkrétních pozicích a dále pravděpodobnou délku intervalu mezi nimi. Z obrázku jasně vyplývá, že ani jeden z dipeptidů (GH či WD) není zcela konzervovaný.

WD repetice obsahuje dvě oblasti s variabilní délkou polypeptidového řetězce, které jsou označovány jako Variabilní oblast I a II (obr. 2-2a). Největší variability v délce polypeptidového řetězce je dosaženo ve Variabilní oblasti I, která je lokalizovaná mezi řetězcem C jedné lopatky lodního šroubu a řetězcem A sousední lopatky lodního šroubu a zahrnuje tak celý řetězec D. Minimální délka této oblasti je 14 aminokyselinových zbytků (Chothia *et al.*, 1997), průměrná délka se pohybuje kolem 20, ale může dosahovat délky i téměř 150 aminokyselinových zbytků (Neer *et al.*, 1994). Tato Variabilní oblast I může být dále rozdělena na Variabilní oblast IA a IB. Variabilní oblast IA vyčnívá z dolního povrchu lodního šroubu a IB je exponována na horním povrchu lodního šroubu. Variabilní oblast II se nachází mezi řetězcem A a řetězcem B a je také exponována na dolním povrchu lodního šroubu. Její délka se pohybuje v rozmezí 2 až 30 aminokyselinových zbytků.



**Obr. 2-2: Schématické znázornění  $\beta$ -lodního šroubu a jeho zkladní stavební jednotky.** a) Struktura reprezentativní lopatky  $\beta$ -lodního šroubu typického WD-repetitivního proteinu. Struktura lopatky jako strukturální jednotky  $\beta$ -lodního šroubu, je odlišná od struktury WD-repetitivní jednotky. WD-repetitivní sekvence je tvořena čtyřmi řetězci  $\beta$ -skládaného listu v pořadí A, B, C a D. Ale lopatka lodního šroubu je tvořena třemi řetězci (A, B, C)  $\beta$ -skládaného listu z jedné WD-repetitivní jednotky a čtvrtého řetězce D  $\beta$ -skládaného listu z vedlejší WD-repetitivní jednotky. Alternativní aminokyseliny pro každou pozici jsou seřazeny podle frekvence jejich výskytu. Symbol X znamená, že v dané pozici může být jakákoliv aminokyselina; Variabilní oblasti jsou označeny jako Variabilní oblast IA, IB a II. Dipeptidy GH a WD ohraničující konzervované jádro WD repetice jsou označeny žlutě. b) Schématické znázornění pozic jednotlivých elementů v 3D struktuře zobrazených na obrázku a). Předpokládaná dolní plocha je vyznačena červeně, horní modře a obvodová plocha, která je tvořena především z řetězců  $\beta$ -skládaného listu, zeleně (převzato ze Smith *et al.*, 1999).

Délka sekvence mezi řetězcem B a C je konzervovaná a obsahuje vysoce konzervovaný aspartátový zbytek, který se vyskytuje v 85% u všech WD repetit. Navzdory jejich konzervovanosti ukazují mutace těchto zbytků u  $\beta$ -podjednotky G proteinu či kvasinkového proteinu Sec13p, že ne všechny tyto aspartátové zbytky jsou ekvivalentní a ne všechny jsou esenciální pro skládání struktury lodního šroubu. V některých případech mutace způsobuje zpomalení skládání terciární struktury (Garcia-Higuera *et al.*, 1998).

Ačkoliv předpokládaná struktura  $\beta$ -lodního šroubu u všech proteinů s WD repetitivy je řadí do velké proteinové rodiny se stejnou 3D strukturou, ostatní známé proteiny z této skupiny (proteiny zaujímající strukturu  $\beta$ -lodního šroubu, který není složen

z WD repetice) s nimi nesdílejí sekvenční podobnost. Mezi WD-repetitivními proteiny a proteiny se strukturou  $\beta$ -lodního šroubu bez WD-repetice je rozdíl v tom, že dosud nebyl objeven protein, jehož WD-repetitivní část by měla enzymatickou aktivitu a navíc se proteiny s WD-repeticemi většinou ani nevyskytují v kombinaci s jinými enzymatickými doménami. Byly popsány pouze výjimečné případy, kde jsou WD-repetitivní domény spojeny s doménami s proteinkinázovou aktivitou (Futey *et al.*, 1995; Janda *et al.*, 1996; Clancy *et al.*, 1997).

WD-40 proteiny mohou navíc kromě WD domény obsahovat další funkční doménu. Většinou se jedná o domény neenzymatické aktivity s výjimkou výše uvedených vzácných případů výskytu proteinkinázových domén. Takové proteiny mohou obsahovat např. motiv leucinového zipu, aktin-vazebný motiv (Bassi *et al.*, 1999), DNA-vazebný motiv zinkového prstu (Deng *et al.*, 1992), F-box (Elepfandt *et al.*, 2000), kaveolin-vazebný motiv, tzv. „coiled-coil“ struktura, kalmodulin-vázající motiv (Castets *et al.*, 2000), D box a KEN box (Pfleger a Kirschner, 2000).

Toto pozorování je v souladu s popisem terciární struktury WD-repetitivních proteinů – se strukturou  $\beta$ -lodního šroubu (Lambright *et al.*, 1996; Sondek *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1995). Jedná se o stabilní a extrémně rigidní strukturu, což jim znemožňuje plnit enzymatickou funkci. Oproti tomu má hned několik proteinů se strukturou  $\beta$ -lodního šroubu bez WD-repetice enzymatickou aktivitu, což je dáno tím, že tyto proteiny vytvářejí strukturu, která není tak rigidní jako strukturu  $\beta$ -lodního šroubu složená z WD repetice, a to jim uděluje potřebnou flexibilitu požadovanou pro katalytickou aktivitu.

Jak již bylo zmíněno výše, proteiny s WD-40 doménami se vyznačují velkým stupněm funkční diverzity (Yu *et al.*, 2000). Převážná většina WD-40 proteinů jsou regulační proteiny. Podílejí se na přenosu signálu (Castets *et al.*, 1996; Garcia-Higuera *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1999), apoptóze (Adrain *et al.*, 1999), kontrole buněčného cyklu a dělení (Verlhac *et al.*, 1997), formování cytoskeletu (Li a Suprenant, 1994), transportu váčků (Gerich *et al.*, 1995), tvorbě nukleozómu z chromatinu (Verreault *et al.*, 1996), RNA syntéze a procesingu (Dubrovskaya *et al.*, 1996), ale také třeba na sporulaci u kvasinek (viz kap. 2.1.1). O jejich významné funkci v regulačních procesech u eukaryot vypovídá také skutečnost, že defekt u některých proteinů s WD-40 repeticemi způsobuje některá vážná lidská onemocnění (Li a Roberts, 2001) – např. Cockayne syndrom (Henning *et al.*, 1995), lissencephalie (Lo *et al.*, 1997) a triple-A syndrom (Handschug *et al.*, 2001).



### 2.1.1 WD-40 domény u eukaryotních hub a jejich vliv na diferenciaci

Bylo zjištěno, že některé WD proteiny se uplatňují i při diferenciaci hub. Např. protein Fzr1 u *Schizosaccharomyces pombe* exprimovaný během meiózy a sporulace je potřebný pro normální produkci spór. Mutace v genu *fzr1* způsobuje tvorbu aberantních věcek obsahujících pouze jednu až dvě zralé spóry, které často postrádají vnější vrstvu buněčné stěny (Asakawa *et al.*, 2001). U *Neurospora crassa* je protein RCO1 vyžadován pro kontrolu vegetativního růstu, pohlavní reprodukci a také pro nepohlavní vývoj (Yamashiro *et al.*, 1996). Výraznou sekvenční podobnost s proteinem RCO1 vykazuje protein RcoA u *Aspergillus nidulans*. Mutantní kmen *rcoA* je deficientní jak v produkci nepohlavních spór, tak v produkci toxického sterigmatocystinu (Hicks *et al.*, 2001).

U *Saccharomyces cerevisiae* je nejlépe prostudovaným globálním regulátorem s WD repeticemi protein Tup1 obsahující 7 WD-40 domén (Green a Johnson, 2005; Sprague *et al.*, 2000), které spolu s proteinem Ssn6 (neboli Cyc8) vytváří korepresorový komplex (Keleher *et al.*, 1992). Delece jednoho z těchto dvou genů není letální, ale mutantní kmeny rostou pomaleji a vykazují hned několik odlišných fenotypových projevů, včetně flokulace, ztráty schopnosti pohlavního rozmnožování, slabé sporulace, ztráty schopnosti přijímat tymidin z média a ztráty schopnosti glukózové represe (Smith a Johnson, 2000). Globální korepresor Tup1-Ssn6 je zodpovědný za represi více než 180 genů, včetně např. skupiny genů reprimovaných glukózou, genů indukovaných poškozením DNA a genů indukovaných nedostatkem kyslíku (Green a Johnson, 2005; Smith a Johnson, 2000). Specifita represe je dána sekvenčně specifickým DNA-vazebným represorem, na který se komplex Tup1-Ssn6 váže a který blokuje expresi cílových genů. Takových represorů bylo popsáno již několik – např. Mig1 pro geny reprimované glukózou (Nehlin *et al.*, 1991), Ctr1 pro geny indukované poškozením DNA (Huang *et al.*, 1998), Rox1 pro geny indukované nedostatkem kyslíku (Balasubramanian *et al.*, 1993) a  $\alpha 2$  reprimující geny specifické pro haploidní a-buňky (Johnson a Herskowitz, 1985; Komachi *et al.*, 1994). Korepresor Tup1-Ssn6 reprimuje cílové geny mechanismem, který pravděpodobně zahrnuje interakce s holoenzymem RNA polymerázy II, s histony H3 a H4 (Edmondson *et al.*, 1996) a s histon deacetylázou (Davie *et al.*, 2003). Podle navrženého modelu mechanismu represe zprostředkované globálním korepresorem Tup1-Ssn6, dochází nejprve k interakci korepresoru Tup1-Ssn6 s příslušným sekvenčně specifickým DNA-vazebným represorem. Vytvořený komplex se váže na příslušný promotor. Po navázání na promotor může Tup1-Ssn6 interagovat s mediátorovým komplexem fungujícím jako můstek mezi RNA polymerázou II a korepresorem Tup1-Ssn6,

což způsobuje zastavení transkripce cílových genů. Navíc korepresor Tup1-Ssn6 interaguje také s příslušnou/nými deacetylázou/zami, která/é způsobuje/í deacetylaci histonů H3 a H4 a ty se následně vážou na Tup1, čímž se stabilizuje spojení korepresor s promotorem a zesiluje represní účinek. K represnímu účinku pravděpodobně také přispívá komplex enzymů ovlivňujících stupeň kondenzace chromatinu, tzv. chromatin remodeling complex, který spolupracuje s korepresorem Tup1-Ssn6 za účelem vytvoření nukleozomu v oblasti promotoru reprimovaných cílových genů (Malave a Dent, 2006).

U některých genů bylo zjištěno, že komplex Tup1-Ssn6 působí zcela opačně, a to jako aktivátor transkripce (Kim *et al.*, 2005b; Mennella *et al.*, 2003; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2002; Proft a Struhl, 2002).

Na regulaci diferenciaci u *Aspergillus nidulans* se podílí také WD protein SfaD. Jedná se o  $\beta$ -podjednotku heterotrimerního G proteinu, jejíž mutace vede ke zvýšení sporulace, k výraznému potlačení vegetativního růstu a k neschopnosti tvořit pohlavní plodnice (Rosen *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2005). SfaD spolu s dalšími podjednotkami G proteinu ( $\alpha$  a  $\gamma$ ) jsou také potřebné pro aktivaci germinace (Lafon *et al.*, 2005).

### 2.1.2 WD-40 domény u prokaryot

Výskyt WD-40 bílkovin byl dlouho považován za eukaryotní fenomén, ale koncem 90. let minulého století byly poprvé obdobně popsány WD-40 domény i u prokaryot – u aktinomycet (Janda *et al.*, 1996) a u cyanobakterií (Hisbergues *et al.*, 2001). Vzhledem ke kritické úloze WD-40 repetitivních proteinů v eukaryotických regulačních drahách se předpokládá, že by mohly hrát důležitou roli také u prokaryot. O jejich funkci je však známo zatím pouze velice málo.

U cyanobakterie *Synechocystis* byl identifikován protein Hat s 11 WD repeticemi podílející se na regulaci vysokoafinitního transportního systému pro anorganický uhlík, který je aktivován, pokud jsou buňky vystaveny podlimitní koncentraci zdroje uhlíku v prostředí (Hisbergues *et al.*, 2001).

U termofilní půdní aktinomycety *Thermomonospora curvata* byla identifikována bílkovina PkwA, jejíž C-terminální část je tvořena doménou se 7 WD repeticemi a N-konec Ser/Thr proteinkinázovou doménou. Autofosforylační aktivita kinázové domény proteinu PkwA nebyla prokázána, ale byla popsána fosforylace WD-40 domény membránovou frakcí bílkovin (Joshi *et al.*, 2000). PkwA je v buňkách přítomna pouze ve velmi časných

růstových fázích, a to ve formě vysokomolekulárních komplexů. V buňkách je lokalizována v buněčné membráně, na vrcholcích rostoucích hyf (Petrickova *et al.*, 2006).

Metodou hybridizace DNA sondy navržené vůči WD-40 konzervované sekvenci bylo detekováno 21 kmenů streptomycet obsahujících WD-repetitivní sekvence, což znamená, že WD-repetitivní domény jsou značně rozšířeny mezi streptomycetami (Stoytcheva *et al.*, 2000). Díky dokončené sekvenaci genomu *S. coelicolor* M145 (Bentley *et al.*, 2002).

## 2.2 Streptomycety

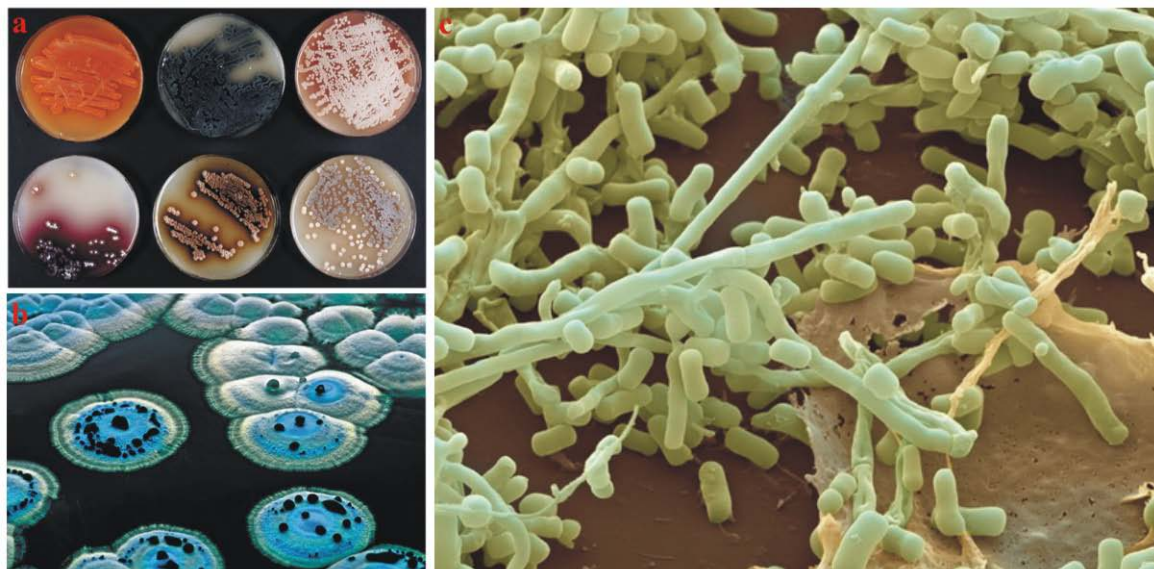
Streptomycety jsou jednou z největších a nejvýznamnějších skupin patřící do řádu *Actinomycetales*. Jde o morfologicky značně rozmanitou skupinu bakterií, do které jsou řazeny jak streptomycety s vláknitým růstem a složitou diferenciací, tak bakterie množící se jednoduchým dělením jako jsou *Corynebacterium*, *Micrococcus* a *Arthrobacter*. Přechodem mezi těmito skupinami jsou bakterie *Mycobacterium* a *Nocardia*, které již do jisté míry vykazují vláknitý charakter růstu (Chater a Hopwood, 1993).

Streptomycety jsou grampozitivní, aerobní, nepatogenní bakterie s vysokým obsahem G+C párů bází (70–74 %) v lineárním genomu, které se v půdě značnou měrou podílejí na rozkladu organického materiálu. Jsou to mikroorganizmy s komplikovaným životním cyklem, který zahrnuje fyziologickou (obr. 2-3a, b) i morfologickou diferenciaci (obr. 2-3c). Tvorbou vláknitého mycélia a životním cyklem připomínají eukaryotní houby, avšak buněčným složením se jedná o ryze prokaryotní mikroorganizmy. Díky své schopnosti fyziologické a morfologické diferenciace se streptomycety stávají jedinečným a oproti eukaryotům relativně jednoduchým modelem pro studium dějů spojených s diferenciací buněk. V laboratorních podmínkách je možné je pěstovat na jednoduchých definovaných médiích, pevných i tekutých.

Streptomycety se vyznačují produkcí velkého množství extracelulárních hydrolytických enzymů podílejících se na rozkladu organických materiálů (Kirby, 2005; McCarthy a Williams, 1992; Vukelic *et al.*, 1992), jako jsou např. celulóza, maltóza, škrob, chitin, lignin, xylan, polyfenoly atd. Hrají tedy nejen důležitou úlohu v koloběhu uhlíku v přírodě a při tvorbě humusu, ale zároveň mají nezastupitelný význam v lékařství, průmyslu a zemědělství, jelikož jsou významnými producenty široké škály sekundárních metabolitů; včetně herbicidů, klinicky používaných antibiotik, látek antihelmintického

a antifungálního charakteru, látek s protinádorovým účinkem a látek imunopresní povahy (Bibb, 1996; Challis a Hopwood, 2003).

Nejlépe prostudovanými druhy streptomycet jsou *S. coelicolor* a *S. griseus*.



**Obr. 2-3: Streptomycety.** a) Typická morfologie a produkce různých sekundárních metabolitů bakterie rodu *Streptomyces*. b) Kolonie *Streptomyces coelicolor* produkující modrý pigment aktinorodin (Thompson *et al.*, 2002). c) Snímek z elektronového mikroskopu – diference bakterie rodu *Streptomyces* (převzato z <http://www.sciencephoto.com>).

### 2.2.1 Genetická výbava streptomycet

Chromozom streptomycet je lineární a je ohraničen terminálními invertovanými repeticemi (TIRs). V centrální části chromozomu se nachází replikační počátek (*oriC*), z něhož probíhá obousměrná replikace, která je na diskontinuálním řetězci dokončena pomocí proteinů navázaných na 5'-koncích chromozomu, které slouží jako očka při syntéze posledního Okazakiho fragmentu na chromozomálním opožďujícím se řetězci (Bao a Cohen, 2001; Volf a Altenbuchner, 1998).

Chromozom je rozdělen na dvě části: centrální jádro, které je konzervované a nese především esenciální geny, a dvě koncová ramena, která nesou geny většinou postradatelné pro život bakterie za běžných podmínek. Přestože se obě ramena vyznačují velkou nestabilitou a mohou podléhat rozsáhlým delecím a amplifikacím (Birch *et al.*, 1989; Hausler *et al.*, 1989; Leblond *et al.*, 1991), není tím často vůbec poznamenána životaschopnost streptomycet v laboratorních podmínkách.

Zatím byla určena kompletní sekvence u šesti různých streptomycet – *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003), *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008), *S. scabies* (nepublikováno, uveřejněno ve StrepDB databázi), *S. bingchenggensis* (Wang *et al.*, 2010) a pracovní verze *S. clavuligerus* (Song *et al.*, 2010).

Dosud pravděpodobně největší bakteriální genom se známou kompletní sekvencí je poslední zmiňovaný genom *S. bingchenggensis*, který má velikost 11,9 Mb a nese 10 023 pravděpodobných sekvencí kódujících proteiny.

Genom *S. coelicolor* A3(2) o velikosti 8,7 Mb nese celkem 7 825 potenciálních genů zahrnujících více než 20 genových shluků kódujících známé či potenciální sekundární metabolity. Genom obsahuje nebývalé množství regulačních genů, a to hlavně těch, které se pravděpodobně účastní odpovědi na extracelulární stimuly a stres. Nachází se zde mnoho duplikovaných genů, které představují tzv. „tkáňové izoformy“ operující v různých fázích vývoje kolonie (Bentley *et al.*, 2002).

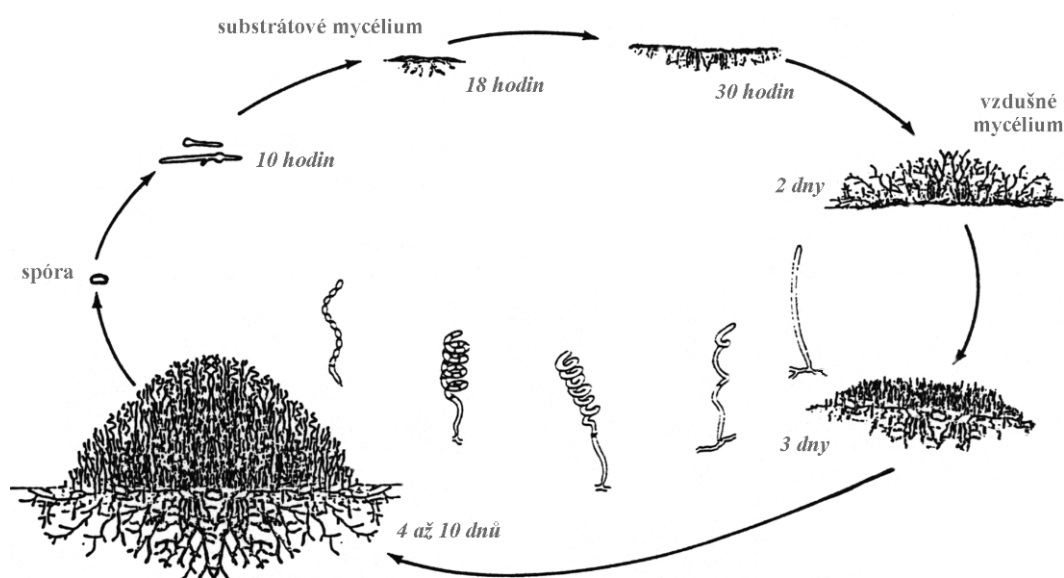
Streptomycety mohou navíc obsahovat kromě chromozomální DNA také různé extrachromozomální genetické elementy. Například *S. coelicolor* jich má hned několik. Kromě přinejmenším dvou inzerčních sekvencí IS 110 a IS 177 (Chater a Hopwood, 1993) *S. coelicolor* obsahuje obří lineární plasmid SCP1 o velikosti 350 kb (Kinashi a Shimaji-Murayama, 1991), který nese geny pro produkci antibiotika methylenomycinu (Kirby a Hopwood, 1977) a integrativní element SLP1, který je za normálních podmínek stabilní součástí chromozomu, ale za vhodných podmínek je schopen excize, konjugace a autonomní replikace v jiných streptomycetách (Bibb *et al.*, 1981; Brasch a Cohen, 1993; Omer a Cohen, 1984). Součástí genetické výbavy *S. coelicolor* je také konvenční kruhový plasmid SCP2 (Bibb *et al.*, 1977); Bibb a Hopwood, 1981).

### 2.2.2 Životní cyklus streptomycet

Životní cyklus streptomycet začíná klíčením exospór, které jako odpověď na signály z vnějšího prostředí spouští influx vody do buňky, což způsobuje zvětšení objemu a ztrátu světlostnosti následované vznikem primární hyfy (Ensign, 1978) (obr. 2-4). Další elongace naklíčených spór probíhá inkorporací komponent buněčné stěny ve vrcholcích hyf, kde dochází k příležitostnému větvení, čímž se postupně generuje hustá síť dlouhých vzájemně propojených vláken označovaná jako vegetativní mycélium. Na rozdíl od jednobuněčných bakterií, kde je segregace chromozomu následována buněčným dělením,

streptomycetové hyfy zůstávají propojeny v několikajaderné buňky, které jsou pouze nepravidelně oddělovány neúplnými septy (Allan a Prosser, 1985; Kretschmer, 1982).

Na konci vývoje substrátového mycélia nastává přechodné pozastavení nárůstu biomasy a dokonce dochází i k jejímu přechodnému snížení (tzv. přechodná fáze, z angl. transition phase). A právě v této fázi dochází k počáteční fyziologické diferenciaci (Granozzi *et al.*, 1990; Susstrunk *et al.*, 1998) a zároveň se začíná tvořit vzdušné mycélium. V nejsvrchnější vrstvě substrátového mycélia se vytváří síť z ukládaného glykogenu (tzv. fáze ukládání I.), a to na místech, kde dojde k formování vzdušného mycélia (Chater, 1998).



Obr. 2-4: Životní cyklus *Streptomyces coelicolor* (převzato z Schauer *et al.*, 1988).

Vzdušné mycélium se začíná vytvářet při poklesu koncentrace živin v okolním prostředí. Podobně jako pro klíčení spór není také dosud znám signál pro zahájení tvorby vzdušného mycélia. Hyfy vzdušného mycélia, které uděluje koloniím typický bílý a chlupatý vzhled, jsou tenčí než vlákna substrátového mycélia. Vzdušné mycélium, stejně jako substrátové mycélium, roste prodlužováním buněčné stěny ve vrcholcích hyf tvořených několikajadernými buňkami. Na rozdíl od substrátového mycélia se nevětví a začíná tvořit spirálovitě stočené hyfy. Formování vzdušného mycélia, podobně jako klíčení spór, zahrnuje influx vody do buněk za účelem vytvoření dostatečného intracelulárního tlaku k vzpřímení mycélia ze substrátu do vzdušného prostředí. Toho může být dosaženo degradací polymerů, jako jsou např. lipidy, polyfosfáty či glykogen, čímž se zvýší koncentrace osmoticky aktivních látek (Chater, 1998). Tyto látky mohou být využity také jako živiny pro diferenciaci vzdušného mycélia. Jako další zdroj živin a energie slouží

samotné substrátové mycélium, které při vývoji vzdušného mycélia lyzuje zejména ve vnitřní části kolonie. Tento jev je označován jako kanibalismus substrátových hyf a v souvislosti s ním se někdy používá i pojem programované buněčné smrti.

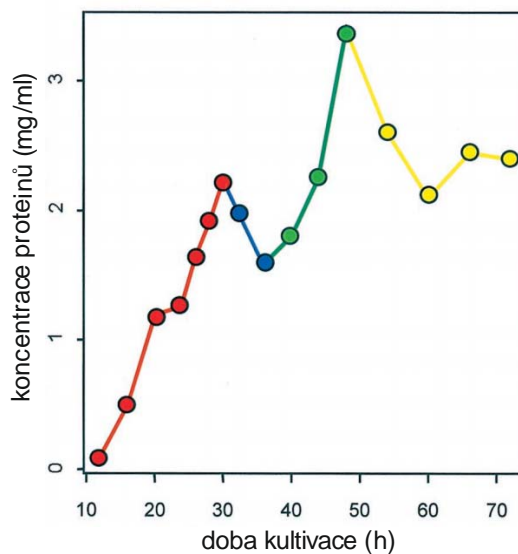
Pro vzpřímení hyf, a tím vytvoření vzdušného mycélia, je navíc zapotřebí zvláštních amfipatických molekul (např. AmfS u *S. griseus*; SapB a chapliny u *S. coelicolor* a streptofactin u *S. tendae*), které působí jako povrchově aktivní látky (snižují povrchové napětí) a umožňují překonání povrchového napětí mezi substrátem a vzduchem. Usnadňují tak uvolnění vzdušných hyf ze substrátového mycélia do vzduchu (Talbot, 2003; Tillotson *et al.*, 1998; Wosten a Willey, 2000). Zdá se, že tyto povrchově aktivní látky plní funkci spíše strukturní, než že by fungovaly jako signální molekuly mezibuněčné komunikace během morfogeneze.

Současně s formováním vzdušného mycélia probíhá syntéza sekundárních metabolitů v substrátovém mycéliu. Stejně jako buněčný kanibalismus probíhá syntéza sekundárních metabolitů až na výjimky (např. šedý spórový pigment) v substrátovém mycéliu.

V následující fázi vývoje, zvané sporulace, nastává ukončení růstu a na vrcholcích zralých hyf vzdušného mycélia, které se spirálovitě stácejí, dochází k tvorbě řetízků jednojaderných exospór navzájem oddělených pravidelnými septy. Tento proces je iniciován řádnou segregací haploidních chromozomů v pravidelných intervalech uvnitř vlákn. Následuje oddělení těchto cytoplazmatických oblastí do jednojaderných kompartmentů prostřednictvím synchronní tvorby přepážek zprostředkované proteinem buněčného dělení FtsZ, který vytváří svou polymerací strukturu připomínající žebřík (Schwedock *et al.*, 1997). Během tvorby sept při sporulaci dochází k přechodnému ukládání glykogenu (tzv. fáze ukládání II) ve vrcholcích vzdušných hyf, který slouží jako náhradní zdroj energie v průběhu maturace spór a také jako prekurzor pro ukládání trehalózy, která uděluje zralým spórám odolnost vůči osmotickému tlaku a dodává jim energii a zdroj uhlíku během klíčení. V pozdní fázi sporulace je dozrávání spór (maturace) ukončeno zesílením buněčné stěny prespór a syntézou typického šedého polyketidového spórového pigmentu. Výsledkem sporulace jsou vlákna vzdušného mycélia zakončená spirálovitě stočenými řetízky spór. Na závěr životního cyklu se spóry z vláken uvolňují do prostředí a celý cyklus se tak může opakovat. Jejich šíření v přírodě je pravděpodobně usnadňováno díky několika hydrofobním vrstvám pokrývajícím povrch spór (Wildermuth *et al.*, 1971). Na rozdíl od endospór bakterie *Bacillus subtilis*, spóry streptomycet nejsou rezistentní k vysokým

teplotám, UV záření ani k chemickým sloučeninám. Ve skutečnosti odolávají pouze vysušení a fyzikálním vlivům (Ensign, 1978).

Výše popsaný životní cyklus se týká výhradně kultivace na pevných půdách. V tekutém médiu jsou ve skutečnosti streptomycety podrobeny odlišnému vývojovému programu. Přestože nedochází k diferenciaci vzdušného mycélia a u některých druhů, jako např. *S. coelicolor*, ani ke sporulaci, je pro tekutou kulturu charakteristická diauxická růstová křivka, která je rozdělena do čtyř vývojových fází (obr. 2-5). Podobná růstová kinetika byla pozorována i na pevných půdách (Granozzi *et al.*, 1990). Po počáteční fázi rychlého růstu RG1 (Rapid Growth), která odpovídá vegetativnímu mycéliu na pevných půdách, dochází k přechodnému zpomalení růstu označovanému jako T-fáze (transition phase). Dále následuje druhá fáze rychlého růstu RG2, která koresponduje s tvorbou vzdušného mycélia, a nakonec stacionární fáze (S fáze) odpovídající sporulaci na agarovém médiu (Puglia *et al.*, 1995; Vohradsky *et al.*, 2000). T-fáze představuje jak u kultur pěstovaných v tekutém, tak i pevném médiu klíčový kontrolní bod diferenciaci. Je spojen s aktivací syntézy antibiotik a se stringentní odpovědí (Holt *et al.*, 1992).



**Obr. 2-5: Vývojové fáze *S. coelicolor* J1501 – kultivace v tekutém minimálním médiu.** Červená znázorňuje RG1 fázi; modrá přechodnou T fázi; zelená RG2 fázi a žlutá stacionární S fázi (převzato z Vohradsky *et al.*, 2000).

### 2.2.3 Regulace biosyntézy antibiotik u streptomycet

Sekundární metabolismus u *S. coelicolor* je ovlivněn různými regulačními systémy, jako jsou geny *bld* (Chater, 1993), ppGpp (Chakraborty a Bibb, 1997; Kang *et al.*, 1998;



Martinez-Costa *et al.*, 1996), dvousložkové regulační systémy (Adamidis *et al.*, 1990; Hutchings *et al.*, 2004; Ishizuka *et al.*, 1992),  $\gamma$ -butyrolaktony (Horinouchi a Beppu, 1994; Onaka *et al.*, 1998; Takano *et al.*, 2001), cAMP (Horinouchi *et al.*, 2001; Susstrunk *et al.*, 1998) a systémem AfsK/AfsR (Horinouchi, 2003). Tyto systémy vnímají přítomnost živin v prostředí, jako jsou uhlík, dusík a fosfát a fyzikální podmínky prostředí, např. teplota, osmolarita a různé druhy stresů. Některé impulzy zaznamenané těmito regulačními systémy způsobují prostřednictvím příslušných signalizačních drah aktivaci exprese specifických transkripčních regulátorů (např. *actII-ORF4* nebo *redD*), což má za následek produkci antibiotik.

### 2.2.3.1 Geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů uspořádané do genových shluků a jejich regulace

Jak bylo zmíněno výše, streptomycety jsou významným producentem sekundárních metabolitů, a to zejména antibiotik, které tvoří 70–80 % produkce aktinomycet (tj. více než dvě třetiny současně dostupných preparátů) (Challis a Hopwood, 2003). Sekundární metabolity jsou syntetizovány kondenzační reakcí z acyl-CoA či z aminokyselinových derivátů prostřednictvím dvou rodin enzymů, polyketidsyntáz (polyketide synthases, PKS) a syntáz provádějících neribozomální syntézu antibiotik polypeptidového charakteru (non-ribosomal peptide synthases, NRPS). Obdobně jako většina streptomycet, *S. coelicolor* produkuje různé sekundární metabolity: např. červený pigment tripyrrol undecylprodigiosin (RED), modrý pigment aktinorodin (Act), lipopeptid kalcium-dependentní antibiotikum (CDA) (Hopwood *et al.*, 1995), methylenomycin (Wright a Hopwood, 1976), methylisoborneol (Wang a Cane, 2008), geosmin (Jiang *et al.*, 2007), albaflavenon (Zhao *et al.*, 2008), karotenoidy (Takano *et al.*, 2005b) a nedávno objevené sekundární metabolity kódované genovým shlukem *cpk* – žlutý pigment yCPK (z angl. yellow coelicolor polyketide) a sloučenina s antimikrobiální aktivitou abCPK (z angl. antibiotic coelicolor polyketide) (Gottelt *et al.*, 2010; Pawlik *et al.*, 2010). Určení kompletní genomové sekvence *S. coelicolor* umožnilo predikci přibližně dalších dvaceti genových shluků kódujících sekundární metabolity, včetně sideroforů, hopanoidů, butyrolaktonů, terpenových sloučenin a dalších (Bentley *et al.*, 2002). Geny pro syntézu sekundárních metabolitů jsou typicky koregulovány a na chromozomu uspořádány do souvislých genových shluků (Hopwood *et al.*, 1995). Kromě genů zajišťujících syntézu sekundárních metabolitů (antibiotik) kódují tyto genové shluky enzymy zodpovědné za rezistenci vůči antibiotikům a dále specifické

transkripční regulátory (SARPs, Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins), které přímo aktivují transkripci biosyntetických genů příslušného genového shluku (Bibb, 1996; Hopwood *et al.*, 1995). U *S. coelicolor* je známo pět specifických transkripčních regulátorů: *actII-ORF4* pro syntézu aktinorodinu (Arias *et al.*, 1999; Fernandez-Moreno *et al.*, 1991), *redD* and *redZ* pro produkci undecylprodigiosinu (Takano *et al.*, 1992; White a Bibb, 1997), *cdaR* pro syntézu kalcium-dependentního antibiotika (Ryding *et al.*, 2002) a *cpkO* (*kasO*) pro syntézu žlutého polyketidového pigmentu yCPK a sloučeniny s antimikrobiální aktivitou abCPK (Gottelt *et al.*, 2010; Pawlik *et al.*, 2010).

Dřívější studie prokázaly, že aktivace produkce antibiotik je odpovědí na specifický enviromentální a fyziologický signál a na molekulární úrovni k ní dochází až po dosažení prahové hladiny specifických transkripčních aktivátorů v buňce. Kromě toho zvýšená hladina řady regulačních genů situovaných převážně mimo biosyntetický genový shluk (např. geny *cya*, *bld*) vykazuje pleiotropní regulační účinky na hromadnou produkci vícero sekundárních metabolitů a i na morfologickou diferenciaci (Huang *et al.*, 2005; Susstrunk *et al.*, 1998; Viollier *et al.*, 2001)). Aktivace biosyntézy antibiotik je závislá na růstové fázi bakterie a odpovídá počátku tvorby vzdušného mycélia při kultivaci na agarové misce a stacionární fázi při kultivaci v tekutém médiu (Hopwood *et al.*, 1995).

### 2.2.3.2 Sekundární poslové – cAMP a ppGpp

Stres způsobený nedostatkem živin a buněčnou denzitou může vést k nahromadění sekundárních poslů jako jsou cyklický adenosin monofosfát (cAMP), guanosintetrafosfát (ppGpp) a  $\gamma$ -butyrolaktony, které aktivují sekundární metabolismus.

Regulační úloha cAMP v biosyntéze antibiotik byla navržena díky pozorování, že kmen s deleční mutací v genu *cya* u *S. coelicolor* kódující adenylát cyklázu (enzym katalyzující syntézu cAMP) byl, kromě zpomalení klíčení spór, defektní v produkci aktinorodinu (Act). Dále bylo zjištěno, že syntéza Act může být indukována vyššími koncentracemi cAMP (20  $\mu$ M), které se běžně nacházejí v médiu kultur divokého typu. cAMP by tak mohlo sloužit jako difuzibilní signální molekula k přepínání primárního metabolismu na sekundární (Susstrunk *et al.*, 1998). Fenotyp popsaný pro mutaci v genu *cya* byl v souladu s pozorováním fenotypového projevu mutantního kmene v genu *crp*, který kóduje gen pro cAMP receptorový protein u *S. coelicolor*. Mutantní kmen *crp* se projevuje defektem v produkci Act, zpomalením klíčení spór, zpomalením růstu a předčasnou

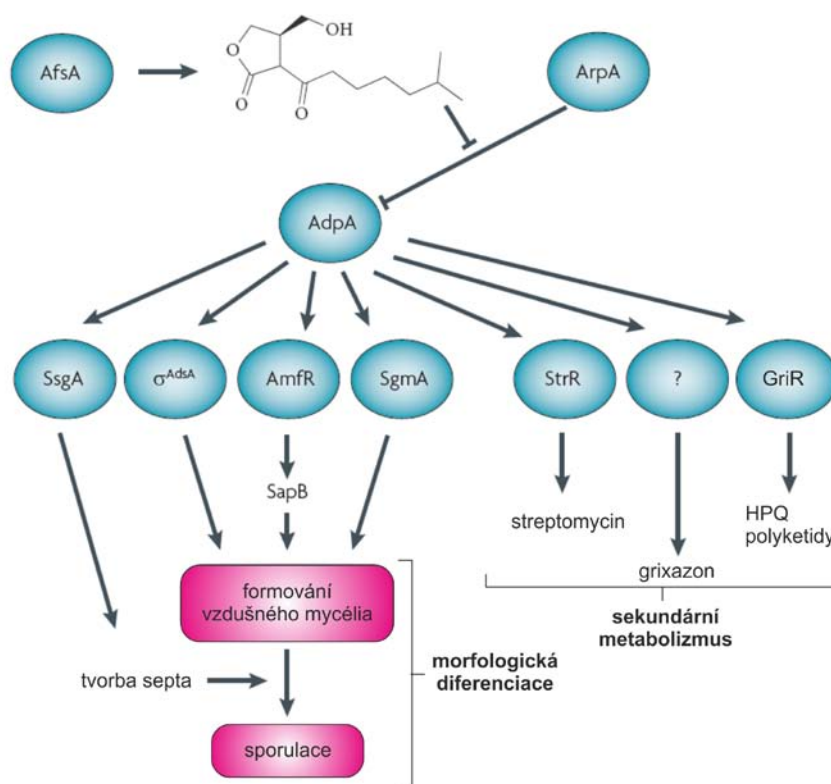
sporulací. Tato zjištění nasvědčují tomu, že systém Cya-cAMP-CRP by mohl u *S. coelicolor* spouštět fyziologické procesy, jako je morfogeneze (Derouaux *et al.*, 2004).

Kromě cAMP je biosyntéza antibiotik také spojena s intracelulární koncentrací buněčného alarmonu guanosintetrafosfátu ppGpp (Hesketh *et al.*, 2001; Ochi, 1987) syntetizovaného ribozomálně vázaným enzymem RelA v odpovědi na vazbu nenabitě tRNA na translatující ribozom. Při hladovění na dusík dochází tedy k akumulaci ppGpp v buňce, který spouští tzv. stringentní odpověď buňky. Mutanty *relA*<sup>-</sup> *S. coelicolor* během hladovění na dusík neprodukuje antibiotika a mají opožděný přechod k diferenciaci (Chakraborty a Bibb, 1997; Kang *et al.*, 1998). Vliv ppGpp na morfologickou diferenciaci je pravděpodobně nepřímý a spíše je důsledkem snížení hladiny GTP v buňce (viz kap. 2.2.4.4) (Kelemen a Buttner, 1998; Ochi, 1986; Ochi, 1987). Naopak nadprodukce genu *relA* ve *S. coelicolor* a následné zvýšení koncentrace ppGpp vede k indukci transkripce specifických transkripčních regulátorů *actIII-ORF4* aktinorodinové biosyntetické dráhy a *redD* undecylprodigiosinové biosyntetické dráhy (Hesketh *et al.*, 2001).

### 2.2.3.3 Nízkomolekulární autoregulátory – $\gamma$ -butyrolaktony a ostatní

Další signální molekuly hrající důležitou úlohu v iniciaci produkce antibiotik jsou  $\gamma$ -butyrolaktony (Horinouchi a Beppu, 1994), někdy také označované za mikrobiální hormony. Jedná se o autoregulátory s nízkou molekulární vahou účinné v extrémně nízkých koncentracích ( $10^{-9}$  M), které jsou spouštěcím signálem quorum sensingu streptomycet. Nejlépe prostudovaným  $\gamma$ -butyrolaktonem aktivujícím produkci streptomycinu a tvorbu vzdušného mycélia u *S. griseus* je A-faktor (obr. 2-6). Byl objeven jako extracelulární substance, která způsobila sporulaci mutantního kmene *bld* *S. griseus* neschopného diferenciaci (Khokhlov *et al.*, 1967). A-faktor je syntetizován z  $\beta$ -ketokyseliny a derivátu glycerolu, a za jeho syntézu je zodpovědný gen *afsA* (Horinouchi *et al.*, 1989). Hromadí se v médiu před začátkem syntézy streptomycinu. Po dosažení prahové koncentrace A-faktor difunduje volně přes cytoplazmatickou membránu a váže se s vysokou afinitou k cytoplazmatickému receptorovému proteinu ArpA (A-factor receptor protein) (Onaka *et al.*, 1995), který je navázaný na promotor *adpA* a inhibuje tím transkripci genu *adpA*. Vazbou A-faktoru na proteinový represor ArpA dochází k disociaci ArpA z promotoru *adpA* a aktivaci transkripce genu *adpA*. Protein AdpA funguje jednak jako autoregulátor reprimující vlastní transkripci (Kato *et al.*, 2005) a jednak jako pleiotropní regulátor aktivující regulon AdpA (Ohnishi *et al.*, 2005), který obsahuje geny účastnící se

sekundárního metabolismu (např. gen *strR* - specifický transkripční regulátor streptomycinového genového shluku) a morfologické diference (např. *amfR*, obr. 2-6) (Ohnishi *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2005). Součástí regulonu AdpA je také několik genů kódujících proteázy a inhibitory proteáz (Kim *et al.*, 2005a; Ohnishi *et al.*, 2005). Zdá se pravděpodobné, že jedním z hlavních způsobů jak AdpA ovlivňuje diferenciaci u *S. griseus* je prostřednictvím extracelulárních interakcí mezi proteázami a příslušnými inhibitory proteáz (Chater, 2006). Mnoho streptomycet produkuje extracelulární proteázy trypsinového typu (trypsin-like proteases), jejichž aktivita je řízena vazbou a zpětným uvolněním proteinového inhibitoru. V některých případech bylo zjištěno, že proteolýzou inhibitorů vázaných na proteázách trypsinového typu jinými proteázami dochází k aktivaci proteáz trypsinového typu, které se podílejí na aktivaci diference (Kim a Lee, 1995). Takto aktivované proteázy trypsinového typu způsobují degradaci proteinů substrátového mycélia, které tak může sloužit jako zdroj živin pro růst vzdušného mycélia (Manteca *et al.*, 2006).



**Obr. 2-6: A-faktor signální kaskáda u *S. griseus* spouští morfologickou diferenciaci i sekundární metabolismus.** Hlavní transkripční aktivátor této dráhy je protein AdpA, jehož exprese je během vegetativního růstu blokována A-faktor receptorovým proteinem ArpA, který funguje jako represor. Akumulací A-faktoru v médiu dochází k derepresi transkripce *adpA* a následné aktivaci regulonu AdpA, který zahrnuje geny kódující klíčové proteiny morfologické diference ( $\sigma^{AdSA}$  nezbytný pro formování vzdušného mycélia, SsgA - esenciální pro tvorbu sept při sporulaci, AmfR - transkripční regulátor aktivující expresi biosyntetického operonu SapB, SgmA - zinek obsahující metalopeptidáza přispívající k degradaci substrátového mycélia za účelem použití získaných živin při tvorbě vzdušného mycélia) a také sekundárního metabolismu (StrR - specifický transkripční aktivátor genového shluku pro biosyntézu streptomycinu a pravděpodobně také proteiny řídící syntézu grixazonu a hexahydroperylenequinon (HPQ) polyketidu (Flärth a Buttenr, 2009).

U různých druhů streptomycet se vyskytují různé druhy molekul s podobnou funkcí, z nichž byla jen malá část blíže charakterizována. Například u *S. coelicolor* byl identifikován gen *scbA* (homolog genu *afsA*) (Hsiao *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2007), jehož produktem je enzym zodpovědný pravděpodobně za syntézu  $\gamma$ -butyrolaktonů SCB1, SCB2, SCB3 (Hsiao *et al.*, 2009) a gen *scbR* kódující  $\gamma$ -butyrolaktonový receptorový protein (homolog genu *arpA*). Mutantní kmen *scbA* neprodukuje žádné endogenní  $\gamma$ -butyrolaktony a nadprodukuje antibiotika Act a RED, zatímco mutant *scbR* také neprodukuje  $\gamma$ -butyrolaktony, ale produkce RED je u něj naopak snižena. Tyto fenotypové projevy se překvapivě značně odlišují od fenotypu mutantních kmenů s mutací v genech kódujících komponenty A-faktoru systému u *S. griseus* (Takano *et al.*, 2001). Dále bylo zjištěno, že protein ScbR reguluje produkci antibiotik prostřednictvím represe vlastní transkripce a prostřednictvím represe specifického transkripčního regulátoru *cpkO* (*kasO*) pro genový shluk *cpk* (Pawlik *et al.*, 2007; Takano *et al.*, 2005a). Přítomnost  $\gamma$ -butyrolaktonů zruší represní účinek ScbR a způsobí tím aktivaci cílových genů. U *S. coelicolor* byl navíc identifikován gen *scbR2*, homolog genu *scbR*, na který se ovšem neváže endogenní  $\gamma$ -butyrolakton SCB1, a proto je nazýván „pseudo“  $\gamma$ -butyrolaktonový receptor. ScbR2 může vázat jako ligandy endogenní antibiotika Act a RED, což vede k aktivaci KasO, specifického transkripčního regulátoru genového shluku *cpk* (Xu *et al.*, 2010a).

Kromě genu *scbR* se u *S. coelicolor* nachází minimálně ještě další dva homologní geny genu pro  $\gamma$ -butyrolaktonový receptorový protein *arpA*: *cprA* a *cprB* (Onaka *et al.*, 1998). Mutace v genu *cprA* způsobuje snížení produkce Act a RED a zpomaluje sporulaci, zatímco mutace v genu *cprB* vyvolává nadprodukcí Act a urychluje sporulaci, což znamená, že CprB funguje jako negativní regulátor (stejně jako ArpA) a CprA jako pozitivní regulátor (Onaka *et al.*, 1998).

Kromě popsaných  $\gamma$ -butyrolaktonů byly objeveny další autoregulační faktory. Byla popsána nová skupina autoregulatorů vycházejících z furanového jádra, které se podílejí na regulaci biosyntézy methylenomycinu (Corre *et al.*, 2008). Dalším autoregulatorem je faktor P1 (2,3-diamino-2,3-bis(hydroxymethyl)-1,4-butandiol), který aktivuje biosyntézu pimaricinu v mutantních kmenech *S. natalensis* s inhibovanou produkcí pimaricinu (Recio *et al.*, 2004).

### 2.2.3.4 Autoregulační faktory peptidového charakteru

Kromě  $\gamma$ -butyrolaktonových signálů se v mezibuněčné signalizaci používají také signály oligopeptidové. Existence takovéto signální molekuly u *S. coelicolor* označené jako „signál 1“, která je zřejmě produktem genu *bldJ*, bude zmíněna později v souvislosti s oligopeptid permeázou kódovanou genem *bldK* (viz kap. 2.2.4.1).

### 2.2.3.5 Dvousložkové fosforylační systémy a s nimi související dráhy

Další regulační dráhy, které se uplatňují při regulaci produkce antibiotik, jsou dvousložkové fosforylační systémy. Dvousložkový systém obecně slouží k přenosu signálu a skládá se ze sensorové proteinkinázy a transkripčního regulátoru. Sensorová proteinkináza se autofosforyluje na histidinovém zbytku a předává fosfátovou skupinu na aspartátový zbytek transkripčního regulátoru, který zprostředkuje přenos vstupního signálu.

První dvousložkový systém identifikovaný u streptomycet byl systém CutRS. U mutantních kmenů s disrupcí v genech *cutR* a *cutS* u *S. lividans* došlo ke zvýšení produkce Act na pevném i v tekutém médiu, zatímco zvýšená exprese těchto genů u *S. coelicolor* způsobila represi biosyntézy Act (Hutchings *et al.*, 2004).

U *S. coelicolor* byly izolovány mutanty *abs*, u nichž byla zcela potlačena biosyntéza aktinorodinu, undecylprodigosinu, methylenomycinu a kalcium-dependentního antibiotika (Adamidis *et al.*, 1990). Jednalo se o bodové mutace lokalizované v genu pro sensorovou kinázu *absA1*, jejichž fenotyp naznačoval, že mutace vede ke konstitutivní fosforylaci transkripčního regulátoru AbsA2 a tím k inhibici produkce antibiotik. Delece v genech *absA1* a *absA2* způsobila opačný efekt – nadprodukcí Act a RED (Brian *et al.*, 1996; Hutchings *et al.*, 2004), zatímco nadprodukce obou genů vedla k represi produkce antibiotik (Hutchings *et al.*, 2004). Fosforylovaný protein AbsA2 slouží tedy jako represor produkce antibiotik (Sheeler *et al.*, 2005), a to přímým ovlivněním exprese specifických transkripčních regulátorů genových shluků pro jejich syntézu (McKenzie a Nodwell, 2007).

Podobně také gen *absB* ovlivňuje produkci antibiotik u *S. coelicolor*, konkrétně kmen s mutací v genu *absB* je defektní v produkci antibiotik (Adamidis a Champness, 1992). Protein AbsB je endoribonukleáza patřící do rodiny RNáz typu III (Chang *et al.*, 2005; Gravenbeek a Jones, 2008; Price *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2008b), které rozpoznávají dvouřetězcové segmenty tzv. stem-loop struktury a zajišťují sestřih pre-rRNA, tRNA a polycistronní mRNA (Conrad and Rauhut, 2002; Drider a Condon, 2004), což je v souladu

s pozorováním, že u kmenů nesoucích bodovou mutaci se změnou smyslu v genu *absB* dochází k akumulaci prekurzoru 30S rRNA (Price *et al.*, 1999). Analýza genové exprese prokázala, že mutace v genu *absB* způsobila snížení exprese genů specifických regulačních aktivátorů pro biosyntézu antibiotik (např. *redD*, *cdaR*, *actII-ORF4* a *redZ*) a zvýšenou expresi sporulačních genů (Huang *et al.*, 2005). Zvýšená hladina mRNA sporulačních genů v mutantním kmeni *absB* znamená, že by mRNA těchto genů mohla být cílovým místem ribonukleolytického štěpení enzymem AbsB. Nedávno bylo zjištěno, že AbsB reguluje geny související s morfologickou diferenciací prostřednictvím endonukleolytického štěpení mRNA kódující transkripční faktor  $AdpA_c$  (nebo-li BldH) regulující morfologickou diferenciací (Xu *et al.*, 2010b).

Dalším příkladem dvousložkového fosforylačního systému, který se podílí na regulaci produkce antibiotik, je systém AfsQ1-Q2-SigQ *S. coelicolor*. Za běžných kultivačních podmínek nemá delece genů *afsQ1* pro senzorovou proteinkinázu a *afsQ2* pro transkripční regulátor vliv ani na produkci sekundárních metabolitů ani na morfologickou diferenciaci (Ishizuka *et al.*, 1992). Pokud se jako kultivační médium použije definované minimální médium s glutamátem jako jediným zdrojem dusíku, pak u mutantního kmene *afsQ* dochází k významnému snížení produkce Act, RED, CDA (prostřednictvím regulace specifických transkripčních regulátorů *actII-ORF4*, *redD* a *cdaR* – viz kap. 2.2.3.1) a navíc k urychlení růstu vzdušného mycélia (Shu *et al.*, 2009). Delece genu *sigQ*, který je lokalizovaný před geny *afsQ1-Q2* a kóduje potenciální  $\sigma$  faktor RNA polymerázy, vede k předčasné nadprodukci antibiotik a ke zpomalení tvorby vzdušného mycélia, ovšem také pouze na minimálním médiu s glutamátem. Právě tento gen se zdá být zodpovědný za odlišný účinek AfsQ1-Q2 u *S. coelicolor* na médiu s glutamátem jako jediným zdrojem dusíku.

### 2.2.3.6 Systém AfsK/AfsR

Mezi další systémy, které se podílejí na regulaci sekundárního metabolismu u *S. coelicolor* patří systém AfsK/AfsR. Umeyama a spol. (Lee *et al.*, 2002; Umeyama *et al.*, 2002) navrhli následující model působení AfsK/AfsR systému (obr. 2-7). Aktivací dosud neznámým signálem Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu AfsK (Matsumoto *et al.*, 1994) asociované s buněčnou membránou dochází k autofosforylaci na Ser a Thr zbytcích. Signál je prostřednictvím fosforylace přenesen na globální regulátor sekundárního metabolismu AfsR. AfsR je svou N-terminální částí podobný transkripčním regulátorům

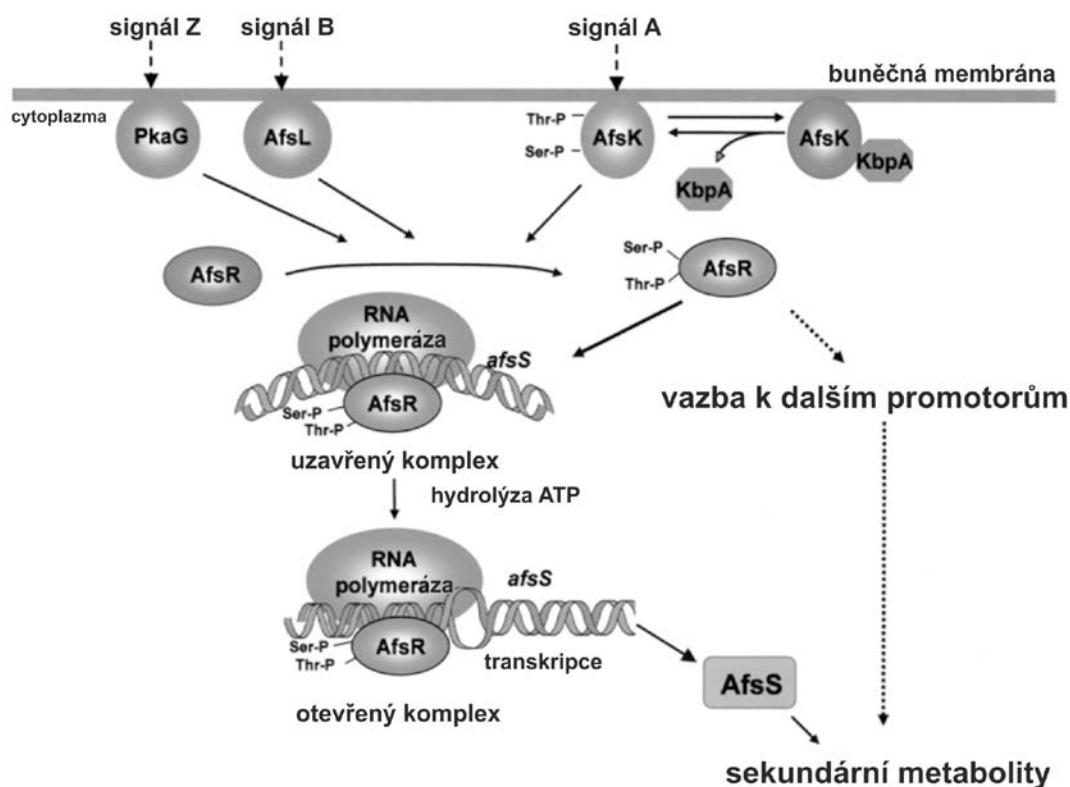
z rodiny SARP (Streptomycete Antibiotic Regulatory Proteins), kam patří i specifické transkripční aktivátory regulující produkci antibiotik, jako je např. ActII-ORF4 (Fernandez-Moreno *et al.*, 1991) a RedD (Narva a Feitelson, 1990). AfsR funguje jako transkripční regulátor, jehož fosforylací dochází ke zvýšení DNA-vazebné aktivity. Ve fosforylované formě se váže k promotoru jednoho z cílových genů *afsS*, který se podílí na regulaci Act a RED (Matsumoto *et al.*, 1995) a indukuje jeho transkripci (Lee *et al.*, 2002). Kromě DNA-vazebných vlastností má protein AfsR také ATPázovou aktivitu nezbytnou pro aktivaci transkripce cílových genů (Lee *et al.*, 2002). ATPázová aktivita AfsR zřejmě dodává energii pro přeměnu uzavřeného komplexu RNA polymeráza-AfsR na otevřený komplex umožňující iniciaci transkripce genu *afsS*. Takto indukovaný AfsS aktivuje dosud neznámým způsobem transkripci genů *actII-ORF4* a *redD*, což vede k produkci Act a RED. Protože AfsR dokáže stimulovat produkci těchto pigmentů i v nepřítomnosti AfsS, předpokládá se, že AfsR neaktivuje pouze tento jeden gen, ale také geny další.

Navíc bylo zjištěno, že globální regulátor AfsR nemusí být fosforylován pouze proteinkinázou AfsK, ale také dalšími Ser/Thr proteinkinázami: PkaG a AfsL (Sawai *et al.*, 2004).

Před genem *afsK* ve směru transkripce leží gen *kbpA*, který je důležitým regulačním prvkem systému AfsK/AfsR. *kbpA* deficientní kmen produkuje větší množství Act, zatímco nadprodukce KbpA způsobuje snížení produkce Act, což nasvědčuje tomu, že KbpA funguje jako represor biosyntézy Act (Umeyama a Horinouchi, 2001). Gen *kbpA* je přepisován během celého životního cyklu a jeho transkripce se zvyšuje v momentě začátku produkce Act a RED. KbpA přímo reaguje s katalytickou doménou nefosforylované formy AfsK, zatímco na autofosforylovanou formu se neváže. Vazbou KbpA na AfsK dochází tak k inhibici autofosforylace AfsK, a tím celého systému AfsK/AfsR. Podle těchto pozorování se lze domnívat, že produkce antibiotik je regulována mechanismem negativní zpětné vazby zajištěné proteinem KbpA (Umeyama a Horinouchi, 2001).

U *S. griseus* systém AfsK/AfsR ovlivňuje morfologickou diferenciaci, nikoliv však produkci sekundárních metabolitů. Disrupce těchto genů se projevuje neschopností tvořit vzdušné mycélium, ovšem tento fenotypový projev je závislý na koncentraci glukózy v médiu a projeví se jen tehdy, pokud je její koncentrace v médiu vyšší než 1% (Umeyama *et al.*, 1999). U *S. avermitilis* proteinkináza AfsK ovlivňuje jak produkci sekundárních metabolitů tak morfologickou diferenciaci. Mutantní kmen *afsK* je defektní ve sporulaci a v produkci melaninu a avermektinu (Rajkarnikar *et al.*, 2006).





Obr. 2-7: Hypotetické schéma regulace sekundárního metabolismu AfsK-AfsR systémem u *S. coelicolor*. Podrobnější popis modelu v textu (Lee *et al.*, 2002).

### 2.2.3.7 *bld* mutanty a produkce sekundárních metabolitů

V neposlední řadě produkci antibiotik u *S. coelicolor* ovlivňuje i většina mutací *bld* (např. v genech *bldA*, *bldC*, *bldG*, *bldH* a *bldJ*). Kromě jejich neschopnosti tvořit vzdušné mycélium nejsou také schopny produkce Act a RED (viz kap. 2.2.4.1).

## 2.2.4 Formování vzdušného mycélia

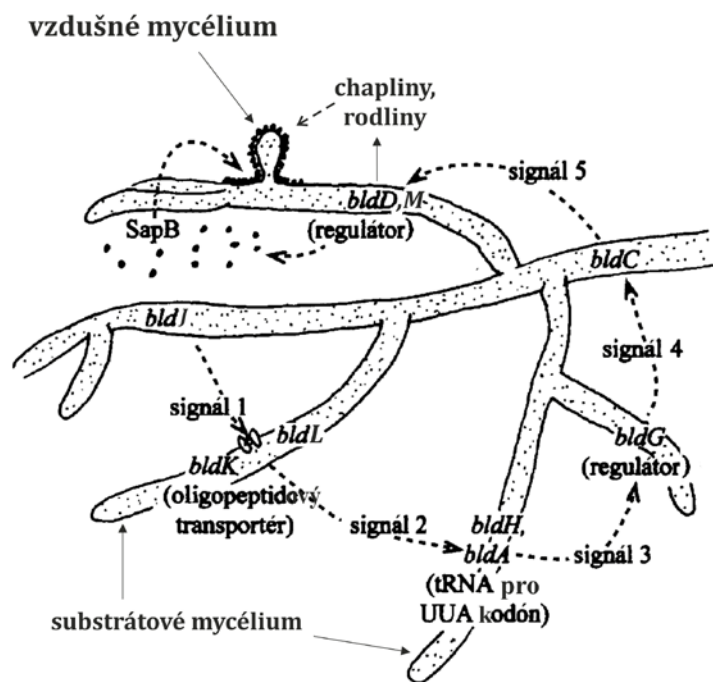
Poznatky o genetických a fyziologických faktorech zodpovědných za diferenciaci vyplývají zejména ze studia mutant, které jsou různým způsobem defektní v morfologické diferenciaci. Jedná se o několik na první pohled nesouvisejících systémů, jako jsou geny *bld*, komponenty dvousložkového fosforylačního systému (genový shluk *ram* a *rag*) či některé autoregulátory ( $\gamma$ -butyrolakton, faktor C, pamamycin a desferioxamin E).

### 2.2.4.1 *bld* mutanty a jejich uplatnění v diferenciaci

Při studiu mutantů *S. coelicolor* neschopných tvorby vzdušného mycélia a produkce antibiotik bylo identifikováno několik genů nazvaných *bld* (z angl. bald - plešatý). Mezi *bld* mutanty patří: *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldF*, *bldG*, *bldH*, *bldI*, *bldJ*, *bldK*, *bldL*, *bldM* a *bldN*. Mnoho známých genů *bld* kóduje regulační faktory s pleiotropním účinkem na morfologickou a fyziologickou diferenciaci.

Tyto mutantní kmeny nejsou schopné syntetizovat na komplexním médiu malé hydrofóbní peptidy SapB (Small associated proteins) vyskytující se na povrchu hyf vzdušného mycélia, které jsou nezbytné pro jeho vytvoření (Willey *et al.*, 1991). Přídavek purifikovaného SapB proteinu obnovuje u *bld* mutantů schopnost tvorby vzdušného mycélia, ale bez následné sporulace (Tillotson *et al.*, 1998). Jedná se o mimoribozomálně syntetizovaný protein, který je funkčním homologem hydrofobinů eukaryotických hub deuteromycet. Hydrofobin SC3 produkovaný houbou *Schizophillum commune* obnovuje formování vzdušného mycélia u *bld* mutantů *S. coelicolor* (Tillotson *et al.*, 1998). Obnovení tvorby vzdušného mycélia u *bld* mutantů u *S. coelicolor* i *S. tendae* bylo dosaženo také dalším extracelulárním hydrofobním peptidem streptofactinem objeveným u *S. tendae* (Richter *et al.*, 1998). Všechny tyto peptidy jsou povrchově aktivní látky a jako takové nemají pravěpodobně funkci signální, nýbrž strukturní. Svou akumulací na povrchu hyf udělují vláknům vzdušného mycélia hydrofobní charakter, což umožňuje jejich vzpřímení z povrchu kultivačního média do vzdušného prostředí.

Většina *bld* mutantů může být extracelulárně komplementována divokým kmenem. Pokud kolonie rostou v těsném sousedství kmene divokého typu vytváří normální vzdušné mycélium (Willey *et al.*, 1991) a na rozdíl od extracelulárního přídavku SapB k *bld* mutantům, dochází i k následné sporulaci. Na základě komplementačních pokusů byla stanovena následující hierarchie Bld proteinů: 261 (J) < K/L < A/H < G < C < D/M (Molle a Buttner, 2000; Nodwell *et al.*, 1996; Nodwell *et al.*, 1999; Willey *et al.*, 1993). To znamená, že každý mutant je tedy schopen potlačit deficit mutantu nacházejícího se v této hierarchii nalevo od něj a naopak je sám komplementován mutanty ležícími napravo. Tato hierarchie proteinů by mohla představovat mezibuněčnou signalizační kaskádu začínající u proteinu BldJ a končící u BldD (obr. 2-8).



**Obr. 2-8: Geny *bld* u *S. coelicolor* A3 (2) a jejich úloha v extracelulární signalizaci.** Schéma je založeno na modelu interakcí mezi různými *bld* mutanty, které jsou dle stanovené hierarchie schopné obnovit tvorbu vzdušného mycélia u jiných *bld* mutantů (převzato z Chater, 1998 a doplněno dle nejnovějších poznatků).

Důležitou vlastností většiny *bld* mutantů je jejich defekt v regulaci metabolismu uhlíku, což se projevuje závislostí fenotypu mutantů *bld* na zdroji uhlíku v médiu. Pope a spol. (1996) ukázali, že mutanty *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldG* a *bldH* se vyznačují konstitutivní, tj. galaktózo-nezávislou a glukózo-senzitivní expresí galaktózového operonu. Za normálních okolností se tento operon vyznačuje inducibilní expresí, která je řízena mechanismem katabolické represe. Příčinou plešatého fenotypu těchto mutantů na minimálním médiu s glukózou je jejich neschopnost reagovat na hladovění, a proto lokusy *bld* přímo nezodpovídají za diferenciaci (Pope *et al.*, 1996). Tuto hypotézu, že fenotyp *bld* může být důsledkem poškození primárního metabolismu, dále podporuje následující zjištění. Během exponenciálního růstu *S. coelicolor* produkuje do prostředí organické kyseliny, které jsou v průběhu formování vzdušného mycélia resorbovány, čímž se prostředí zpětně neutralizuje. Naopak kmen s mutací v genu pro adenylát cyklázu (viz kap. 2.2.3.2) nebyl schopen neutralizace média a ani diferenciace ve vzdušné mycélium. Tento efekt byl potlačen přidáním cAMP či pufováním média (Susstrunk *et al.*, 1998).

Ačkoliv mnoho *bld* mutantů bylo izolováno již před asi 20 lety, pouze malá část jich byla studována na molekulární úrovni. Většina z nich byla charakterizována u *S. coelicolor*. Jedním z nich je kmen s mutací v genu *bldA* kódující tRNA schopnou účinně číst leucinový UUA kodón, jehož přítomnost je u streptomycet vzácná a který byl nalezen především

v genech ovlivňujících sekundární metabolismus a morfogenezi (Leskiw *et al.*, 1991). Exprese genu *bldA* je konstitutivní, ale na počátku diferenciaci se zvyšuje. Hladina této <sup>Leu</sup>tRNA ovšem není regulována na úrovni transkripce, ale na úrovni posttranskripční modifikace jejího 5'-konce, která je v průběhu časných vývojových fázích neúčinná (Leskiw *et al.*, 1993). Gen *bldA* zřejmě představuje translační regulátor exprese genů obsahujících ve své sekvenci vzácný TTA kodón, který by jim umožnil translaci až v určitém stádiu vývoje – a to na počátku diferenciaci (Nguyen *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2003). Těchto genů s TTA kodónem ve vlastní sekvenci ovšem není mnoho (Kelemen a Buttner, 1998; Li *et al.*, 2007). Podle kompletní sekvence genomu *S. coelicolor* bylo předpovězeno pouze 145 genů obsahujících ve své sekvenci TTA kodón (Bentley *et al.*, 2002). Např. ztráta schopnosti produkovat antibiotika Act a RED u *S. coelicolor* v *bldA* mutantním kmeni může být vysvětlena právě přítomností vzácného TTA kodónu v sekvenci genů *actII-ORF4* a *redZ*, které kódují specifické transkripční regulátory pro syntézu těchto sekundárních metabolitů. Intracelulární komplemenatce odhalila gen nezbytný pro morfologickou diferenciaci, který koresponduje s pleiotropním regulátorem *adpA<sub>c</sub>* (homolog genu *adpA* ze *S. griseus*; viz kap. 2.2.3.3) u *S. coelicolor*. Nahrazení vzácného leucinového TTA kodu v sekvenci genu *adpA<sub>c</sub>* místně řízenou mutagenezí leucinovými kodóny TTG či CTC, které se běžně vyskytují u streptomycet, způsobilo v mutantovi *bldA* obnovení tvorby vzdušného mycélia. Toto pozorování znamená, že UUA kodón v sekvenci mRNA genu *adpA<sub>c</sub>* je hlavním cílem regulační dráhy, prostřednictvím kterého *bldA* ovlivňuje morfologickou diferenciaci. Navíc pozorování, že *adpA* může komplementovat *bldH* mutantní fenotyp a gen *adpA<sub>c</sub>* klonovaný z *bldH* mutanty obsahuje v kódující sekvenci jeden guanin navíc, potvrzují skutečnost, že *adpA<sub>c</sub>* představuje mutaci vedoucí k posunu čtecího rámce genu *bldH* (Nguyen *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2003).

Kromě genů *bldA* a *bldH* byly na molekulární úrovni charakterizovány i jiné *bld* lokusy: *bldB* (Pope *et al.*, 1998), *bldD* (Elliot *et al.*, 1998) a *bldC* (Hunt *et al.*, 2005) kódující malé DNA-vazebné proteiny; *bldG* kódující anti-anti- $\sigma$  faktor (Bignell *et al.*, 2000). Ačkoliv několik *bld* lokusů kóduje produkty přímo související s genovou expresí, produkt genu *bldJ*, dříve *bld261* (Nodwell *et al.*, 1999), je malý sekretovaný peptid označovaný také jako „signál 1“, který je pravěpodobně importován do buněk pomocí BldK oligopeptidového permeázového komplexu (Nodwell *et al.*, 1996; Nodwell a Losick, 1998). Lokus *bldK* se skládá z pěti ORF, které kódují komponenty oligopeptid permeáz patřící do rodiny ABC-transportérů. Protože mutace *bldK* způsobuje rezistenci k tripeptidovému

antibiotiku bialaphos, lze usoudit, že se pravděpodobně jedná o transporter oligopeptidových látek. Nedávno bylo zjištěno, že *bldK* lokus není esenciální pro tvorbu vzdušného mycélia pouze u *S. coelicolor*, ale také u *S. griseus*. Proto se předpokládá, že přenos extracelulárního signálu v podobě příslušného peptidu přes membránu by měl být konzervován mezi různými streptomycetami (Akanuma *et al.*, 2011). Mutanty *bldK* nejsou defektní v regulaci uhlíkového metabolismu a kultivace na minimálním médiu s manitolem jako jediným zdrojem uhlíku jejich fenotypový projev z části suprimuje (Nodwell *et al.*, 1996).

Gen *bldC* kóduje malý DNA-vazebný protein, který je příbuzný transkripčním aktivátorům z rodiny MerR. Mutantní kmen s mutací v genu *bldC* je defektní v diferenciaci a produkci antibiotik. Tvoří aberantní vzdušné mycélium na minimálním agaru a na komplexním agaru dochází k opožděné tvorbě vzdušného mycélia. Gen *bldC*, který je exprimován konstitutivně během vývoje, je vyžadován pro zdárnou expresi specifických transkripčních aktivátorů sekundárních metabolitů Act a RED u *S. coelicolor* (Hunt *et al.*, 2005).

Gen *bldD* kóduje malý DNA-vazebný protein, který se nachází převážně v rozpustné formě jako homodimer (Elliot *et al.*, 2003). BldD se skládá ze dvou domén: C-terminální domény neznámé funkce a N-terminální domény, která zajišťuje vazbu na DNA a dimerizaci proteinu (Lee *et al.*, 2007). Krystalová struktura N-terminální domény odhalila podobnost s lambda represorem, transkripčním regulátorem obsahujícím helix-turn-helix DNA-vazebný motiv (Kim *et al.*, 2006). Podobně jako mutant *bldA*, mutant *bldD* se projevuje zablokováním morfologické diferenciace v časném stádiu vývoje a navíc neprodukuje žádné ze čtyř nejznámějších antibiotik (Act, RED, CDA ani methylenomicin) (Elliot *et al.*, 1998). Mutant *bldD* stojí na samotném vrcholku extracelulární komplementační hierarchie, a proto je schopen extracelulárně komplementovat všechny známé mutanty *bld* kromě sebe sama a mutantu *bldM*, který se nachází v hierarchii na stejném místě jako mutant *bldD* (Nodwell *et al.*, 1996; Willey *et al.*, 1993). Z toho lze usoudit, že by gen *bldD* mohl fungovat jako centrální regulátor pro morfologickou diferenciaci a produkci antibiotik. Exprese genu *bldD* je časově regulována. Během vegetativního růstu BldD přímo reprimuje čtyři vývojové geny vazbou na promotor a/nebo transkripční počátek; stejně tak působí jako represor vlastní transkripce (Elliot a Leskiw, 1999; Elliot *et al.*, 2001; Elliot *et al.*, 2003; Willey *et al.*, 1993). Mezi známými BldD-regulovanými geny jsou i tři geny kódující  $\sigma$  faktory. Dva z nich ( $\sigma^{\text{BldN}}$ , a  $\sigma^{\text{WhiG}}$ ) hrají

důležitou úlohu v diferenciaci streptomycet (Bibb *et al.*, 2000; Chater *et al.*, 1989; Elliot *et al.*, 2001) a třetí ( $\sigma^H$ ) zajišťuje buňkám odpověď na okolní stres (Kelemen *et al.*, 2001).

Předpokládá se, že i gen *bldB* pravděpodobně funguje také jako autoregulator transkripce a váže se na vlastní promotor, ovšem přímý experimentální důkaz zatím chybí. Hladina exprese genu *bldB* je během vegetativního růstu nízká a zvyšuje se až při vstupu do stacionární fáze. U mutant *bldB* je exprese *bldB* zřejmě deregulována, což nasvědčuje tomu, že produkt genu *bldB* se sám podílí na regulaci vlastní transkripce (Pope *et al.*, 1998). Fenotyp mutantů *bldB* je pleiotropní. Kromě poruchy v iniciaci morfologické diferenciace je zcela defektní v produkci antibiotik, v katabolizmu uhlíku a na rozdíl od ostatních mutantů *bld* nejsou mutanty *bldB* schopny obnovení původního fenotypu při kultivaci na minimálním médiu s chudým zdrojem uhlíku, jako je např. manitol (Pope *et al.*, 1996).

U obou mutantních kmenů (*bldB* a *bldD*) byl identifikován tyrozinový zbytek nezbytný pro funkci BldB a BldD proteinů, což podporuje domněnku, že fosforylací těchto tyrozinových zbytků jsou regulovány aktivity těchto proteinů. U *S. griseus* se protein fosforylovaný na tyrozinu, který má skoro stejnou molekulovou hmotnost jako bílkovina BldD, objevuje na začátku formování vzdušného mycélia. Zdá se, že tyto dvě bílkoviny jsou vzájemně homologní (Elliot *et al.*, 1998).

Podobně jako u mutantních kmenů *bldB* také u mutantů *bldG* nedochází ani k formování vzdušného mycélia (na médiu s glukózou) ani k produkci antibiotik (Champness, 1988). Gen *bldG* kóduje anti-anti- $\sigma$  faktor, který je homologem anti-anti- $\sigma$  faktoru RsbV *B. subtilis*. V sousedství genu *bldG* se nachází gen *apgA* kódující homolog anti- $\sigma$  faktoru RsbW u *B. subtilis*. Operon pro syntézu alternativního  $\sigma$  faktoru (operon SigB), jehož součástí jsou i geny *rsbV* a *rsbW*, je dobře prostudován u *B. subtilis* (Hecker *et al.*, 2007). Transkripční analýza prokázala, že oba geny (*bldG* a *apgA*) jsou přepisovány společně během růstu a jejich hladina je výrazně vyšší v průběhu tvorby vzdušného mycélia a produkce antibiotik. Navíc bylo prokázáno, že gen *bldG* se přepisuje také samostatně, a proto by produkt genu *bldG* měl být v nadbytku nad produktem genu *apgA* (Bignell *et al.*, 2000). Bignell a spol. (2003) zjistili, že reverzibilní fosforylace na konzervovaném serinovém zbytku proteinu BldG je nezbytná pro regulaci morfologické diferenciace a produkce antibiotik. Parashar a spol. (2009) prokázali vzájemnou interakci mezi anti-anti- $\sigma$  faktorem BldG a anti- $\sigma$  faktorem ApgA, což potvrzuje hypotézu, že jejich vzájemná interakce ovlivňuje regulační funkci jednoho nebo více  $\sigma$  faktorů u *S. coelicolor*. Nedávno se ukázalo, že se anti-anti- $\sigma$  faktor BldG může vázat i na další anti- $\sigma$  faktor UshX. Gen *ushX* je součástí operonu kódující mimo jiné alternativní  $\sigma^H$  faktor, který hraje

důležitou úlohu v regulaci odpovědi na osmotický stres a v regulaci morfologické diferenciaci u *S. coelicolor* (Sevcikova *et al.*, 2010). Předpokládaný model celé regulační dráhy je následující. Dosud neznámý signál monitorující osmotický stres v prostředí způsobí defosforylaci BldG prostřednictvím zatím neznámé fosfatázy, a tím dojde k jeho aktivaci a vazbě na UshX. Jejich vzájemnou interakcí dochází k uvolnění  $\sigma^H$  faktoru z UshX. Volný  $\sigma^H$  faktor se může navázat na jádro RNA polymerázy a vytvořit tak funkční holoenzym, který může začít přepisovat geny celého  $\sigma^H$  regulonu. Navíc defosforylovaný BldG interaguje s anti- $\sigma$  faktorem ApgA, což vede podobně k uvolnění dalšího BldG-specifického  $\sigma$  faktoru a tím k jeho aktivaci (Sevcikova *et al.*, 2010).

Produkt genu *bldN* je  $\sigma$  faktor ( $\sigma^{BldN}$ ) s extracytoplazmatickou funkcí. Obsahuje neobvyklou N-terminální sekvenci cca 86 aminokyselin, která u ostatních  $\sigma$  faktorů chybí.  $\sigma^{BldN}$  je syntetizován v podobě proproteinu, z kterého posttranslační modifikací (proteolytickým odštěpením neobvyklé N-terminální sekvence) vzniká maturovaný  $\sigma^{BldN}$  faktor (Bibb a Buttner, 2003). Byl objeven izolací dvou bodových mutací indukovaných prostřednictvím NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), které ovlivnily morfologickou diferenciaci u *S. coelicolor* (Bibb *et al.*, 2000; Ryding *et al.*, 1999). Deleční mutant *bldN* není schopen tvořit vzdušné mycélium (Bibb *et al.*, 2000; Kelemen a Buttner, 1998). Transkript *bldN* je během vegetativního růstu téměř nedetekovatelný, ale jeho množství se dramaticky zvyšuje během formování vzdušného mycélia; jeho exprese je tudíž vývojově regulována. Další tři *bld* lokusy se podílejí na regulaci transkripce genu *bldN*. Aktivace přepisu *bldN* závisí přímo či nepřímo na produktech genů *bldG* a *bldH* (Bibb *et al.*, 2000) a produkt genu *bldD* přímo reprimuje transkripci *bldN* vazbou na promotor *bldN* (Elliot *et al.*, 2001). Dále  $\sigma^{BldN}$  přímo aktivuje transkripci genu *bldM*, další gen nezbytný pro tvorbu vzdušného mycélia (Bibb *et al.*, 2000). U *S. griseus* byl objeven ortolog genu *bldN*, *adsA*, který je součástí signální kaskády A-faktoru a podléhá přímé aktivaci proteinem AdpA (viz kap. 2.2.3.3) (Ohnishi *et al.*, 1999).

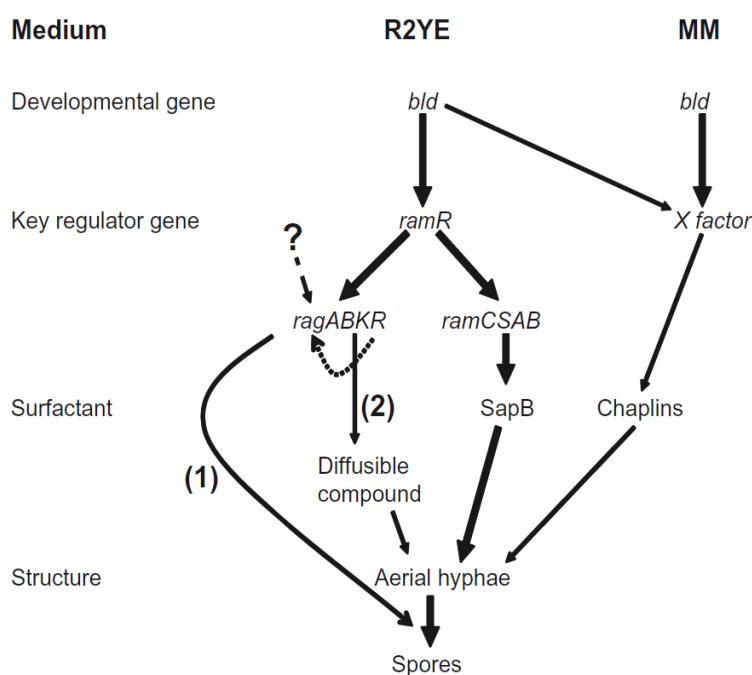
Lokus *bldM*, podobně jako lokus *bldN*, byl nejprve identifikován a označen jako lokus *whiK*. Byl definován pomocí tří bodových mutací indukovaných prostřednictvím NTG. Všechny tři mutace způsobily tvorbu bílých kolonií a vyznačovaly se různým defektem ve sporulaci (Ryding *et al.*, 1999). Proto byly nejprve označeny jako *whi* mutanty (viz kap. 2.2.6). Deleční mutant *whiK* vykazoval však překvapivě odlišný fenotyp. Nebyl schopen tvorby vzdušného mycélia, a proto byl zařazen mezi mutanty *bld* a přejmenován na lokus *bldM*. Rozdílný fenotypový projev znamená, že různé alely tohoto lokusu mohou blokovat vývoj streptomycet v odlišném stádiu vývoje. Gen *bldM* zřejmě kóduje typický

transkripční regulátor dvousložkového systému, jehož aktivita je obvykle regulována fosforylací, kterou zajišťuje příslušná sensorová proteinkináza. Transkripce genu *bldM* je přímo aktivována sigma faktorem  $\sigma^{\text{BldN}}$  (Bibb *et al.*, 2000).

#### 2.2.4.2 *ramR* a genový shluk *rag*

Klíčovým transkripčním regulátorem hrajícím hlavní roli v aktivaci morfologické diferenciace u *S. coelicolor*, je produkt genu *ramR*. U kmene s mutací v genu *ramR* nedochází k produkci surfaktinu SapB a zároveň dochází ke zpoždění tvorby vzdušného mycélia. Nadprodukce *ramR* způsobuje obnovení tvorby vzdušného mycélia a biosyntézy peptidu SapB u všech testovaných *bld* mutantů. Protein RamR, podobně jako regulátor Spo0A u *Bacillus subtilis*, může spojovat různé fyziologické signály (např. stres, dostupnost živin, vývojové stádium kultury atd.) k aktivaci růstu vzdušného mycélia. Molekulární mechanismus, prostřednictvím kterého tyto signály mohou směřovat k RamR, není dosud znám (Nguyen *et al.*, 2002). RamR působí jako transkripční aktivátor operonu *ramCSAB*, operonu pro biosyntézu peptidu SapB (Nguyen *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2002; O'Connor a Nodwell, 2005). Protože se jedná o transkripční regulátor dvousložkového systému, předpokládalo se, že jeho aktivita je řízena prostřednictvím fosforylace (Nguyen *et al.*, 2002). Nedávná pozorování ovšem naznačují, že RamR nemá příslušnou sensorovou kinázu. Ve skutečnosti nefosforylovaná forma RamR je dimerní molekulou, která kooperativně interaguje se třemi vazebnými místy na promotoru *ramC*. RamR není fosforylován malými molekulami sloužícími jako donor fosfátové skupiny, z čehož se usuzuje, že protein postrádá fosfotransferázovou aktivitu (O'Connor a Nodwell, 2005). Přesto mutace aminokyselinového zbytku D53, což je předpokládané místo fosforylace, ruší jeho funkci *in vivo* (Nguyen *et al.*, 2002; O'Connor a Nodwell, 2005). Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že aminokyselinový zbytek D53 je důležitý pro tvorbu dimerů a také pro vazbu na DNA (O'Connor a Nodwell, 2005). Aktivita RamR je regulována na transkripční úrovni. Bylo zjištěno, že promotor *ramR* dosahuje největší aktivity kolem 34.–40. hodiny kultivace, což odpovídá začátku tvorby vzdušného mycélia (Keijser *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002). U *S. griseus* je transkripce ortologu *ramR*, *amfR*, aktivována proteinem AdpA, a je tudíž pod kontrolou signální kaskády A-faktoru (obr. 2-6) (Yamazaki *et al.*, 2003). Podobná AdpA-závislá transkripční aktivace genu *ramR* by se mohla vyskytovat také u *S. coelicolor*, jelikož nadprodukce *ramR* způsobuje obnovení tvorby vzdušného mycélia u mutantů *adpA* (*bldH*) (Nguyen *et al.*, 2003).





**Obr. 2-9: Model regulační úlohy *ramR* a *ragABKR* v procesu morfologické diferenciace.** RamR je hlavní transkripční regulátor, který spojuje signály závislé na genech *bld* při kultivaci na komplexním médiu. Vazbou na promotory operonů *ramCSAB* a *ragABKR* aktivuje jejich transkripci, čímž dochází ke spuštění dvou vývojových nezávislých regulačních drah vedoucích k tvorbě vzdušného mycélia a sporulaci. Na komplexním médiu, SapB (konečný produkt genu *ramS*) reprezentuje hlavní dráhu pro spuštění formování vzdušného mycélia. Druhá dráha je zprostředkována přes produkty operonu *ragABKR*. Ta by mohla fungovat spuštěním signální dráhy, která vede k přepnutí ze vznikajícího vzdušného mycélia na sporující mycélium (1) a sekrecí dosud

neidentifikované difuzibilní molekuly, která podobně jako SapB může vyvolat tvorbu vzdušného mycélia (2). Schopnost RagR se vázat k promotoru *ragABKR* (tečkovaná šipka) naznačuje existenci autoregulační smyčky, která může udržovat expresi těchto genů po indukcii RamR nebo jiným neznámým signálem (otazník). Kromě SapB a produktů operonu *ragABKR* je pro tvorbu vzdušného mycélia na minimálním i na bohatém médiu potřebná přítomnost další skupiny morfogenetických proteinů – chaplinů (viz. kap. 2.2.5.3). Jejich exprese je závislá na genech *bld*, ale nezávislá na proteinu RamR a je pravděpodobně spouštěna dosud neznámým „faktorem X“ (převzato ze San Paolo *et al.*, 2006).

Pomocí technologie DNA microarray byly u *S. coelicolor* identifikovány geny, jejichž transkripce byla ovlivněna u kmenů s nadprodukcí či s mutací v genu *ramR*. Byl objeven celý lokus aktivovaný proteinem RamR ovlivňující formování vzdušného mycélia i sporulaci na médiu R2YE nazvaný genový shluk *rag* (z angl. *ramR*-activated genes). Nachází se ve zcela jiné části chromozomu než shluk *ram*, ale složením genů se mu výrazně podobá. Skládá se z genů *ragA* a *ragB* kódující dvě podjednotky ABC transporteru, z genu *ragK* pro potenciální histidinovou kinázu a z genu *ragR* pro transkripční regulátor dvousložkového systému (San Paolo *et al.*, 2006). RamR aktivuje transkripci *ragABKR* přímo vazbou na tři sekvenční motivy na promotoru *ragABKR*. Na rozdíl od mutantního kmene *ram* je mutantní kmen *rag* schopen syntetizovat SapB. U vláken vzdušného mycélia dochází k jejich neobvyklému větvení připomínající substrátové mycélium. Tvorba sept a sporogeneze jsou zpomaleny. Nadprodukce genů *ragK*, *ragR* a nadprodukce aktivované mutantní alely *ragR* (*D53E*) v mutantních kmenech *bld* a *ram* vedly ke zjištění, že operon *rag* spouští sporulační program aktivací regulační dráhy, která není závislá na peptidu SapB. (San Paolo *et al.*, 2006). Model této dráhy je znázorněn a popsán na obr. 2-9.

### 2.2.4.3 Autoregulátory uplatňující se v morfologické diferenciaci

Dalšími signály, které přispívají k regulaci morfologické diferenciaci u streptomycet jsou již zmíněné mikrobiální feromony,  $\gamma$ -butyrolaktony. Nejlépe prostudovaný  $\gamma$ -butyrolakton je A-faktor u *S. griseus*, jehož signální dráha byla podrobněji popsána výše (kap. 2.2.3.3). Centrální pleiotropní regulátor AdpA, který je součástí této dráhy, pak mj. přímo aktivuje transkripci morfologických genů, jako jsou *amfR* a *adsA* (ECF sigma faktor). Ačkoliv se u *S. coelicolor* vyskytují ortology genů *arpA* (*cprA* a *cprB* u *S. coelicolor* (Onaka *et al.*, 1998)), *adpA* (*bldH* nebo-li *adpA<sub>c</sub>* u *S. coelicolor* (Takano *et al.*, 2003); (Nguyen *et al.*, 2003)), *amfR* (*ramR* u *S. coelicolor* (Ma a Kendall, 1994); (Keijser *et al.*, 2002)) a *adsN* (*bldN* u *S. coelicolor* (Bibb *et al.*, 2000)) a mají podobnou funkci v diferenciaci jako u *S. griseus*, jejich exprese je během vývoje řízena odlišnými regulačními systémy. Např. *bldH* (*adpA<sub>c</sub>*) není pod kontrolou  $\gamma$ -butyrolaktonů (Takano *et al.*, 2003) jako *adpA* u *S. griseus* a gen *bldN* není aktivován centrálním regulačním proteinem AdpA jako ortolog *adsA* u *S. griseus*, ale je reprimován regulačním proteinem BldD (Bibb *et al.*, 2000).

Funkci autoregulátorů uplatňujících se při morfologické diferenciaci mají i jiné druhy molekul jako faktor C (Szabo *et al.* 1962), pamamycin *S. alboniger* (McCann a Pogell, 1979) a desferioxamin E (Yamanaka *et al.*, 2005).

Faktor C je protein o molekulové váze 31 kDa (Birko *et al.*, 1999) popsáný u *S. griseus* 45H (Szabo *et al.*, 1962), dnes označovaný jako *Streptomyces albidoflavus* 45H (Kiss *et al.*, 2008), který je kódován genem *facC* (Birko *et al.*, 1999). Přídavek faktoru C k bakteriální kultuře již v tak nízké koncentraci, jako je 0,5 ng/ml, je dostatečný pro indukci sporulace ve vhodném sporulačně-deficientním kmeni, jako je *S. griseus* 52-1 (Biro *et al.*, 1980; Szeszak *et al.*, 1990). Extracelulární aplikace faktoru C také stimuluje sporulaci u mutantních kmenů *bld* *S. griseus* rostoucích na agarových miskách (Biro *et al.*, 2000). Jeho produkce je vývojově regulována, a tak k produkci faktoru C dochází až po vyčerpání živin v médiu (Biro *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že exprese faktoru C u mutantu *S. griseus* deficientního na syntézu A-faktoru obnovuje produkci některých sekrečních proteinů patřících k regulonu A-faktoru (Birko *et al.*, 2007), což by mohlo znamenat, že mezi těmito dvěma velmi odlišnými molekulami existuje fyziologická spojitost.

Desferioxamin E produkovaný bakterií *S. griseus* urychluje morfologickou diferenciaci u *S. tanashiensis* (Yamanaka *et al.*, 2005). Tato molekula je řazena mezi siderofory, které jsou produkovány různými streptomycetami.

Pamamyciny, skupina makrolidových antibiotik produkovaných bakterií *S. alboniger*, stimulují v subinhibičních koncentracích tvorbu vzdušných hyf, zatímco ve vysokých koncentracích inhibují růst vláken u streptomycet neprodukujících pamamycin a jiných grampozitivních bakterií (McCann a Pogell, 1979; Pogell, 1998).

#### 2.2.4.4 Vliv hladiny GTP v buňce na morfologickou diferenciaci

Vzhledem ke skutečnosti, že je ppGpp (viz kap. 2.2.3.2) syntetizován z GTP a že zároveň zvyšující se koncentrace ppGpp nepřímo inhibuje syntézu GTP v buňce (syntéza ppGpp je doprovázena snížením koncentrace GTP), je velice obtížné určit, který faktor ovlivňuje morfogenezi. Ukázalo se, že decoyinin inhibující GMP syntetázu způsobuje snížení hladiny GTP v buňce bez následné indukce syntézy ppGpp, což se fenotypově projevuje jako indukce formování vzdušného mycélia, a proto Ochi a spol. (1986; 1987) tvrdí, že se jedná o efekt způsobený přímo snížením hladiny GTP a nikoliv zvýšenou syntézou ppGpp. Navíc byl objeven protein Obg, u kterého se předpokládá, že by mohl monitorovat intracelulární koncentraci GTP jako indikátor fyziologického stavu vláken a iniciovat morfologickou diferenciaci. Přítomnost genu *obg* ve vícero kopiích potlačuje tvorbu vzdušného mycélia u *S. griseus* (Okamoto *et al.*, 1997).

#### 2.2.5 Morfogeny – SapB, chapliny a rodliny

Účinek mnoha genů *bld* *S. coelicolor* vede nakonec prostřednictvím extracelulární signalizační kaskády (Willey *et al.*, 1993) k produkci extracelulárních proteinů, které se přímo účastní tvorby vzdušného mycélia. Jsou to proteiny: SapB (Tillotson *et al.*, 1998) a chapliny a rodliny, které tvoří charakteristické hydrofobní fibrilární pouzdro na povrchu vzdušného mycélia (obr. 2-10). (Claessen *et al.*, 2002; Claessen *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2004; Elliot *et al.*, 2003; Elliot a Talbot, 2004; Garcia, 1995; Glauert a Hopwood, 1961; Wildermuth *et al.*, 1971). Peptid SapB a chapliny se vyznačují vysokou povrchovou aktivitou, což vedlo k názoru, že jejich hlavní funkcí v buňce je překonat povrchové napětí vodního prostředí obklopující substrátové mycélium a dovolit tak vzniku a růstu vzdušného mycélia (Wosten a Willey, 2000).

### 2.2.5.1 Protein SapB

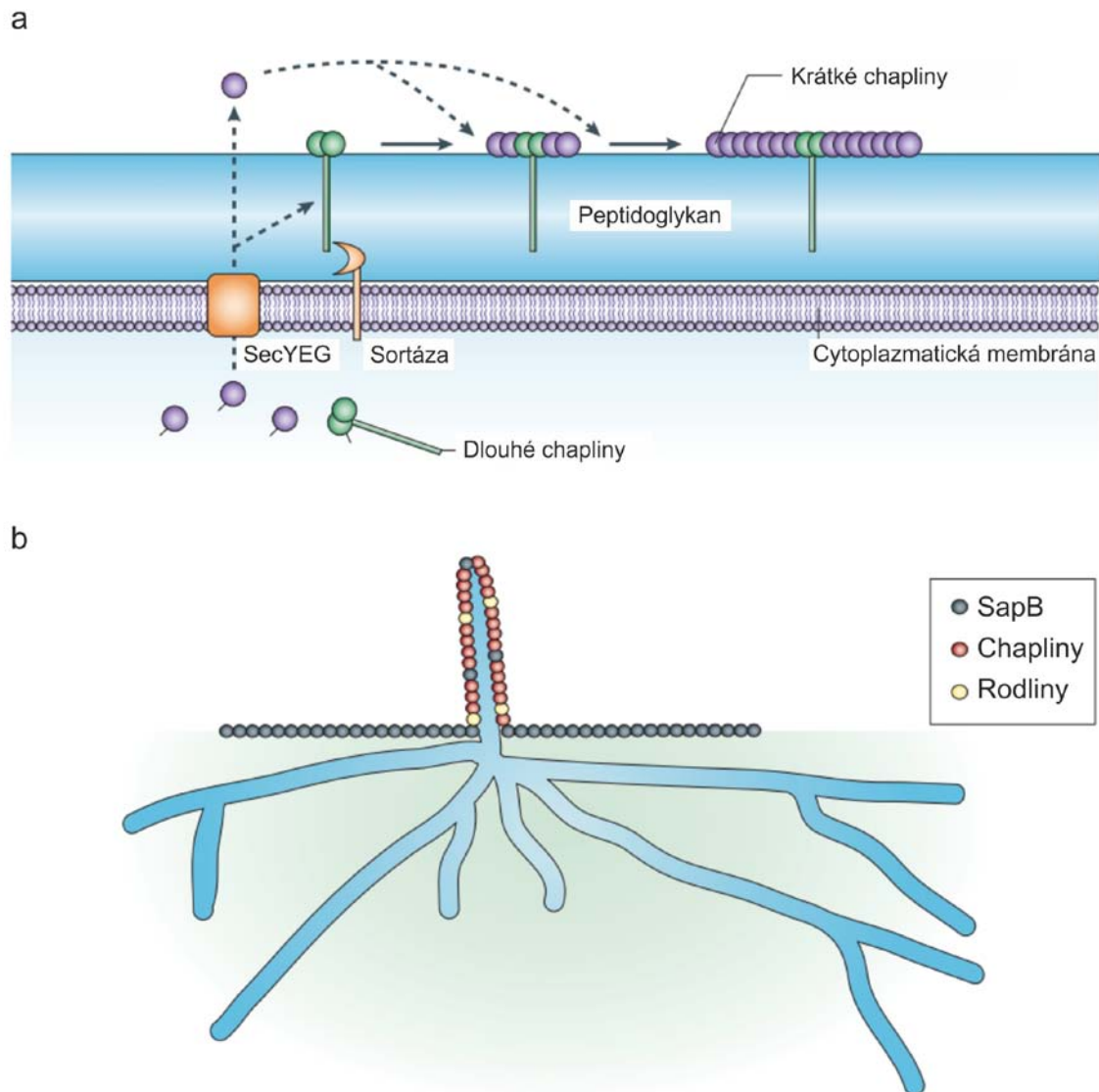
Jak u vláknitých hub, tak u vláknitých bakterií se nezávisle na sobě vyvinula schopnost vytvářet vzdušné mycélium. Vlastnost vláknitých mikroorganismů tvořit hydrofobní vlákna je nezbytnou podmínkou pro jeho tvorbu. Studium *S. coelicolor* bylo zjištěno, že existují výrazné podobnosti v molekulární biologii diferenciaci vzdušného mycélia u hub a bakterií (Talbot, 2003).

Vláknité houby rostou vertikálně s podporou malých povrchově aktivních molekul nazvaných hydrofobiny, které jsou produkovány různými zástupci askomycet a basidiomycet (Wosten, 2001). První objevená morfogenetická molekula ovlivňující formování vzdušného mycélia u *S. coelicolor* je peptid SapB (z anglického *spore associated protein* (Guijarro *et al.*, 1988). Tato molekula je produkována a sekretována pouze během kultivace na bohatých médiích (např. R2YE médium) a zdá se být důležitá pro morfogenezi za těchto podmínek (Capstick *et al.*, 2007). Nejpřesvědčivějším důkazem pro toto tvrzení je pozorování, že aplikace purifikovaného SapB peptidu na mutantní kmeny *bld* způsobila obnovení jejich schopnosti tvořit vzdušné mycélium (Willey *et al.*, 1991). V souladu s tímto pozorováním bylo dále zjištěno, že biosyntéza peptidu SapB je závislá na genech *bld* a je omezená pouze na vývojová stadia diferenciaci odpovídající vzdušnému mycéliu a sporulaci (Willey *et al.*, 1991). Navíc tyto experimenty také ukázaly, že vzdušné mycélium obnovené u *bld* mutantů vystavených působení SapB peptidu není schopné sporulace. Takové vzdušné mycélium se podobá spíše krátce se větvícím substrátovým hyfám, které opustily substrát a začaly růst do vzduchu. Toto pozorování koresponduje s primární úlohou SapB jako povrchově aktivní látkou. Podobně jako u hydrofobinů (Wosten, 2001) polymeruje také SapB prostřednictvím hydrofobních interakcí na rozhraní vzduch-kolonie, kde redukuje povrchové napětí a umožňuje vzpřímení vzdušného mycélia ze substrátu (Obr. 2-10b). Funkční podobnost mezi SapB a hydrofobiny hub byla dále demonstrována schopností hydrofobinu SC3 ze *Schizophyllum commune* obnovovat formování vzdušného mycélia u mutantů *bld S. coelicolor* (Tillotson *et al.*, 1998), a to i přes to, že SapB a SC3 nesdílejí žádné společné strukturní vlastnosti, ale mají společnou vlastnost fungovat jako biosurfaktanty. Navíc proteiny SapB i SC3 jsou schopny obnovovat kompletní diferenciaci u mutantů *ramS* (Kodani *et al.*, 2005; Willey *et al.*, 1993). Kromě SapB *S. coelicolor* byl u *S. tendae* izolován další peptid SapT podobný lantibiotikům (viz dále), který také způsobuje obnovení kompletní morfogeneze u mutantů *ramS* (Kodani *et al.*, 2005). U mutantů *bld* však všechny tři zmíněné peptidy nejsou schopny navodit

kompletní diferenciaci a způsobují pouze vzpřímení vzdušného mycélia s aberantní morfologií bez následné sporulace (Kodani *et al.*, 2005; Tillotson *et al.*, 1998). Povrchově aktivní látky z *Bacillus subtilis* (surfaktin a fengicin) a z *Pseudomonas aeruginosa* (viskosin) neměly žádný efekt na diferenciaci mutantů *bld* (Richter *et al.*, 1998).

Kodani a spol. (2004) zjistili, že SapB je molekula podobná lantibiotikům (skupina ribozomálně syntetizovaných antibiotik u grampozitivních bakterií obsahujících modifikované cysteinové zbytky spojené lanthioninovými můstky). Jedná se o peptid složený z 42 aminokyselin, který je produktem genu *ramS*, součástí genového shluku *ram*. Genový shluk *ram* (z angl. rapid aerial mycelium formation gene cluster) je u *S. coelicolor* ortologem ke genovému shluku *amf* u *S. griseus* a je vysoce konzervovaný u mnoha streptomycet. Nadprodukce genu *amf* u *S. griseus* způsobuje obnovení tvorby vzdušného mycélia u A-faktor deficientních mutantních kmenů (Ueda *et al.*, 1993). Podobně u *S. coelicolor* větší počet kopií genů *ram* způsobuje rychlou tvorbu vzdušného mycélia (Ma a Kendall, 1994). Genový shluk *ram* (*amf*) se skládá ze čtyř genů tvořící operon – *ramCSAB* (*amfTSAB*) (Keijser *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002) a monocistronického genu *ramR* (*amfR*), který se nachází na komplementárním vlákně DNA (viz kap. 2.2.4.2). Přeměna inaktivního prepeptidu RamS na SapB je charakteristická rozsáhlými posttranslačními modifikacemi, během kterých dochází k tvorbě lanthioninového můstku. Peptid je poté exportován z buňky. Specifickou peptidázou je odštěpena vedoucí sekvence a tím je zralý SapB peptid uvolněn do média. Peptid SapB vykazuje amfifilní charakter, který je podmínkou toho, aby mohl sloužit jako povrchově aktivní látka. Na rozdíl od lantibiotik se zdá, že SapB nevykazuje žádnou antimikrobiální aktivitu (Kodani *et al.*, 2004). Mutace v genu *ramS* způsobuje výrazné zpoždění tvorby vzdušného mycélia na komplexním médiu (Nguyen *et al.*, 2002). Díky genetickým studiím a analýzám založeným na sekvenční homologii proteinů byla předpovězena funkce i dalších členů operonu *ramCSAB*. Předpokládá se, že proteiny RamA a RamB, které kódují podjednotky ABC transporterů, zajišťují export SapB. Podle sekvenční podobnosti mezi C-terminální doménou a dehydratázami typu LanM (LanM-type dehydratases), CinM a MrsM, lze předpokládat, že RamC je enzym zodpovědný za modifikaci produktu genu *ramS* (Kodani *et al.*, 2004). Tyto dehydratázy CinM a MrsM jsou potřebné pro syntézu lantibiotik, mersacidinu a cinnemycinu (Altena *et al.*, 2000; Widdick *et al.*, 2003). Méně jasná je ovšem role N-terminální domény proteinu RamC, která obsahuje sekvenční motivy příbuzné s motivy nalezenými u Ser/Thr kináz a také doménu potřebnou pro homodimerizaci a asociaci s plazmatickou membránou (Hudson *et al.*, 2002; Hudson a Nodwell, 2004). Důležitost

genu *ramC* v diferenciaci byla potvrzena genetickými studiemi. Ve skutečnosti dochází u mutantů *ramC* podobně jako u mutantů *bld* k blokování tvorby vzdušného mycélia, ale produkce antibiotik ovlivněna není (Hudson *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2002). Klíčovou úlohu v regulaci shluku *ram* ovšem hraje gen *ramR*. Jedná se o transkripční regulátor dvousložkového systému, který přímo aktivuje expresi operonu *ramCSAB* a jeho funkce byla podrobněji popsána v kap. 2.2.4.2.



**Obr. 2-10: Model uplatnění SapB a chaplinů v morfogenezi. a)** Dlouhé chapliny (ChpA-C) jsou exportovány prostřednictvím sekrečního systému Sec a kovalentně se vážou na buněčnou stěnu vzdušných hyf pomocí sortázy. Centrální domény dlouhých chaplinů prochází peptidoglykanem buněčné stěny a N-terminální doména nese signální peptid pro Sec sekreční systém. Krátké chapliny (ChpD-H) jsou rovněž exportovány sekrečním systémem Sec a polymerizací s dlouhými chapliny vytvářejí rozsáhlá hydrofobní chaplinová vlákna na povrchu buněk. **b)** SapB sekretovaný během růstu substrátového mycélia obaluje vznikající vzdušné hyfy a aké se hromadí na rozhraní vzduch-voda za účelem usnadnění vzpřímení vzdušných hyf do atmosféry. Sekretované chapliny a rodliny polymerizují, čímž vytvářejí hydrofobní obal kolem vzdušných hyf, a podílejí se na usnadnění uvolnění vzdušných hyf do vzduchu (Flärdh a Buttner, 2009).

### 2.2.5.2 Rodliny

Postradatelnost SapB pro formování vzdušného mycélia na minimálním médiu jasně ukázala, že u *S. coelicolor* musí existovat alternativní dráha pro tvorbu vzdušných hyf (Willey *et al.*, 1993). Toto pozorování vedlo k následné izolaci tzv. rodlinů (Claessen *et al.*, 2002). Rodliny jsou kódovány homologními geny, *rdlA* a *rdlB*, které jsou podobně jako hydrofobiny u hub potřebné pro vytvoření charakteristické vrstvy s tyčinkovitým designem (tzv. rodlet layer). Interakcí rodlinů s vlákny polymerizovaných chaplinů (obr. 2-10b) vzniká vrstva tvořená mozaikou z 8–10 nm širokými paralelně uspořádanými tyčinkami, které se nacházejí na povrchu vzdušného mycélia a spór. Toto hydrofobní pouzdro s tyčinkovým designem udává povrchu spór u *S. coelicolor* vzhled připomínající proutěný košík (Claessen *et al.*, 2002; Claessen *et al.*, 2004; Wildermuth *et al.*, 1971). Tato proteinová vrstva chybí u spór *S. avermitilis*, což je ale také v souladu s nepřítomností genů *rdl* v genomu této bakterie. Důkazem postradatelnosti rodlinů pro sporulaci je absence fenotypového projevu u kmenů s deletovanými geny *rdl* (Claessen *et al.*, 2002).

Rodliny jsou nezbytné pro adhezi k hydrofobním povrchům, ale nikoliv pro vzpřimování vzdušného mycélia z kultivačního média do vzduchu (Claessen *et al.*, 2002; Claessen *et al.*, 2004).

### 2.2.5.3 Chapliny

Skupina proteinů zodpovědných za tvorbu vzdušného mycélia na několika různých kultivačních médiích (např. R2YE, MS a modifikovaný NMMP agar) byla nazvána chapliny (tzv. „coelicolor hydrophobic aerial proteins“) (Claessen *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2004; Elliot *et al.*, 2003). Jedná se o skupinu osmi amfipatických bílkovin, které obsahují vysoce konzervované hydrofobní domény o velikosti 50 aminokyselin nazvané chaplinové domény. Chapliny se dělí do dvou skupin: dlouhé chapliny se dvěma chaplinovými doménami (ChpA, B, C) a krátké chapliny s jednou chaplinovou doménou (ChpD, E, F, G, H). Dlouhé chapliny nesou na N-terminálním konci signál peptid pro Sec sekreční systém, který zajišťuje jejich export z buňky. Jejich C-terminální část obsahuje rozpoznávací místo pro enzym sortázu zajišťující inkorporaci proteinů do peptidoglykanu buněčné stěny (Elliot *et al.*, 2003). Dlouhé chapliny jsou tedy prostřednictvím sortázy kovalentně navázány na buněčnou stěnu a vytvářejí na povrchu hyf jakési lešení, které pravděpodobně usnadňuje navázání krátkých chaplinů (ve své sekvenci neobsahují kotvící doménu pro vazbu na

buněčnou stěnu) na buněčný povrch nově vznikajících vzdušných hyf, čímž dohromady tvoří povrchově aktivní film amyloidního charakteru (Claessen *et al.*, 2003), který usnadňuje prolomení interfacie vzduch-voda a uvolnění vzdušných hyf ze substrátu (obr. 2-10a). Mutantní kmen ve všech genech *chp* nebyl schopen tvořit vzdušné hyfy na minimálním médiu a na bohatém médiu vykazoval výrazný defekt v tvorbě vzdušného mycélia (Capstick *et al.*, 2007; Claessen *et al.*, 2004). Kmeny neschopné produkovat SapB a chapliny vykazovaly fenotyp *bld* za všech růstových podmínek (Capstick *et al.*, 2007), což je v souladu s jejich předpokládanou funkcí biosurfaktantů. Mutantní kmen nesoucí pouze tři funkční *chp* geny *chpC*, *E* a *H*, tedy pouze ty, které jsou konzervované ve všech sekvenovaných genomech streptomycet a které jsou více či méně exprimovány konstitutivně, vykazoval téměř shodnou morfologii vývoje vzdušného mycélia s divokým typem, což je v souladu s následujícím modelem (Chater *et al.*, 2010). ChpC se váže prostřednictvím sekvence rozpoznávané sortázou na buněčnou stěnu a tím umožňuje navázání polymerujícího ChpH na povrch buňky, zatímco esenciální ChpE hraje podpůrnou úlohu v polymerizaci ChpH (Di Berardo *et al.*, 2008).

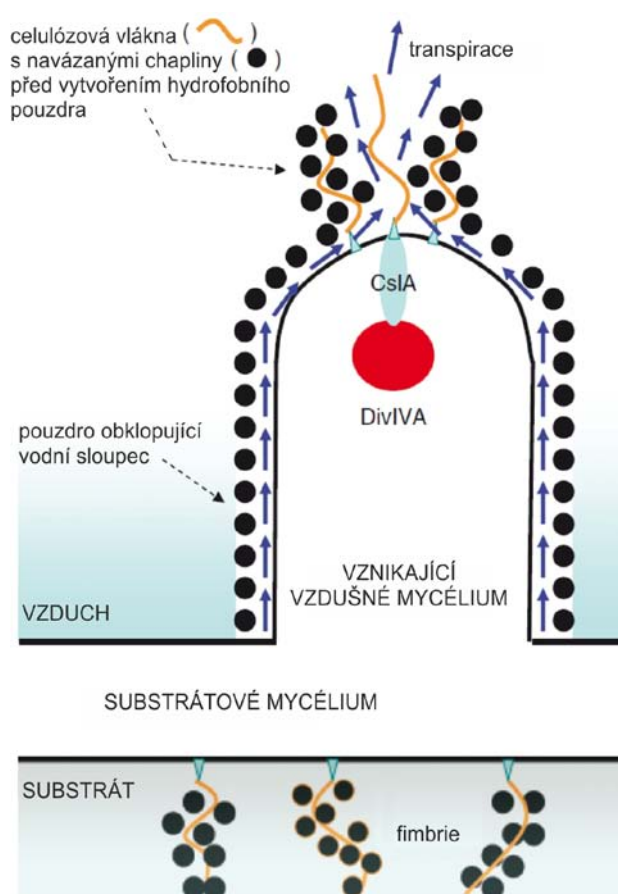
Kromě jejich funkce ve formování vzdušného mycélia jsou chapliny společně s rodliny zodpovědné za tvorbu tzv. „rodlet“ ultrastruktury, typické vrstvy s tyčinkovitým designem na povrchu vzdušného mycélia a spór (Claessen *et al.*, 2004; Claessen *et al.*, 2006).

Významnou roli v diferenciaci vzdušného mycélia ve spojení s chapliny a rodliny hraje celulóza (obr. 2-11). Nedávno bylo zjištěno, že  $\beta$ -glukany (např. celulóza a chitin) a také enzym pro syntézu celulózy CslA (z angl. *cellulose synthase-like protein*) se přednostně vyskytují ve vrcholcích hyf, tedy na místech, kde probíhá růst buněčné stěny (Xu *et al.*, 2008a). Delece genu *cs1A* způsobuje fenotyp *bld* a ztrátu  $\beta$ -glukanů z vrcholků hyf. K obnovení fenotypu dochází částečně po přidání extraktu chaplinů a rodlinů. Toto pozorování vedlo k domněnce, že  $\beta$ -glukany syntetizované enzymem CslA fungují jako jakýsi druh bandáže obalující vrcholky vláken a způsobující stabilizaci materiálu vznikajícího hydrofobního pouzdra, jako jsou chapliny a rodliny, které jsou uvolňovány během růstu vzdušného mycélia (Xu *et al.*, 2008a)

Chapliny také hrají důležitou úlohu ve schopnosti adheze *S. coelicolor* k podkladu. Přílnavost k povrchu je zprostředkována pomocí extracelulárních fimbrií, které se vytvářejí z malých hrbolků lokalizovaných podél laterální stěny hyf a jsou převážně složené z amyloidních vláken tvořených z chaplinů (de Jong *et al.*, 2009b). Schopnost adheze k povrchu a tvorba fimbrií je u kmenů s nefunkčními geny *chp* (*chpA-H*) zcela potlačena.



Místo toho se u těchto mutantních kmenů objevují velmi tenká vlákna vyčnívající ze stejných hrbolků na buněčné stěně, která jsou citlivá k celuláze. Působení celulázy u divokého typu také způsobuje uvolnění fimbrií z buněčného povrchu, čímž se zruší schopnost přilnavosti k povrchu. Snížená schopnost přilnavosti u kmenů s nefunkčním genem pro CslA také naznačuje úlohu celulázy v tomto procesu a potvrzuje domněnku, že základem fimbrií je celulóza sloužící jako kotva pro uchycení k buněčné stěně a jako lešení, na kterém se následně vytvářejí amyloidní vlákna složená z chaplinů (obr. 2-11) (de Jong *et al.*, 2009b).



**Obr. 2-11: Model úlohy povrchově aktivních proteinů a celulózy v povrchové přilnavosti a v tvorbě vzdušného mycélia.** V místě kontaktu substrátových hyf a hydrofobního povrchu vyčnívají celulózové fibrily ven a fungují jako lešení pro vytvoření amyloidních fimbrií složených z chaplinů, které umožňují přichycení k povrchům (de Jong *et al.*, 2009b). Celulózové fibrily také vyčnívají na vrcholcích vzdušných hyf tam, kde je lokalizován komplex CslA s DivIVA (jako determinantou polarity), a napomáhají vytvářet hydrofobní pouzdro z chaplinů prostřednictvím formování struktur podobných fimbriím. Zdá se, že vnitřní hydrofilní povrch tohoto pouzdra udržuje sloupec vody v periplazmatickém kompartmentu. Podle předpokladu, že pouzdro je na rostoucím vrcholku hyf otevřené, lze usuzovat, že odpařování vody z vrcholků hyf způsobí transpiraci a tím přenos živin ze základny směrem k vrcholkům vzdušných hyf a zároveň udržují hydrataci vzdušných hyf (Chater *et al.*, 2010).

## 2.2.6 Bílé mutanty a sporulace

Mutantní kmeny schopné tvorby vzdušného mycélia, ale neschopné standardní sporulace, se nazývají mutanty *whi* (z angl. white – bílý). U vláken tedy nedochází k diferenciaci spór a to je důvod, proč i po delší době kultivace zůstávají bíle zbarvená a postrádají šedý pigment typický pro spóry.

Podle toho, zdali je či není příslušný mutant *whi* schopen tvorby sporulačních sept, se *whi* geny dělí na dvě skupiny: časné *whi* geny (*whiA*, *B*, *G*, *H*, *I*, *J*, *L*, *M*, *O* a *ssgB*) a pozdní *whi* geny (*whiD*, *E*, *sigF*, *ssgA* a *ssgR*) (Chater, 1972; Ryding *et al.*, 1999). Většina časných sporulačních genů je vyžadována pro expresi pozdních genů, a to prostřednictvím minimálně dvou samostatných časných regulačních drah ( $\sigma^{\text{WhiG}}$  závislá a  $\sigma^{\text{WhiG}}$  nezávislá regulační dráha) směřujících k aktivaci pozdních sporulačních genů (Chater, 2001).

Podobně jako u genů *bld* byla také pro časné *whi* geny stanovena hierarchie: *whiG*, *whiJ* > *whiA*, *whiB* > *whiH* > *whiI* (Chater, 1993) (obr. 2-12). Tyto geny jsou potřebné pro navození časné fáze sporulace: typického růstu vzdušných hyf a tvorbu jednojaderných prespórových kompartmentů. Časné geny *whi* navíc aktivují transkripci pozdních *whi* genů, které zodpovídají za tvorbu buněčné stěny spór a zrání spór (Chater, 1998).

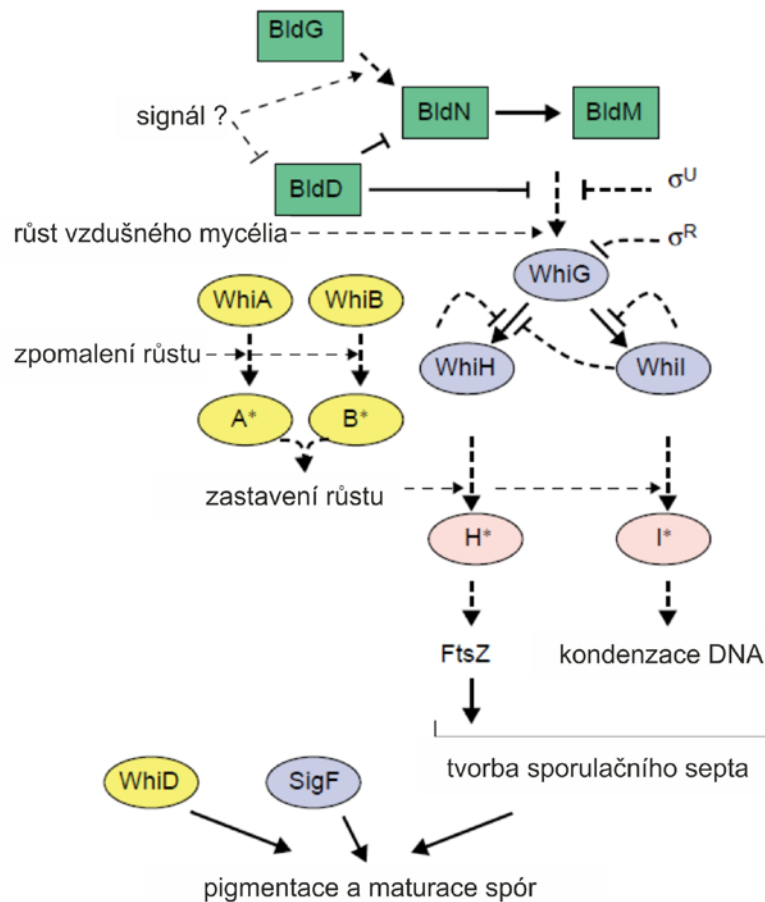
Zásadním genem pro iniciaci sporulace u *S. coelicolor* je gen *whiG* (Chater, 2001; Flärdh *et al.*, 1999). Jedná se o alternativní  $\sigma$  faktor podobný  $\sigma$  faktorům, které u mnoha bakterií řídí přepis některých genů zodpovědných za motilitu a chemotaxi (Chater *et al.*, 1989; Tan *et al.*, 1998). *whiG* mutanty se projevují charakteristickými rovnými vzdušnými vlákny bez spirálovitého stáčení, která mají normálně přehrádkovaná septa podobná substrátovým hyfám a zřídka se větví. Nadprodukce *whiG* způsobuje předčasnou ektopickou sporulaci substrátového mycélia (Flärdh *et al.*, 1999). Hladina mRNA genu *whiG* je v průběhu životního cyklu více či méně konstantní, a proto se předpokládalo, že aktivita  $\sigma^{\text{WhiG}}$  je pravděpodobně řízena neznámým anti- $\sigma$  faktorem (Kelemen *et al.*, 1996). Proto zjištění, že přepis genu *whiG* je reprimován genem *bldD*, bylo překvapivé. U mutantu *bldD* je exprese genu *whiG* v časných fázích růstu zvýšena, což koresponduje s represní funkcí BldD vůči *whiG* během růstu substrátového mycélia. Na začátku sporulace ovšem dochází u mutantu *bldD* k razantnímu snížení exprese genu *whiG* až na nedetekovatelnou hladinu. (Elliot *et al.*, 2001).  $\sigma^{\text{WhiG}}$  jako součást kompletní RNA polymerázy aktivuje transkripci dalších dvou časných sporulačních genů – *whiH* (Ryding *et al.*, 1998) a *whiI* (Ainsa *et al.*, 1999).

Oba geny jsou autoregulátory; exprese jejich mRNA v mutantích kmenech *whiH* či *whiI* se výrazně zvyšuje. Hladina mRNA u obou genů v divokém typu se zvyšuje v době, kdy dochází k tvorbě sporulačních sept, což znamená, že by nějaký dosud neznámý signál mohl způsobit zrušení autoreprese. WhiH a WhiI jsou řazeny do dvou odlišných rodin transkripčních regulátorů (Ainsa *et al.*, 2000; Ryding *et al.*, 1998). WhiH je řazen do rodiny transkripčních regulátorů typu GntR. Mnoho těchto transkripčních faktorů reaguje na metabolické meziproducty charakteru karboxylových kyselin (Ryding *et al.*, 1998). Protein

WhiH by tak mohl měnit svou regulační aktivitu podle měnící se koncentrace nějakého metabolitu ve vzdušném mycéliu a zprostředkovávat tak koordinaci časných a pozdních fází sporulace (Flärdh *et al.*, 1999). Zdá se, že WhiH indukuje silně vývojově kontrolovaný promotor *ftsZp2* genu *ftsZ* (viz dále) způsobující tvorbu sporulačních sept (Flärdh *et al.*, 2000). Mutace v genu *whiH* se projevuje redukcí spórového pigmentu a vznikem z velké části nediferencovaných vzdušných vláken s ojedinělými sporulačními septy a nepravidelně rozdělovaným nukleoidem (Flärdh *et al.*, 1999; Schwedock *et al.*, 1997).

Protein WhiI se skládá ze dvou domén – z fosforylační domény transkripčního regulátoru dvousložkového systému na N-terminální konci a z potenciální helix-turn-helix DNA-vazebné domény na C-terminálním konci bílkoviny. WhiI se tedy podobá transkripčním regulátorům dvousložkového systému, ovšem s tím rozdílem, že jim chybí některé konzervované aminokyselinové zbytky typické pro fosforylační kapsu. Je tak nepravděpodobné, že by regulátor WhiI byl fosforylován senzorem histidinovou proteinkinázou. Předpokládá se, že spíše než histidinovou proteinkinázou, je fosforylován fosforylovanými intermediáty metabolismu (Tian *et al.*, 2007; Chater a Chandra, 2006). Zdá se tedy, že kromě úlohy časného sporulačního regulátoru hraje také důležitou roli jako pozdní sporulační regulátor, jelikož aminokyseliny odpovídající konzervovaným aminokyselinovým zbytkům ve fosforylační kapse jsou důležité právě v pozdních fázích sporulace. Pomocí DNA microarray technologie bylo u mutantu *whiI* identifikováno několik genů pozdní sporulace jejichž exprese byla v porovnání s divokým kmenem významně ovlivněna (Tian *et al.*, 2007). Mutace v genu *whiI* se projevuje neschopností tvorby sept a na rozdíl od mutace v genu *whiH* nedochází u mutantů *whiI* ke kondenzaci nukleoidu (Ainsa *et al.*, 1999).

Na základě těchto pozorování byla vyslovena hypotéza, že WhiH a WhiI původně fungují jako represory neznámých cílových genů a že signály generované během vzdušného růstu způsobují jejich konformační změnu, ve které ztrácejí autorepresorovou funkci a stávají se aktivátory genů účastnících se formování septa při sporulaci. Tento model je v souladu s pozorováním, že k expresi pozdních sporulačních genů *ftsZ* a *sigF* nedochází u mutantů *whiH* a *whiI* (Flärdh *et al.*, 2000; Kelemen *et al.*, 1996) (obr. 2-12).



**Obr. 2-12: Sporulační regulační kaskáda u *S. coelicolor*.** V substrátovém mycéliu připravujícím se na tvorbu vzdušného mycélia je přítomnost funkčního proteinu BldG nezbytná pro transkripci genu *bldN*.  $\sigma^{\text{BldN}}$  řídí transkripci *bldM*, který kóduje transkripční regulátor dvousložkového fosforylačního systému potřebný pro tvorbu vzdušného mycélia. V rostoucích vzdušných hyfách  $\sigma^{\text{WhiG}}$  aktivuje transkripci genů *whiH* a *whiI*. V této fázi působí BldD, který se váže na promotory genů *bldN* a *whiG* a tím reprimuje jejich expresi v rostoucím substrátovém mycéliu. Signály uvolňující tuto represi ve vzdušných hyfách nejsou dosud známy. Vzdušné hyfy také obsahují proteiny WhiA a WhiB, které vnímají zpomalení vzdušného růstu, což způsobuje jejich přeměnu na modifikované formy WhiA\* a WhiB\*, které způsobují zastavení růstu. Předpokládá se, že zastavení růstu vyvolá vznik signálu navozující u WhiH a WhiI alternativní konformaci (WhiH\* a WhiI\*), díky které ztrácejí autorepresní aktivitu a stávají se aktivátory sporulačních procesů týkajících se tvorby sept. Následuje spouštění procesů spojených s maturací spor a tvorbou pigmentu zajištěných pozdními sporulačními regulátory jako je WhiD a SigF. Regulační kroky jsou znázorněny silnými čarami (plnými – řádně prokázáno; čárkovanými – prokázáno s omezením) a předpokládané kontrolní místa tenkými čárkovanými čarami (převzato z Chater, 2001).

Další dva časné regulační geny *whi* potřebné pro spuštění sporulace jsou geny *whiA* a *whiB* (Ainsa *et al.*, 2000; Chater, 2001; Flärdh *et al.*, 1999). Každý z nich má dva promotory – slabý konstitutivní promotor umožňující bazální hladinu exprese a silný promotor umožňující transkripci na začátku tvorby vzdušného mycélia. Mutanty *whiA* a *whiB* mají neobvykle dlouhá a spirálovitě stočená vlákna, kterým zcela chybí sporulační septa (Flärdh *et al.*, 1999). Předpokládá se, že proteiny WhiA a WhiB jsou vyžadovány pro zastavení růstu vzdušných hyf a je přitom možné, že formování přepážek může probíhat

pouze v nerostoucích hyfách. Proteiny WhiA a B jsou tedy vyžadovány pro zdárné formování přepážek při sporulaci, kondenzaci nukleoidu, syntézu spórového pigmentu a pro transkripci genu *sigF* (viz dále) (Kelemen *et al.*, 1996). Vývojově kontrolovaná exprese genů *whiA* a *whiB* se zdá být nezávislá na  $\sigma^{\text{WhiG}}$  (Ainsa *et al.*, 2000; Soliveri *et al.*, 1992).

Předpokládaný molekulární mechanismus, díky kterému WhiB reguluje expresi cílových genů poskytla biochemická charakterizace pozdního sporulačního proteinu WhiD (homolog proteinu WhiB) (Jakimowicz *et al.*, 2005). Proteiny WhiB i WhiD jsou řazeny do skupiny malých potenciálních transkripčních faktorů Wbl (WhiB-like), které se vyskytují pouze u actinomycet (Molle *et al.*, 2000; Soliveri *et al.*, 2000). Přestože role proteinů Wbl je poněkud kontroverzní (den Hengst a Buttner, 2008), podle nedávných biochemických experimentů se zdá, že fungují skutečně jako transkripční faktory (Guo *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; Steyn *et al.*, 2002). Tyto proteiny obsahují čtyři esenciální konzervované cysteinové zbytky, které vážou jako kofaktor komplex [4Fe-4S], který odpovídá na redoxní změny v extracelulárním prostředí (Jakimowicz *et al.*, 2005). Takové změny mohou měnit konformaci proteinů a tím aktivitu těchto proteinů. Lze předpokládat, že zpomalení růstu může způsobit endogenní oxidativní stres ve vzdušných hyfách, který může být vnímán proteinem WhiB, což může vést ke změnám v expresi genů regulovaných proteinem WhiB a tím zastavení růstu vzdušného mycélia (Chater, 2001).

V souladu s uvažovanou funkcí proteinů Wbl jako transkripčních faktorů způsobovaly mutace v různých genech *wbl* u streptomycet i mykobakterií různé fenotypové projevy. Na rozdíl od *whiB* tvoří mutant *whiD* normální vzdušné mycélium, ovšem se sníženou schopností sporulace. Je schopen tvořit sporulační septa, ale vzniklé spóry se od spór divokého typu liší v citlivosti k vyšším teplotám, v náchylnosti k lyzi, v nepravidelné velikosti spór a v tloušťce buněčné stěny. Navíc uvnitř spór se v blízkosti jejich pólů někdy nacházejí ještě další nedokonalá sporulační septa, která oddělují ve spórách nepravidelné minikompartmenty postrádající chromozomální DNA (Molle *et al.*, 2000).

Zdá se, že gen *whiJ* kódující potenciální DNA-vazebný protein působí jako represor sporulačních genů, jehož funkce je regulována vazbou proteinu SCO4542. Model působení WhiJ represoru je následující (Ainsa *et al.*, 2010). WhiJ je represor dosud neznámých genů potřebných pro růst vzdušných hyf a produkci antibiotik. Produkt sousedního genu SCO4542 ležícího ve směru transkripce genu *whiJ* interaguje s proteinem WhiJ a brání tak vazbě WhiJ na cílovou DNA. Neznámý signál způsobí uvolnění WhiJ z proteinu SCO4542, čímž dochází k vazbě represoru WhiJ na cílovou DNA a represi genů uplatňujících se při růstu vzdušného mycélia a produkci antibiotik. Za laboratorních podmínek se zdá být tento

signál nepřítomný, a proto je diference na *WhiJ* nezávislá. Tento předpoklad je v souladu s pozorováním, že kompletní delece genu *whiJ* neměla na fenotyp žádný vliv. Naopak mutací v genu *SCO4542* dochází ke konstitutivní vazbě *WhiJ* k cílové DNA a tím k represí diference, což se projevuje jako fenotyp *bld*. Fenotyp *bld* mutantu *SCO4542* byl potlačen zavedením další delece a to v genu *whiJ*. Za určitých podmínek (např. růst na R2YE médiu) je *WhiJ* modifikován a tvoří *WhiJ\**, který nemůže reprimovat vzdušný růst, ale reprimuje sporulaci. I v tomto stavu je funkce *WhiJ\** řízena interakcí s proteinem *SCO4542*. Nefunkčnost některých testovaných mutantních alel (*C77* a *C53*) v genu *whiJ*, které vykazují společný fenotyp bílých kolonií, může být důsledkem neschopnosti těchto mutant mimikujících *WhiJ\** formu interagovat s proteinem *SCO4542* (Ainsa *et al.*, 2010).

Jeden z genů potřebných pro pozdní fázi sporulace je gen *sigF* (homolog *sigB* *B. subtilis*) (obr. 2-12) kódující alternativní  $\sigma$  faktor RNA polymerázy (Potuckova *et al.*, 1995). Mutant *sigF* tvoří menší deformované spóry s tenkou buněčnou stěnou, která jim uděluje větší citlivost vůči detergentům. Spóry jsou navíc více či méně nepigmentované a obsahují nekondenzovanou DNA. Gen *sigF* není přepisován v *whiA*, *B*, *G*, *H*, *I* a *J* mutantních kmenech (Kelemen *et al.*, 1996). Dosud nebyl určen žádný cílový gen regulovaný faktorem  $\sigma^F$ , ale bylo zjištěno, že jeden z promotorů *whiE* (*whiEP2*) je neaktivní v mutantním kmeni *sigF* (Kelemen a Buttner, 1998; Kelemen *et al.*, 1998).

Tvorba sporulačních sept a zrání spór vyžaduje navíc transkripci následujících pozdních genů: genů *fts*, *ssg(ABCDEFGG)* a lokusu *whiE*.

Geny *fts* se účastní buněčného dělení a u většiny bakterií jsou esenciální. Klíčovým proteinem je tzv. bakteriální tubulín *FtsZ* (McCormick *et al.*, 1994; Schwedock *et al.*, 1997) polymerující v charakteristický Z kruh, který určuje místo dělení buňky. U streptomycet není ztráta *ftsZ* proteinu letální, ale mutantní kmen nemůže sporulovat. Jeden z promotorů genu *ftsZ*, *ftsZ2p* je vývojově regulován a ve sporulujících vzdušných hyfách dochází k silné transkripci genu *ftsZ* z tohoto promotoru. Toto zvýšení exprese je podmíněno funkcí genů *whiA*, *B*, *G*, *H* a *I*, což je také důvod, proč mutace v těchto genech *whi* způsobuje neschopnost tvořit sporulační septa (Flärdh *et al.*, 2000).

Dalším z genů *fts*, který kóduje membránový protein a jehož mutace vede k defektní tvorbě buněčných přepážek a k nadprodukcí aktinorodinu, je *ftsQ* (McCormick *et al.*, 1994). Na rozdíl od mutace v genu *ftsZ* však nedochází k úplnému bloku tvorby přepážek, jejich počet se pouze snižuje na desetinu (McCormick a Losick, 1996).

Malý cytoplazmatický protein *SsgA* je zodpovědný za pozitivní kontrolu buněčného dělení jak u *S. coelicolor*, tak u *S. griseus*, ale sám není součástí dělicího aparátu. Gen *ssgA*

je vývojově regulován a je vyžadován pro tvorbu spór. Mutant *ssgA* je defektní ve sporulaci, ale tvoří zřejmě normální septa v substrátovém mycéliu (Jiang a Kendrick, 2000; van Wezel *et al.*, 2000). U *S. griseus* je součástí regulonu AdpA (viz kap. 2.2.3.3), ale u *S. coelicolor* je regulován produktem genu *ssgR*, který leží v těsném sousedství genu *ssgA* na chromozomu (Traag *et al.*, 2004). *S. coelicolor* má celkem sedm genů podobných *ssgA* (*ssgA,B,C,D,E,F,G*), též označovaných jako SALP geny (z angl. SsgA-like proteins) (Flärdh a van Wezel, 2003). Gen *ssgB* rovněž ovlivňuje sporulaci a jeho mutace způsobuje defekt ve tvorbě sporulačního septa a projevuje se nápadně velkými bílými koloniemi (Keijser *et al.*, 2003). Gen *ssgC* je zodpovědný za správnou segregaci a kondenzaci DNA při sporulaci, gen *ssgD* za syntézu buněčné stěny spór, gen *ssgE* a *ssgF* za autolytické uvolnění zralých spór a gen *ssgG* za určení lokalizace septa (Noens *et al.*, 2005).

*whiE* je lokus složený z osmi genů, z nichž většina kóduje enzymy pro syntézu polyketidů. Geny jsou uspořádány do dvou transkripčních jednotek přepisovaných z promotorů *P1* (geny I – VII) a *P2* (gen VIII), které jsou vývojově regulovány. Geny *whiE* jsou přepisovány v pozdní fázi sporulace a zajišťují syntézu šedého spórového pigmentu polyketidového charakteru, který se ukládá ve stěnách spór. Exprese lokusu *whiE* je nulová u mutantů *whiA*, *B*, *G* a *J* a snižená u mutantů *whiH* a *I* (Kelemen *et al.*, 1998).

Gen *samR* obsahující ve své sekvenci DNA-vazebný motiv helix-turn-helix se rovněž podílí na regulaci sporulace. Více kopií genu *samR* způsobuje urychlení tvorby vzdušného mycélia u *S. ansochromogenes* a disruptivní mutant v tomto genu se vyznačuje fenotypem *bld* a není schopen tvořit vzdušné mycélium ani spóry. Překvapivé je, že mutace v téměř identickém genu u *S. coelicolor* způsobila zcela odlišný fenotyp. Mutant byl schopný diferenciaci vzdušného mycélia, ale místo tvorby šedých spór zůstal zbarven bíle a bez schopnosti sporulace (Tan *et al.*, 2002).

Podobně jako *samR*, *crgA* ovlivňuje diferenciaci odlišným způsobem u různých druhů streptomycet. Gen *crgA* kóduje malý protein vázaný na membránu, který inhibuje předčasnou tvorbu sporulačních přepážek u *S. coelicolor*. U mutanty *crgA* dochází k předčasné tvorbě vzdušného mycélia a sporulaci a také k předčasné produkci Act. Na druhou stranu má mutant *crgA* u *S. avermitilis* bílé, spirálovitě stočené a často nesporulující vzdušné mycélium. Více kopií genu *crgA* způsobuje v obou případech bílé zbarvení kolonií, ve kterých ve vzdušném mycéliu nedochází k tvorbě sporulačních sept (Del Sol *et al.*, 2003).

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Příprava sporových suspenzí

Sporové suspenze byly připraveny podle laboratorního manuálu *Practical Streptomyces Genetics* (Kieser *et al.*, 2000) a uchovávány dlouhodobě ve 20 % glycerolu v -80 °C a nebo krátkodobě v 10 mM MOPS; 100 mM NaCl pufru, pH 7,2 ve 4 °C (Petrickova *et al.*, 2006).

#### 3.2 Analýza *in silico*

Pro analýzu sekvencí byly používány programy Lasergene (Dnastar). Mapy klonovacích vektorů byly sestrojeny pomocí programů Lasergene (Dnastar) a pDRAW32 verze 1.0 ([www.acaclone.com](http://www.acaclone.com)).

Informace o genomové sekvenci *S. coelicolor* byly získány z internetových stránek StrepDB – The Streptomyces Annotation Server (<http://streptdb.streptomyces.org.uk>).

Konzervované proteinové domény byly vyhledány pomocí databáze Pfam verze 25.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) a Scanprosite (<http://expasy.org/tools/scanprosite/>).

#### 3.3 Bakteriální kmeny

##### Seznam kmenů *Escherichia coli* použitých pro klonování:

- *E. coli* XL1-Blue pro klonování (Stratagene): F<sup>'</sup>::Tn10 *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> Δ(*lacZ*) *M15/recA1 endA1 gyrA96* (Nal<sup>r</sup>) *thi hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *supE44 relA1 lac*
- *E. coli* GM2929 (Berlyn, 1998) pro přípravu nemetylované DNA potřebné pro transformaci do streptomycet: F<sup>'</sup> *ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136* (Str<sup>r</sup>) *xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9* (Cam<sup>r</sup>) *dcm-6 mcrB1 hsdR2* (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *mcrA recF143*

##### Seznam kmenů *Escherichia coli* použitých pro expresi:

- *E. coli* K12 TB1 pro klonování a expresi z pMAL systému (New England Biolabs): F<sup>'</sup> *ara* Δ(*lac-proAB*) [Φ80*dlac* Δ(*lacZ*)*M15*] *rpsL*(Str<sup>R</sup>) *thi hsdR*



- *E. coli* CAG629 pro klonování a expresi z pMAL systému (New England Biolabs):  
*F<sup>+</sup>lacZ(am) pho(am) lon supC(ts) trp(am) rpsL rpoH(am)165 zhg::Tn10 mal(am)*

#### **Seznam kmenů streptomycet použitých pro klonování či fyziologické pokusy:**

- *Streptomyces coelicolor* M145 (Kieser *et al.*, 2000) pro fyziologické experimenty: bezplazmidová forma divokého kmene A3(2) (SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>-</sup>); prototrof
- *Streptomyces lividans* TK24 (Kieser *et al.*, 2000) pro klonování do vektorů pIJ486 a pIJ622: bezplazmidová forma divokého kmene *S. lividans* 66 (SLP2<sup>-</sup>, SLP3<sup>-</sup>), *str-6* (rezistence k streptomycinu)

### **3.4 Vektory**

Pro klonování v *E. coli* byly použity komerčně dostupné vektory pGEM-7Zf+ (Promega), pTZ18R (United States Biochemicals), pBluescript II SK<sup>-</sup> (Fermentas). Pro expresi genů *wdpB* a *wdpC* v *E. coli* byl použit expresní vektor pMAL-c2g<sup>TM</sup> (New England Biolabs).

Pro disrupci genu u streptomycet byl použit vektor s teplotně senzitivní replikací pGM160 (Muth *et al.*, 1989). Vysokokopiové vektory pIJ486 (Ward *et al.*, 1986) a pIJ622 (Petricek *et al.*, 2006) byly použity pro klonování a konstrukci kmenů s vyšším počtem kopií genů *wdpB*, resp. *wdpC* na chromozom *S. coelicolor*. Jako zdroj genu *aac(3)IV* kódující apramycin acetyltransferázu, který je zodpovědný za rezistenci vůči apramycinu, byl plazmid pAPR3 (Petricek *et al.*, 2006).

### **3.5 Kultivační půdy**

Složky všech uvedených kultivačních půd jsou udávány na 1 l média. Do selektivních půd byla přidávána antibiotika (u pevných půd po zchladnutí pod 50 °C) ve finální koncentraci: ampicilin 100 µg/ml, tetracyklin 10 µg/ml pro kultivaci *E. coli* a thiostrepton (BioChemica) 30 µg/ml, apramycin (Sigma) 25 µg/ml pro kultivaci streptomycet. Použité chemikálie byly získány od firem Oxoid (trypton, yeast extract, malt extract, pepton, agar), Difco (casaminoacids), Sigma (TES pufr, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O), Biosera (L-prolin, glicin) a Lach-ner (vše ostatní).

### 3.5.1 Složení živných půd pro kultivaci *E. coli*

- **LB médium** (Luria-Bertani médium): trypton 10 g; yeast extract 5 g; NaCl 10 g; pH 7,5.
- **LB agar**: trypton 10 g; yeast extract 5 g; NaCl 10 g; bakteriologický agar; pH 7,5.
- **SOB médium** – trypton 20 g; yeast extrakt 5 g; NaCl 0,58 g; KCl 0,186 g; po sterilizaci přidáno: 1 M MgCl<sub>2</sub> 10 ml; 1 M MgSO<sub>4</sub> 10 ml.

### 3.5.2 Složení živných půd pro kultivaci streptomycet

- **SFM** (Mannitol soya flour medium, MS; Hobbs *et al.*, 1989): manitol 20 g; sójová mouka 20 g; bakteriologický agar 20 g; doplnit vodu z kohoutku.
- **R2YE** (Thompson *et al.*, 1980): sacharóza 103 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 10,12 g; glukóza 10 g; casaminoacids 0,1 g a doplnit vodou do 800 ml. Rozdělit po 80 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk, do každé baňky přidat 2,2 g bakteriologického agaru a vyklávkovat. Před použitím přidat do každé baňky tyto sterilní roztoky: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 %) 1 ml; CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (3,68 %) 8 ml; L-prolin (20 %) 1,5 ml; TES pufr (5,73 %, pH 7,2) 10 ml; roztok stopových prvků 0,2 ml; NaOH (1N) 0,5 ml; yeast extract (10 %) 5 ml.

**Složení roztoku stopových prvků:** ZnCl<sub>2</sub> 40 mg; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 200 mg; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 10 mg; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 10 mg; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O 10 mg; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O 10 mg.

- **Modifikovaný R3 (mR3) agar**: glukóza 10 g; yeast extract 5 g; casaminoacids 100 mg; L-prolin 5 g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 10 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mg; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mg; TES pufr 5,6 g; bakteriologický agar 20 g; pH 7,2; po klávkování přidáno 100 ml sterilního 10 % peptonu.
- **GYM** (Hesketh a Ochi, 1997): glukóza 4 g; yeast extract 4 g; malt extract 10 g; pepton 1 g; NaCl 2 g; bakteriologický agar 20 g; pH 7,2.
- **YEME** (Yeast extract-malt extract medium; Kieser *et al.*, 2000): yeast extract 3 g; peptone 5 g; malt extract 3 g; glukóza 10 g; sacharóza 340 g. Po klávkování přidány 2 ml 2,5 M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O a pro přípravu protoplastů ještě přidáno 25 ml 20 % glycinu.

## 3.6 Manipulace s DNA

DNA manipulace v *E. coli* byla prováděna podle laboratorního manuálu *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1995). Veškeré restriční endonukleázy, ligázy a modifikační enzymy (většinou od firmy New England Biolabs) byly použity podle návodu doporučeného výrobcem.

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

Izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí byla provedena podle Sambrooka *et al.* (1989). 1,5 ml přes noc narostlé kultury s příslušným antibiotikem bylo stočeno a peleta resuspendována ve 100 µl roztoku I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glukóza). Bylo přidáno 200 µl roztoku II (0,2 M NaOH, 1 % SDS), 150 µl roztoku III (3 M octan draselný, pH 4,8) a vzorky byly inkubovány 5 min na ledu. Následovala centrifugace 10 min, 12000 g a peleta byla promyta 200 µl 70 % etanolu. Vzorky opět stočeny 5 min, 12000 g. Peleta usušena a rozpuštěna ve 20 µl pufru TE s RNázou (40 µg/ml).

Kromě izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí byla za účelem získání plazmidové DNA vysoké čistoty použita komerčně dostupná sada QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep kit (Qiagen).

### 3.6.2 Izolace chromozomální DNA ze streptomycet

1,2 g vlhkého mycélia bylo resuspendováno v 5 ml roztoku 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 a k suspenzi bylo přidáno 0,5 ml lysozymu (10 mg/ml) v 25 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0. Vzorky byly inkubovány 45 min v ledu a poté byl přidán 1 ml roztoku K (0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,4 M EDTA, 1 mg/ml proteinázy K). Vzorky byly inkubovány 1 hod při 50 °C s občasným šetrným mícháním. Poté bylo přidáno 6 ml směsi fenol-chloroform (1 : 1), vzorky byly několikrát promíchány překlápěním a inkubovány 10 min při laboratorní teplotě. Vzorky byly stočeny 15 min, 1000 g při 4 °C, byla odebrána vodní fáze ustříženou špičkou a fenol-chloroformová extrakce byla opakována. K vodní fázi byla přidána 1/10 objemu nepufrovaného 3 M octanu sodného a 2 objemy koncentrovaného etanolu a vzorky byly ponechány 30 min na ledu. Vysrážená chromozomální DNA byla navinuta skleněnou tyčinkou, sušena 5-10 min na stole a nakonec rozpuštěna v TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

### 3.6.3 Elektroforetická separace DNA a izolace DNA fragmentu z agarózového gelu

Pro separaci DNA byla použita horizontální elektroforéza a DNA byla dělena v 0,8–1,5 % TAE-agarózovém gelu podle velikosti separovaných molekul DNA. Ke vzorku byla přidána 1/5 objemu vzorkového pufru (50 mM EDTA, 60 % glycerol, 0,05 % bromfenolová modř). Separace probíhala při napětí 10 V/cm. Pro vizualizaci byla DNA obarvena fluorescenční barvičkou GelRed (Biotium) a proužky separované DNA byly detekovány na UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene) při vlnové délce 312 nm. Pro odečtení přibližné velikosti testovaných molekul DNA byl použit DNA marker o škále 75–20 000 pb (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus od firmy Fermentas).

Pro izolaci DNA fragmentů z gelu byla použita komerční souprava Gel Extraction Kit od firmy Qiagen. Izolace probíhala podle návodu doporučeného výrobcem.

TAE pufr: 40 mM Tris base; 20 mM kyselina octová; 2 mM EDTA, pH 8,5.

### 3.6.4 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Kompetentní buňky byly připraveny a transformace *E. coli* plazmidovou DNA byla provedena podle (Inoue *et al.*, 1990). 100 ml SOB média bylo inokulováno 400  $\mu$ l přes noc narostlé buněčné kultury a buňky byly kultivovány při 18–20 °C do  $OD_{600} = 0,6$  při teplotě 37 °C. Kultura byla ochlazená 10 min na ledu, buňky stočeny 10 min, 2500 g při 4 °C a buněčná peleta resuspendována v 32 ml ledového TB pufru. Buňky inkubovány 10 min na ledu, stočeny 10 min, 2500 g při 4 °C a buňky resuspendovány v 8 ml TB pufru. K buňkám byl přidán dimetylsulfoxid ve výsledné koncentraci 7 %. Následovala inkubace 10 min na ledu a zmrazení buněk v kapalném dusíku. Kompetentní buňky byly uchovávány v -80 °C.

Složení TB pufru: 10 mM PIPES; 15 mM  $CaCl_2$ ; 250 mM KCl; pH 6,7; po sterilizaci filtrací bylo přidáno:  $MnCl_2$  do výsledné koncentrace 55 mM.

### 3.6.5 Transformace kompetentních buněk *E. coli* plazmidovou DNA

Pro transformaci bylo ke 100  $\mu$ l kompetentních buněk přidáno 10  $\mu$ l legační směsi a vše bylo inkubováno 30 min na ledu. Vzorky byly vystaveny tepelnému šoku 90 s při 42 °C, pak ochlazeny 90 s na ledu a po přidání 400  $\mu$ l LB média byly inkubovány 1 hod při

37 °C. Buňky byly vysety na misky s LB agarem a příslušným antibiotikem a inkubovány přes noc při 37 °C.

### 3.6.6 Transformace protoplastů streptomycet plazmidovou DNA

Do streptomycet byla plazmidová DNA přenesena metodou transformace protoplastů (Kieser *et al.*, 2000). Buňky z období přechodu do stacionární fáze růstu (začátek produkce RED) kultivované v YEME médiu s glycinem při 30 °C byly sklizeny centrifugací (1000 g, 10 min), peleta byla 2x promyta sterilní 10,3 % sacharózou, sediment byl resuspendován ve 4 ml lysozymového roztoku (1 mg/ml lysozymu v P pufru) a vzorky inkubovány 1 hod při 30 °C. Buňky byly promíchány protažením skleněnou pipetou (3x) a inkubovány 15 min při 30 °C. K buňkám bylo přidáno 5 ml P pufru, buňky byly opět promíchány protažením skleněnou pipetou (3x) a inkubovány dalších 15 min při 30 °C. V průběhu inkubace byl vznik protoplastů monitorován mikroskopicky. Protoplasty byly sterilně přefiltrovány přes vatou, stočeny 7 min, 1000 g a resuspendovány v 1 ml P pufru. Protoplasty byly v 50 µl alikvotech uchovávány v -80 °C. Pro přípravu protoplastů byly používány špičky a pipety s ustřiženým koncem.

Pro transformaci protoplastů streptomycet bylo smícháno 50 µl protoplastů s 5 µl plazmidové DNA, promícháno poklepem na mikrozkuhavku a přidáno 200 µl T pufru. Směs byla promíchána pomocí pipetmana (3x) a ihned nanesena na misky R2YE. Misky byly kultivovány při 30 °C a po 18–20 hod kultivace byly přelity 1 ml vody s příslušným antibiotikem a kultivovány další cca 3 dny při 30°C.

P pufr: na 80 ml roztoku: 10,3 g sacharózy; 0,025 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,202 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,2 ml roztoku stopových prvků (viz kap. 3.5.2); vše vyklávkováno a přidán sterilní 1 ml 0,5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 ml 3,68 % CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 10 ml 5,73 % TES pufru, pH 7,2.

T pufr: 2,5 ml 10,3 % sacharózy; 7,5 ml dest. H<sub>2</sub>O; 0,2 ml roztoku stopových prvků (viz kap. 3.5.2) a 1 ml 2,5 % K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 9,3 ml tohoto roztoku bylo smícháno s 0,2 ml 5 M CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O a 0,5 ml Tris-maleinového pufru (tj. 1M Tris upravený kys. maleinovou na pH 8,0).

### 3.6.7 PCR amplifikace a použité oligonukleotidy

Oligonukleotidy použité v této práci byly navrženy programem Primer 3 verze 0.4.0. (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a Primer select (Lasergene). Byly syntetizovány firmou Metabion International AG. Jejich seznam je, kromě oligonukleotidů navržených pro qRT-PCR uvedených v tab. 3-3 a oligonukleotidů pro analýzu koexprese uvedených v tab. 3-2, uveden v tabulce 3-1. Pro každý oligonukleotid je uveden název, sekvence, účel použití a případné umístění navrženého restričního místa. Pro kontrolní PCR reakce byla používána Taq polymeráza (Taq PCR Core Kit od firmy Qiagen). Složení reakční směsi a podmínky amplifikace byly dodržovány podle pokynů výrobce. Pro klonovací účely, při konstrukci expresních plazmidů, byla použita LA DNA polymeráza (Top-Bio). Složení reakční směsi a amplifikační podmínky byly dodržovány podle pokynů výrobce. Bezchybnost amplifikace byla ověřena sekvenací.

Gen	Označení primeru	Sekvence primeru ve směru 5'-3'	Účel použití
SCO2244	FwdpC	CGCCAAGGACAGCGGTGT	syntéza DNA sondy pro ověření $\Delta wdpC$
	RwdpC	ACCTCGCCTTCGCCGAA	
SCO5953	FwdpB	ATCACCTACAACATGTCCGA	syntéza DNA sondy pro ověření $\Delta wdpB$
	RwdpB	TCGCATTTGTGCGCGTTGAC	
SCO2244	F2wdpC	GTATCGAGGAATCGGCCTAC	PCR pro ověření $\Delta wdpC$
	R2wdpC	GTGACGAACCTGTGGGTGAG	
SCO5953	F2wdpB	GGTGTCTGAGCCTGTCCTA	PCR pro ověření $\Delta wdpB$
	RwdpB	TCGCATTTGTGCGCGTTGAC	
SCO5953	B3N_F	CGTAGAGCTCGGCGGCGGCAGGCAGGCGG	konstrukce expresního plazmidu pMALWDBg
	B3N_R	GCCAGGGAAGTGGTGGTG	

**Tab. 3-1: Seznam použitých oligonukleotidů pro ověření disruptivních konstruktů a pro konstrukci expresního plazmidu.** Podtržená sekvence označuje restriční místo pro enzym *SacI*.

### 3.6.8 Southernův přenos

Elektroforetický 0,8 % agarózový gel s rozdělenými restričními fragmenty chromozomální DNA byl umístěn na Hybond-N membránu (Amersham) na vakuovém zařízení VacuGene XL Vacuum Blotting Systém (GE Healthcare). Podtlakem byl gel promýván nejprve 2x 15 min denaturačním roztokem (1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH) a poté 2x 10 min neutralizačním roztokem (1 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,4). Samotný přenos probíhal 75 min v blokovacím roztoku 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M citrát sodný; pH 7,0). Po přenosu a oschnutí membrány byla DNA na membráně fixována 3–4 min pod UV zářením.

### 3.6.9 Příprava sond a hybridizace

Metoda hybridizace restrikčních fragmentů chromozomální DNA s příslušnou DNA sondou byla použita k ověření disruptčních mutantů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$ .

Digoxigeninem značené DNA sondy byly připraveny standardní PCR reakcí s Taq polymerázou a značeným 10 mM DIG-dUTP (Roche), 190  $\mu$ M dTTP, 200  $\mu$ M dATP, dGTP a dCTP (Promega). Oligonukleotidy použité pro přípravu DNA sond navržených pro ověření disruptčních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  jsou uvedeny v tab. 3-1. DNA sondy byly precipitovány z roztoku a rozpuštěny v TE pufru.

Hybond-N membránu (Amersham) s navázanou DNA byla prehybridizována v 20 ml hybridizačního roztoku 1 hod při 68 °C. Samotná hybridizace probíhala 16 hod při 68 °C ve 20 ml hybridizačního roztoku s denaturovanou (100 °C, 5 min) DNA sondou značenou digoxigeninem a poté následovalo promývání: 2x 5 min v 2x SSC roztoku s 0,1 % SDS při laboratorní teplotě a 2x 15 min v 0,1x SSC roztoku s 0,1 % SDS při 68 °C. Membrána byla rychle omyta pufr 1 s 0,3 % Tween 20, inkubována 30 min v 100 ml pufru 2. Poté byla inkubována 30 min ve 20 ml pufru 2 s protilátkou (1 : 5000) anti-digoxigeninem konjugovanou s alkalickou fosfatázou (Roche). Membrána byla promývána 2x 15 min ve 100 ml pufru 1, ekvilibrována 2 min ve 20 ml pufru 3 a inkubována ve tmě v 10 ml čerstvě připraveného roztoku barevného substrátu, který je katalytickým účinkem alkalické fosfatázy přeměňován na modrý nerozpustný precipitát. Reakce byla zastavena opláchnutím membrány destilovanou vodou.

Pufr 1: 0,1 M kys. maleinová; 0,15 M NaCl; pH 7,5

Blokovací zásobní roztok: blocking reagent (Roche) rozpuštěný v pufru 1 do finální koncentrace 10 %, promíchán, zahřán a klávkován

Pufr 2: blokovací zásobní roztok naředěný 1 : 10 v pufru 1

Pufr 3: 100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5

Roztok barevného substrátu: 45  $\mu$ l roztoku NBT (Sigma) a 35  $\mu$ l X-fosfátu (Sigma) v 10 ml pufru 3

Hybridizační roztok: 5x SSC; 1 % blocking reagent (Roche); 0,1 % N-lauroylsarcosine (Sigma); 0,02 % SDS

## 3.7 Manipulace s RNA

Všudypřítomné RNázy značně komplikují práci s RNA, a proto bylo nutné dodržovat některá nezbytná a zvláštní opatření při manipulaci s RNA. Veškeré použité sklo bylo sterilizováno 4 hod v troubě při 180 °C a materiál z plastu přes noc při 130 °C. Pro práci s RNA byly použity RNase-free špičky s filtrem (Axygen) a RNase-free mikrozkušavky (Axygen). Roztoky byly připravovány z 2x klávanované deionizované H<sub>2</sub>O (sterilizace 2x 20 min při 120 °C). Pipetmany a pracovní plocha byly vždy před prací otřeny roztokem RNaseZap<sup>®</sup> (Sigma).

### 3.7.1 Izolace celkové RNA ze streptomycet

Izolace RNA byla provedena podle Mikulíka a spol. (2008). Vzorky určené pro izolaci RNA byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru při 30 °C. Skalpelem sklizené mycélium z cca ½ kultivačnisky bylo přeneseno do mikrozkušavky určené pro mechanické rozbíjení buněk se skleněnými kuličkami o průměru 0,1 mm (Biospec) a 0,5 ml ledové RNA Blue (Top-Bio). Vzorky byly mechanicky dezintegrovány v homogenizátoru Fast Prep (Qbiogene) celkem v pěti cyklech. Každý cyklus trval 25 s při rychlosti 5,5 m/s a mezi jednotlivými cykly byly vzorky chlazeny 2 min na ledu. K buňkám bylo přidáno 25 µl 10 % N-lauroyl-sarcosinu (Sigma), vzorky byly protřepány a ponechány 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 120 µl chloroformu, vzorky byly promíchány a stočeny 10 min, 12000 g při 4 °C. Po stočení byla odebrána vodní fáze a extrakce v RNA Blue a chloroformu byla opakována. Vzorky byly opět stočeny, k vodní fázi byl přidán 0,1 objem 3M octanu sodného a 1 objem izopropanolu. Poté byly vzorky promíchány, inkubovány 20 min na ledu a stočeny 10 min, 12000 g při 4 °C. Peleta byla promyta v 800 µl 70 % etanolu a vzorky byly opět stočeny 5 min, 12000 g při 4 °C. Peleta byla sušena na vzduchu po dobu 5 min a poté rozpuštěna ve 200 µl RNase-free H<sub>2</sub>O. Vzorky byly uchovávány v -80 °C.

Zbytková kontaminující DNA byla odstraněna ze vzorků působením DNázy I (RNase-free Dnase Set od firmy Qiagen) dle instrukcí v manuálu výrobce. Na závěr byly vzorky přečištěny přes kolonky z komerční soupravy RNeasy Mini Kit (Qiagen) dle instrukcí v manuálu.



Koncentrace izolované celkové RNA byla stanovena spektrofotometricky absorbcí při 260 nm a čistota vzorku byla zkontrolována z naměřeného poměru absorbcí  $A_{260}/A_{280}$ , který nebyl u použitých vzorků nižší než 1,8. Kvalita izolované RNA byla testována pomocí elektroforézy v 1,5 % TAE-agarózovém gelu a posuzovaná podle integrity ribozomálních 23S a 16S rRNA. Proužky 23S a 16S rRNA na gelu by měly být ostré a jejich poměr by měl být přibližně 2:1.

### 3.7.2 Reverzní transkripce

Pro syntézu cDNA byla použita reverzní transkripáza Superscript III (Invitrogen). 5 µg totální RNA bylo smícháno s 2 µg náhodných primerů (Invitrogen) a doplněno vodou do 8,8 µl. Směs byla inkubována 10 min při 70 °C a poté ochlazena 2 min na ledu. Následně byly do reakční směsi přidány: 3 µl 5x First-strand buffer, 0,3 µl 25 mM dNTPs (Promega), 0,4 µl RNasin (Promega), 1,5 µl 0,1 M DTT a 1 µl Superscript III. Směs byla inkubována 10 min při 25 °C a samotná reverzní transkripce probíhala 2 hod při 50 °C. Následovala inaktivace reakce 15 min při 70 °C. Vzorky byly uchovávány v -80 °C.

### 3.7.3 Kotranskripční analýza a RT-PCR

Pro semikvantitativní analýzu metodou RT-PCR byla použita Taq polymeráza (Taq PCR Core Kit od Qiagenu). Složení reakční směsi a podmínky amplifikace byly dodržovány podle pokynů výrobce. Na jednu reakci bylo použito 20–50 ng templátové cDNA. Jako negativní kontrola byla použita cDNA syntetizovaná bez přídavku reverzní transkriptázy.

Seznam oligonukleotidů použitých pro koexpresní analýzu je uveden v tab. 3-2. Kromě sekvence, označení oligonukleotidu a jeho zkratky je v tabulce uvedena kombinace páru použitých oligonukleotidů a velikost jejich PCR produktu. Použité oligonukleotidy byly navrženy jednak pro ověření přítomnosti jednotlivých testovaných genů a jednak pro testování přítomnosti transkriptu společného vždy pro dva sousední testované geny (viz obr. 4-11 a 4-12).

Gen	Označení primeru	Zkratka	Sekvence ve směru 5'-3'	Kombinace primerů / velikost PCR produktu	
				jednotlivé geny	koexprese sousedních genů
SCO2244	wdpC_downF	Fa	CTCACCCACAAGTTCGTCAC	Fa + Ra / 103 pb	
	wdpC_downR	Ra	GCCAGGTTCCACAGGAGTA		
	R2wdpC_up	Re	GTGCGTCCGAGGTAGACG		
SCO2245	SCO2245_F	Fb	ATGACCGGTAAGGACACACC	Fb + Rb / 188 pb	Fb + Re / 319 pb
	SCO2245_R	Rb	ACGAACATCGTCCAGGTCAC		Fc + Rb / 536 pb
SCO2246	SCO2246_F	Fc	TCCGGAACTCAGTTTTGTCC	Fc + Rc / 100 pb	Fd + Rc / 788 pb
	SCO2246_R	Rc	CTCCACTTCCAGCAGGTGTT		
SCO2247	SCO2247_F	Fd	AAATCCCGACAGGCTAATC	Fd + Rd / 134 pb	
	SCO2247_R	Rd	ATACGGCCACTGTGTCCTC		
SCO5951	SCO5951_R	R1	GTGTTGAGCAGCGCTAGTA	F1 + R1 / 236 pb	F1 + R2 / 1043 pb
	SCO5951_F	F1	GTCGTGAGGACGCTCGAC		
SCO5952	SCO5952_R	R2	ATGGTGATCGCCAGGTACTC	F2 + R2 / 237 pb	F2 + R3 / 930 pb
	SCO5952_F	F2	ACTGAGCGAACTGACCTTCG		
SCO5953	wdpB_upR	R3	CTCGAAGTACCCGACAGAC	F3 + R3 / 153 pb	F4 + R5 / 1334 pb
	wdpB_upF	F3	GCCAAGGAGATCGAGTTCTG		
	FwdpB	F4	ATCACCTACAACATGTCCGA		
SCO5954	SCO5954R	R5	GAGGTTCTCGAAGGCGTAGT	F5 + R5 / 120 pb	
	SCO5954F	F5	CTCAAGGTCGGGTACTTCGT		

**Tab. 3-2: Seznam použitých oligonukleotidů pro kotranskripční analýzu.** Navržené oligonukleotidy byly použity jednak pro amplifikaci části jednotlivých genů a jednak pro amplifikaci části vždy dvou sousedních genů.

### 3.7.4 Microarray analýza

Vzorky určené pro izolaci RNA byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru při 30 °C a sklizeny v době, kdy se začínal projevovat u mutantních kmenů aberantní fenotyp; tj. v 48. hod. kultivace byl sklizen kmen  $\Delta wdpB$  a v 64. hod. kultivace kmen  $\Delta wdpC$ . Divoký kmen byl sklizen v obou zmíněných časech. Následovaná izolace celkové RNA probíhala podle protokolu uvedeného v kap. 3.7.1.

Kompletní analýza transkriptomu od syntézy cDNA až po normalizaci získaných dat byla provedena komerční firmou Oxford Gene Technology (Velká Británie). Syntéza cDNA probíhala v přítomnosti fluorescenčně značeného nukleotidu Cy3-, resp. Cy5-dCTP. DNA microarrays analýza byla provedena ze tří nezávislých experimentů v tzv. „dye swap“ uspořádání, kdy byl jeden vzorek značen nejprve fluorescenčním nukleotidem Cy3-dCTP a druhý fluorescenčním nukleotidem Cy5-dCTP a pak obráceně. Směs vzorků Cy3-cDNA a Cy5-cDNA byla nanensena na jeden DNA čip a hybridizována. Na jednom hybridizačním skle byly vždy porovnávány dva kmeny: divoký typ M145 vs. mutantní

kmen  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$ . Celkově bylo provedeno 6 hybridizací ze 3 nezávislých izolací RNA divokého a mutantního kmene  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$ . Získané poměry fluorescence Cy3/Cy5 byly transformovány jako  $\log_2 x$  a data byla normalizována podle lineární LOWESS normalizace. Získaná normalizovaná data byla zprůměrována a následně byla určena statistická významnost změny exprese jednotlivých genů pomocí Studentova *t*-testu v programu Microsoft Excel. Jako statisticky významné geny s ovlivněnou expresí u mutantních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  byly považovány geny s minimální změnou exprese 2x a zároveň s hladinou významnosti *P*-value menší než 0,05. V ojedinělých případech byla u skupin genů, u nichž bylo prokázáno významné ovlivnění exprese, dodatečně zvolena vyšší hladina významnosti *P*-value za účelem detekování případných dalších funkčně příbuzných genů, které mohou být kontrolovány produktem genu *wdpB*, resp. *wdpC*. Výsledky získané analýzou transkripčních profilů byly u vybraných genů ověřeny prostřednictvím kvantitativní PCR v reálném čase (viz kap. 3.7.5).

### 3.7.5 qRT-PCR

Metodou kvantitativní PCR v reálném čase byly ověřeny výsledky získané analýzou transkripčních profilů pomocí technologie DNA microarray a navíc byla tato metoda použita ke stanovení změny exprese vybraných genů v čase, a to jak pro disruptční mutanty  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$ , tak pro nadprodukcující kmeny *wt* + pWDS41 a *wt* + pWDC622.

Oligonukleotidy určené pro kvantitativní PCR v reálném čase byly navrženy pro vybrané geny pomocí programů Primer 3 verze 0.4.0. (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a Primer select (Lasergene). Navržené oligonukleotidy splňovaly následující kritéria: délka oligonukleotidů 15–21 pb, teplota tání 56–60 °C a délka PCR produktu v rozmezí přibližně 80–200 pb. Seznam všech použitých oligonukleotidů (a tedy i testovaných genů) je uveden v tabulce 3-3.

PCR reakce byla provedena pomocí 2x koncentrované komerční soupravy SYBR<sup>®</sup> Green JumpStart<sup>™</sup> Taq ReadyMix<sup>™</sup> for Quantitative PCR (Sigma), který obsahoval PCR mix složený z fluorescenční barvičky SybrGreen I, DNA polymerázy, dNTPs a reakčního pufru. K této směsi byla přidána jako referenční fluorescenční barvička fluorescein ve finální koncentraci 12,5 nM, 20 ng testovaná cDNA a příslušné oligonukleotidy ve finální koncentraci 0,5 μM. Ve výjimečných případech bylo přidáno do PCR reakční směsi ještě aditivum DMSO ve výsledné koncentraci 4 %, které zvyšuje

účinnost a specificitu PCR zejména u GC bohatých organismů a lze jej použít i v qRT-PCR (Jung *et al.*, 2001).

Amplifikace cDNA probíhala na cycleru iQ5 real-time PCR detection system (BioRad) vždy v triplikátech pro každý ze tří nezávislých experimentů, pouze negativní kontrola, kterou představuje PCR reakce bez předešlé reverzní transkripce, byla provedena v duplikátech. PCR reakce probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 94 °C, 2 min; následovalo 45 amplifikačních cyklů složených ze tří kroků: denaturace 94 °C, 15 s, hybridizace oligonukleotidů 56–60 °C 25 s a prodlužování řetězce 72 °C 25 s; závěrečná analýza teplot tání produktů: 95 °C 1 min, 54 °C 1 min a gradient 54–94 °C, kdy se každých 10 s mění teplota o 0,5 °C. Specificita PCR produktů byla ověřena analýzou disociačních křivek (teplot tání).

Ze získaných dat byla metodou relativní kvantifikace podle Pfaffla (Pfaffl, 2001), tzv.  $\Delta\Delta C_T$  metoda, stanovena změna exprese u vybraných testovaných genů, kdy se mezi sebou porovnávají hladiny exprese genů u mutantů a divokého kmene. Gen *hrdB* (SCO5820) kódující vegetativní sigma faktor u *S. coelicolor* byl použit jako referenční gen, jehož exprese je konstantní v celém průběhu životního cyklu, a to jak u divokého kmene, tak u mutantů *ΔwdpB* a *ΔwdpC* a která se používá pro normalizaci výsledných dat.

Gen	Označení primeru	Sekvence ve směru 5'-3'	Gen	Označení primeru	Sekvence ve směru 5'-3'
SCO0194	SCO0194F	GTA <sup>CTCG</sup> ACC <sup>CG</sup> CTACT <sup>GCT</sup>	SCO4677	SCO4677F	G <sup>CTCAC</sup> CCT <sup>GTAC</sup> GT <sup>CGTC</sup> GC <sup>TC</sup>
	SCO0194R	G <sup>CGTC</sup> AGG <sup>TCC</sup> CT <sup>CGTAG</sup> AAG		SCO4677R	G <sup>TCCG</sup> GAG <sup>G</sup> CAG <sup>GCTTTT</sup>
SCO0492	SCO0492F	T <sup>TTCG</sup> T <sup>CTCC</sup> AGAA <sup>CTTCT</sup>	SCO5074	SCO5074F	CAC <sup>CCCG</sup> T <sup>CTAC</sup> GACT <sup>ACG</sup>
	SCO0492R	ACC <sup>CAGT</sup> GAA <sup>GGG</sup> ATAG <sup>TG</sup>		SCO5074R	CT <sup>GGTT</sup> G <sup>TACT</sup> CGG <sup>C</sup> GAAG
SCO0498	SCO0498F	ACAG <sup>CGG</sup> CTGAT <sup>GGACT</sup> AC	SCO5080	SCO5080F	G <sup>T</sup> CAG <sup>CGT</sup> CGT <sup>GGAT</sup> CACT
	SCO0498R	AC <sup>TTCT</sup> CCCG <sup>TACAT</sup> CTG		SCO5080R	CT <sup>GTC</sup> GAC <sup>GAT</sup> CCCG <sup>TACT</sup>
SCO0828	SCO0828F	G <sup>CGCT</sup> ACT <sup>CGCT</sup> CTACA <sup>AGA</sup>	SCO5085	SCO5085F	T <sup>GGG</sup> AC <sup>GTG</sup> TCCAT <sup>GTAAT</sup> C
	SCO0828R	CG <sup>TAGT</sup> T <sup>GTCT</sup> CG <sup>GTCT</sup> CG		SCO5085R	CACA <sup>ACTC</sup> CTCGAT <sup>GAGCAC</sup>
SCO1674	SCO1674F2	G <sup>GTGGG</sup> GACC <sup>ACTCG</sup> AC	SCO5087	SCO5087F	AG <sup>GAG</sup> CT <sup>GTT</sup> CGG <sup>ATTGA</sup> AG
	SCO1674R2	GG <sup>CTTG</sup> TCC <sup>GGG</sup> TATC		SCO5087R	GAG <sup>GTG</sup> AGCAG <sup>TTC</sup> CCAGA
SCO1675	SCO1675F	GG <sup>CAAC</sup> GT <sup>CGTT</sup> CAG <sup>GTT</sup>	SCO5318	SCO5318F	GAT <sup>GAGT</sup> CCAT <sup>CAAGT</sup> CCA
	SCO1675R	TC <sup>ACTT</sup> G <sup>TGAT</sup> GCAG <sup>ACGTT</sup>		SCO5318R	CG <sup>TAGT</sup> CCAG <sup>GTC</sup> GACTC
SCO1800	SCO1800F	CC <sup>GGT</sup> G <sup>GCCT</sup> GAT <sup>CG</sup>	SCO5321	SCO5321F	CT <sup>CTT</sup> CCACA <sup>ACGT</sup> CAG <sup>CAT</sup>
	SCO1800R	G <sup>TTG</sup> ACC <sup>GGG</sup> GAT <sup>GTGG</sup> AT		SCO5321R	G <sup>TTC</sup> TCG <sup>TCC</sup> GT <sup>CAGG</sup> TAGC
SCO1845	SCO1845F	ACAG <sup>GAT</sup> CTCCA <sup>AGGGT</sup> CTC	SCO5819	SCO5819F	GAG <sup>GAC</sup> GT <sup>CCAG</sup> CAG <sup>AGG</sup>
	SCO1845R	G <sup>T</sup> CAG <sup>GAG</sup> T <sup>TCC</sup> AG <sup>AGG</sup> AT		SCO5819R	AG <sup>GGT</sup> G <sup>TG</sup> GA <sup>ACTCG</sup> GTATC
SCO2217	SCO2217F	ACA <sup>CAAG</sup> AAA <sup>ACG</sup> CCG <sup>TACA</sup>	SCO5877	SCO5877F2	GAC <sup>CTG</sup> T <sup>TG</sup> GAC <sup>GA</sup> ACT <sup>GT</sup>
	SCO2217R	TAGA <sup>AGT</sup> TGG <sup>CC</sup> AG <sup>ACC</sup> AG		SCO5877R2	AC <sup>GCT</sup> CG <sup>T</sup> TGAC <sup>ACTTTT</sup> C
SCO2244	wdpC_downF	CTC <sup>ACCC</sup> ACA <sup>AGTT</sup> CG <sup>TCAC</sup>	SCO5881	SCO5881F	CAT <sup>CAGA</sup> AAC <sup>CAT</sup> CAC <sup>CGA</sup> AG
	wdpC_downR	GCC <sup>AGT</sup> TCC <sup>ACAG</sup> GAG <sup>T</sup> A		SCO5881R	CC <sup>CTG</sup> GG <sup>T</sup> CAG <sup>T</sup> AAG <sup>AGG</sup> AG
SCO2245	SCO2245_F	ATG <sup>ACCG</sup> GTAAG <sup>ACAC</sup> ACC	SCO5953	wdpB_upF	GCC <sup>AAG</sup> GAG <sup>AT</sup> CGAG <sup>TCT</sup> CTG
	SCO2245_R	ACG <sup>AAC</sup> AT <sup>CGT</sup> CCAG <sup>GTC</sup> AC		wdpB_upR	CTC <sup>GAAG</sup> TAC <sup>CCCG</sup> ACAG <sup>AC</sup>
SCO2717	SCO2717F	GG <sup>CAAC</sup> GT <sup>CAT</sup> CCAG <sup>GTT</sup>	SCO5954	SCO5954F	CT <sup>CAAG</sup> T <sup>CGG</sup> GACT <sup>TCT</sup> CGT
	SCO2717R	CAG <sup>TCG</sup> T <sup>TCT</sup> CG <sup>CACT</sup> TGTT		SCO5954R	GAG <sup>GTT</sup> CT <sup>CGA</sup> AG <sup>GCG</sup> TAGT
SCO2718	SCO2718F	AG <sup>CTG</sup> TCG <sup>CTGG</sup> TCG <sup>AG</sup>	SCO6029	SCO6029F	ACC <sup>CTC</sup> T <sup>CTCG</sup> GAG <sup>ACC</sup>
	SCO2718R	AG <sup>GAC</sup> G <sup>TGAT</sup> GT <sup>CCTGG</sup> AT		SCO6029R	TGAC <sup>GAC</sup> G <sup>TAG</sup> CC <sup>CTT</sup> GAC
SCO2719	SCO2719F	G <sup>TACT</sup> T <sup>CGG</sup> CA <sup>ACTCG</sup> ATGA	SCO6073	SCO6073F	ACT <sup>TCT</sup> TCG <sup>GCT</sup> CG <sup>ACTAT</sup>
	SCO2719R	ACC <sup>AGAC</sup> CGAT <sup>GACACT</sup> GAC		SCO6073R	GAG <sup>AGCT</sup> GGA <sup>AGT</sup> CG <sup>T</sup> CGTA
SCO3217	SCO3217F	T <sup>GCGT</sup> ACT <sup>ACCT</sup> GAT <sup>GCTC</sup>	SCO6099	SCO6099F	GAC <sup>CTG</sup> CG <sup>CAT</sup> CG <sup>AGTC</sup>
	SCO3217R	AG <sup>GT</sup> CG <sup>G</sup> TAC <sup>CCAG</sup> TCAAG		SCO6099R	CAG <sup>TCC</sup> CT <sup>TTC</sup> GG <sup>T</sup> GAG
SCO3230	SCO3230F	AAC <sup>GT</sup> CG <sup>TAC</sup> GG <sup>CTCT</sup> TCTC	SCO6273	SCO6273F	GAG <sup>ATG</sup> AT <sup>GAC</sup> GT <sup>CGG</sup> ACAC
	SCO3230R	CAC <sup>ACG</sup> AGA <sup>AAGT</sup> CGA <sup>AGG</sup>		SCO6273R	GG <sup>CCAC</sup> ATA <sup>CTTCT</sup> CGA <sup>ACA</sup>
SCO3231	SCO3231F	GAG <sup>AT</sup> CGAA <sup>ACC</sup> CC <sup>CTCAC</sup>	SCO6277	SCO6277F	CA <sup>ACA</sup> AC <sup>CTC</sup> CT <sup>CGG</sup> TGAC
	SCO3231R	CAC <sup>GTG</sup> T <sup>TCT</sup> CG <sup>T</sup> GTATC		SCO6277R	GG <sup>TG</sup> AC <sup>GTACT</sup> CT <sup>CGG</sup> TCT
SCO3236	SCO3236F	TT <sup>CCT</sup> G <sup>CCG</sup> GAGA <sup>AGA</sup> AC	SCO6279	SCO6279F	GG <sup>TCT</sup> TCG <sup>GCTACT</sup> TCG <sup>T</sup> C
	SCO3236R	G <sup>TTC</sup> TCG <sup>T</sup> TG <sup>GAA</sup> CG <sup>TCA</sup>		SCO6279R	T <sup>CTCT</sup> CG <sup>TCCG</sup> TGAC <sup>ATA</sup> C
SCO3476	SCO3476F	GAT <sup>CAT</sup> CA <sup>ACT</sup> CG <sup>ATCAC</sup>	SCO6681	SCO6681F	GAG <sup>ACT</sup> G <sup>GCCG</sup> GAG <sup>TAC</sup> ACC
	SCO3476R	AT <sup>TCA</sup> TTG <sup>CAC</sup> AG <sup>GC</sup> TTG		SCO6681R	CAG <sup>GTG</sup> TTGA <sup>AGAC</sup> CACAC
SCO3480	SCO3480F	GG <sup>CTA</sup> CAC <sup>CTAC</sup> CG <sup>GTCAA</sup>	SCO6682	SCO6682F	AC <sup>CTG</sup> CA <sup>GTC</sup> GAT <sup>G</sup> GGAG <sup>AC</sup>
	SCO3480R	TCG <sup>ACT</sup> G <sup>CCAT</sup> AT <sup>TCT</sup> CTCG		SCO6682R	TAC <sup>AGT</sup> G <sup>GTG</sup> AT <sup>GCT</sup> CAGG
SCO3483	SCO3483F	AAC <sup>GCT</sup> AT <sup>CCG</sup> CT <sup>TCTTA</sup>	SCO6685	SCO6685F	ACT <sup>GCT</sup> CAG <sup>ATCCG</sup> AC <sup>GAC</sup>
	SCO3483R	AAG <sup>GCG</sup> GT <sup>CGT</sup> GTAG <sup>TCTC</sup>		SCO6685R	TCC <sup>GTCC</sup> AC <sup>GAC</sup> ACAG <sup>AC</sup>
SCO4002	SCO4002_F	ACG <sup>ACA</sup> ACA <sup>ACG</sup> CA <sup>ACTC</sup>	SCO6992	SCO6992F	GG <sup>ACCT</sup> TCCACA <sup>ACAT</sup> CT <sup>CG</sup>
	SCO4002_R	CT <sup>GTT</sup> GAT <sup>CGAC</sup> GTGA <sup>AG</sup>		SCO6992R	GGAGA <sup>ACGG</sup> G <sup>TACT</sup> CCAT <sup>G</sup> A
SCO4142	SCO4142F2	CGA <sup>AGA</sup> AAG <sup>GTCT</sup> GCA <sup>AGGAC</sup>	SCO7035	SCO7035F	CT <sup>GAT</sup> GAC <sup>CTCCG</sup> AGAT <sup>G</sup> G
	SCO4142R2	TT <sup>GGT</sup> GAT <sup>TGCT</sup> GT <sup>CGAA</sup>		SCO7035R	GAGA <sup>ACCAG</sup> CGGA <sup>AGAACT</sup> C
SCO4173	SCO4173F	CT <sup>GCT</sup> G <sup>GACT</sup> CG <sup>CTCTG</sup>	SCO7257	SCO7257F	GAAG <sup>GAAG</sup> CGGA <sup>AGGATTC</sup>
	SCO4173R	C <sup>CTC</sup> T <sup>GCAC</sup> GA <sup>AGAC</sup> CTG		SCO7257R	GAG <sup>TCG</sup> T <sup>CGT</sup> CG <sup>ACTCGT</sup>
SCO4174	SCO4174F	GACT <sup>GCC</sup> CTAC <sup>GAG</sup> AG <sup>TG</sup>	SCO7701	SCO7701F	GCAC <sup>AGC</sup> GAG <sup>TAC</sup> GAGA <sup>AGA</sup>
	SCO4174R	GG <sup>TGG</sup> TCC <sup>GGAT</sup> GGA <sup>AC</sup>		SCO7701R	GAG <sup>GTGG</sup> TCCAT <sup>GAG</sup> GA <sup>ACT</sup>
SCO4175	SCO4175F	AAC <sup>AGA</sup> ACC <sup>GGCC</sup> ACT <sup>AC</sup>	SCO5820	hrdB	CG <sup>GT</sup> CAG <sup>CTT</sup> CA <sup>ACT</sup> GTCT
	SCO4175R	AG <sup>CGT</sup> CG <sup>GAG</sup> CAG <sup>CAC</sup>	(hrdB)	hrdBR	GTAC <sup>ACTT</sup> G <sup>CCG</sup> AT <sup>TCT</sup> CGT
SCO4214	SCO4214F2	AT <sup>CGAC</sup> CG <sup>TTAT</sup> CCG <sup>TGTG</sup>			
	SCO4214R2	G <sup>CTGG</sup> TAG <sup>GGAG</sup> TGAC <sup>GAAC</sup>			

Tab. 3-3: Seznam oligonukleotidů použitých pro qRT-PCR.

## 3.8 Manipulace s proteiny

### 3.8.1 Izolace proteinů ze streptomycet

Buňky byly sklizeny z mR3 misek v různých vývojových stádiích a resuspendovány v ledovém standardním pufru (20 mM Tris; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) s 1x koncentrovaným koktejlem inhibitorů proteáz „Complete, EDTA-free“ (Roche). K suspenzi byl přidán lysozym ve finální koncentraci 2 mg/ml a buňky byly inkubovány 40 min na ledu. Buňky byly dezintegrovány sonikací 4x 15 s a mezi jednotlivými cykly byly vzorky chlazeny 1 min na ledu. Poté byla přidána benzonáza (1 µg / ml) (Roche), vzorky byly inkubovány 10 min na ledu a stočeny 10 min, 9000 g při 4 °C. Získaný supernatant představoval celkový proteinový lyzát.

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena komerční soupravou BCA protein assay reagent (Pierce). Jako standard pro tvorbu kalibrační přímky byly použity různé koncentrace BSA.

### 3.8.2 SDS-PAGE a barvení gelů

Proteiny byly analyzovány na vertikální SDS-polyakrylamidové gelové elektroforéze (SDS-PAGE) v SDS-elektroforetickém pufru podle laboratorního manuálu (Ausubel *et al.*, 1995). Byl použit 7–12 % separační gel a 4 % zaostřovací gel. Na dráhu bylo nanášeno 30 µg celkového proteinového lyzátu. Proteiny rozdělené na SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF membránu, a nebo barveny pomocí Coomassie blue R-250 následujícím způsobem: (a) barvení gelu roztokem Coomassie blue (40% methanol, 10% kyselina octová, 0,1% Coomassie blue R-250) 30 min (b) odbarvení gelu odbarvovacím roztokem (40% methanol, 10% kyselina octová).

### 3.8.3 Westernův přenos („Western blotting“)

Za účelem imunodetekce byly proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE přeneseny western přenosem na PVDF membránu (Amersham) pomocí mokrého elektroblotu. Přenos probíhal 1 hod při 250 mA v přenosovém pufru o složení 48 mM Tris, 39 mM glycin, 0,04 % SDS, 20 % methanol. Pro potvrzení úspěšného přenosu byly nakonec proteiny na

membráně obarveny amidočerní (0,1 % amidočern; 25 % isopropanol; 10 % octová kyselina).

### 3.8.4 Imunodetekce

Imunodetekce imobilizovaných proteinů na PVDF membráně (Millipore) byla provedena pomocí komerčně dostupné soupravy ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham). Blokování membrány probíhalo přes noc a inkubace s králičí polyklonální protilátkou anti-WdpB či anti-WdpC trvala 1 hod (ředění 1 : 2000). Jako sekundární protilátka byla použita komerčně dostupná králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou od firmy Sigma (inkubace 1 hod; ředění 1 : 10000). Pro zachycení chemiluminiscenčního signálu byly použity rentgenové filmy MEDIX XBU (Foma Bohemia).

### 3.8.5 Příprava polyklonálních protilátek

Polyklonální protilátky anti-WdpB, resp. anti-WdpC byly produkovány ve dvou králících po několikanásobné inokulaci purifikovaným fúzním proteinem WdpB-MBP, resp. WdpC-MBP (0,3–0,5 mg na jednu dávku) s nekompletním adjuvans. Z odebraného séra byla izolována IgG frakce (Harboe a Ingild, 1973), která byla dále čištěna pomocí afinitní chromatografie. Purifikované antigeny (fúzní proteiny WdpB-MBP, resp. WdpC-MBP) byly navázány na aktivovanou NHS-Sepharosu (N-hydroxysuccinimide-Sepharosa), a takto vytvořené afinitní nosiče byly použity na purifikaci IgG protilátek ze séra vazbou na příslušný antigen. Afinitní chromatografie probíhala podle instrukcí doporučených výrobcem NHS-Sepharosy (GE Healthcare). Koncentrace purifikovaných IgG protilátek v roztoku byla stanovena z hodnot naměřených při  $A_{280}$  a pomocí vzorce  $A_{280} = 1,34 \times \text{koncentrace IgG (mg/ml)}$ . Pro imunodetekci byly protilátky dále ředěny v poměru až 1 : 2000.

## 3.9 Stanovení růstové křivky a koncentrace antibiotik

### 3.9.1 Stanovení růstové křivky

Kinetika růstu byla stanovena jako přírůstek suché biomasy v čase. Divoký kmen a oba disruptční kmeny  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru s celofánem při 30 °C a mycélium bylo skalpelem sklizeno v různých časových intervalech. Sklizené mycélium bylo přeneseno do předem zvážených mikrozkušavek a sušeno při 105 °C přes noc až do momentu, kdy je hmotnost biomasy konstantní (Kaprálek, 1999). Zvážená hmotnost sušiny byla po odečtení hmotnosti mikrozkušavky a zprůměrnování hodnot ze čtyř nezávislých experimentů vynesena do grafu v závislosti na čase odběru kultury.

### 3.9.2 Stanovení undecylprodigosinu

Mycélium kultivované na mR3 agarových miskách o průměru 5 cm bylo sklizeno v různých časových intervalech skalpelem do 500  $\mu$ l chloroformu, důkladně promícháno a RED pigment byl extrahován inkubací 30 min na rotační míchačce za občasného důkladného promíchání na vortexu. Poté byly vzorky stočeny a ke chloroformovému extraktu byla přidána kapka koncentrované chlorovodíkové kyseliny, vzorky promíchány a chloroformový extrakt byl použit k spektrofotometrickému stanovení RED při  $A_{530}$  (Adamidis a Champness, 1992).

### 3.9.3 Stanovení celkového aktinorodinu

Stanovení celkového Act bylo provedeno podle upraveného protokolu z laboratorního manuálu *Practical Streptomyces Genetics* (Kieser *et al.*, 2000). Mycélium kultivované na mR3 agarových miskách o průměru 5 cm bylo včetně agaru sklizeno v různých časových intervalech skalpelem a nasekáno na drobné kousky. K takto sklizeným vzorkům bylo přidáno 10 ml 1N KOH, důkladně promícháno cca 30 s a stočeno 9000 g, 5 min při laboratorní teplotě. Extrahovaný Act v supernatantu byl použit k spektrofotometrickému stanovení Act při  $A_{640}$ .



### 3.10 Rastrovací elektronová mikroskopie

Mycélium streptomycet sklizené z mR3 či GYM misek s celofánem po kultivaci při 30 °C bylo fixováno v parách 2% vodného roztoku oxidu osmičelého po dobu několika dní. Poté byly vzorky vysušeny v exsikátoru v parách osmia. Suché vzorky byly pokryty vrstvou zlata (přibližně 20 nm) ve Sputter-Coateru (Polaron). Připravené preparáty byly pozorovány pomocí elektronového mikroskopu Aquasem (TESCAN, Brno) při napětí 15 kV.

### 3.11 Konstrukce disruptčních mutantních kmenů

U obou genů (*wdpB* a *wdpC*) byla podstatná část kódující sekvence nahrazena genem *aac(3)IV* pro apramycin acetyltransferázu, který je zodpovědný za rezistenci vůči apramycinu a umožňuje selekci připravených mutantních kmenů. Záměna divoké alely za mutantní byla provedena homologíí rekombinací za pomoci replikonu pGM160 s teplotně senzitivní replikací (Muth *et al.*, 1989). Správnost získaných rekombinantních delečních mutantů byla ověřena pomocí PCR s vhodně navrženými oligonukleotidy (viz tab. 3-1) a také prostřednictvím hybridizace restrikčních fragmentů chromozomální DNA s příslušnými neradioaktivně značenými DNA sondami (viz tab. 3-1).

#### 3.11.1 Konstrukce mutantu $\Delta wdpB$

Fragment *EcoRV-XhoI* z kosmidu St7H1 nesoucí gen *wdpB* byl vložen do vektoru pGEM-7Zf+ štěpeného restrikázami *SmaI-XhoI* za vzniku plazmidu pWDB1. Vnitřní fragment *EcoRI-BglIII* z plazmidu pWDB1 kódující sekvenci obsahující 2.–12. WD-40 doménu genu *wdpB* byl vyměněn za fragment *EcoRI-BamHI* vyštěpený z vektoru pAPR3 nesoucí gen kódující rezistenci k apramycinu. Fragment *XbaI-HindIII* ze vzniklého vektoru pWD $\Delta$ 1 byl vložen do vektoru pGM160 štěpeného *XbaI-HindIII* za vzniku plazmidu pWDBA1. Výsledný plazmid pWDBA1 byl izolován z *E. coli* XL1-Blue, transformován do *E. coli* GM2929 pro přípravu nemetylované DNA, opět izolován a transformován do protoplastů *S. colicolor* M145. Selekcce rekombinantních delečních kmenů byla provedena podle Muth a spol. (1989).

### 3.11.2 Konstrukce mutantu $\Delta wdpC$

Při přípravě disruptivního kmene  $\Delta wdpC$  se nepodařilo jednoduše a najednou nahradit část kódující sekvence genu *wdpC* genem *aac(3)IV* kódujícím rezistenci k apramycinu, a proto bylo nutné postupně naklonovat levé a pak pravé rameno genu *wdpC* ke genu *aac(3)IV*. Jako ramena byly označeny ty části sekvence genu *wdpC*, které po nahrazení části kódující sekvence genu *wdpC* zůstávají přítomny v delečním konstrukt, obklopují gen pro rezistenci k apramycinu a jsou nezbytné pro homologii rekombinaci u *S. coelicolor*. Při konstrukci mutantního kmene  $\Delta wdpC$  se vycházelo z kosmidu St1G2 nesoucího gen *wdpC*. Fragment *Bgl*III kosmidu St1G2 byl vložen do vektoru pTZ18R štěpeného *Bam*HI za vzniku plazmidu pWDC1. Tento plazmid pWDC1 byl štěpen restriktázou *Apa*I. Poté byla restriktční reakce přesrážena a směs fragmentů zatupena Klenowem. Pomocí elektroforézy byla obě klonovaná ramena rozdělena a izolována z gelu (levé rameno: 2017 pb, pravé rameno: 2411 pb). Levé rameno genu *wdpC* bylo štěpeno *Nhe*I restriktázou a vzniklý fragment *Nhe*I-tupý konec (vzniklý zatupením *Apa*I konce) obsahující levou koncovou část *wdpC* genu byl vložen do vektoru pAPR3 štěpeného *Spe*I-*Sma*I za vzniku vektoru pWC31. Pravé rameno bylo štěpeno *Bam*HI a vzniklý fragment tupý konec-*Bam*HI (vzniklý zatupením *Apa*I konce) byl vložen do vektoru pTZ18R štěpeného *Bam*HI-*Sma*I za vzniku plazmidu pWC32. Fragment *Eco*RI-*Hind*III z pWC32 byl klonován do vektoru pBluescript II KS<sup>-</sup> a ze vzniklého vektoru pWC33 byl fragment *Eco*RI-*Xho*I klonován do vektoru pWC31 štěpeného *Eco*RI-*Sal*I za vzniku pWC34. *Xba*I fragment z tohoto plazmidu byl naklonován do vektoru pGM160 a výsledný plazmid pWC35 byl izolován z *E. coli* XL1-Blue, transformován do *E. coli* GM2929 pro přípravu nemetylované DNA, opět izolován a transformován do protoplastů *S. coelicolor* M145. Ve výsledném plazmidu pWC35 byla tedy sekvence kódující první tři WD-40 domény a část proteinkinázové domény nahrazena genem *aac(3)IV* pro rezistenci k apramycinu. Selektce rekombinantních delečních kmenů byla provedena podle Muth a spol. (1989).

### 3.12 Konstrukce kmenů s vyšším počtem kopií genů *wdpB*, resp. *wdpC* u *S. coelicolor*

Fragment *Hind*III-*Xba*I z plazmidu pWDB1 (viz kap. 3.11.1) byl vložen do vektoru pIJ486 za vzniku plazmidu pWDS41 nesoucího pravděpodobnou promotorovou oblast

a funkční geny SCO5952, *wdpB* (SCO5953) a část genu SCO5954. Výsledný plazmid pWDS41 byl izolován z *S. lividans* TK24 a transformován do protoplastů *S. colicolor* M145.

Při přípravě plazmidu pWDC622 nesoucího pravděpodobnou promotorovou oblast a geny SCO2242–5, tedy včetně genu *wdpC* (SCO2244) byl nejprve fragment *EcoRI-HindIII* vložen do vektoru pBluescript II SK<sup>-</sup> za vzniku plazmidu pWDC2. Z plazmidu pWDC2 byl poté vyštěpen fragment *PstI-SacI* a vložen do vektoru pIJ622. Výsledný plazmid pWDC622 byl také izolován z *S. lividans* TK24 a transformován do protoplastů *S. colicolor* M145.

### 3.13 Konstrukce nadprodukčních kmenů v *E. coli*

#### 3.13.1 Příprava expresních konstruktů

Při konstrukci expresního plazmidu nesoucího gen *wdpB* se vycházelo z PCR amplifikace 5'koncové sekvence genu *wdpB*, která byla ligována s 3' koncovou sekvencí *wdpB*. PCR produkt B3N ověřený sekvenací (použité oligonukleotidy viz kap. 3-1) byl štěpen restriktázami *SacI-EcoRI* a vložen do vektoru pGEM-7Zf+ do *SacI-EcoRI* místa za vzniku plazmidu pWDB3N. Z plazmidu pWDB1 byl vyštěpen fragment *EcoRI-XhoI* a vložen do místa *EcoRI-XhoI* na plazmidu pWDB3N. Ze vzniklého plazmidu pWDB3 byl klonován fragment *Ecl136II-XhoI* do vektoru pMALc2g štěpeného restriktázami *SnaBI-SalI*. Výsledný expresní plazmid pMALWDBg nesoucí kompletní gen *wdpB* byl nakonec transformován do expresního kmene *E. coli* CAG629.

Expresní plazmid pWDCM1D nesoucí C-koncovou část genu *wdpC* kódující WD-40 domény byl vytvořen vložením fragmentu *BamHI-XhoI* z pWDC1 do vektoru pMALc2g s maltózo-vázající kotvou (MBP) linearizovaného restriktázami *BamHI-SalI*. Výsledný ověřený plazmid pWDCM1D byl transformován do expresního kmene *E. coli* TB1. Žádné funkční konstrukty pro expresi kompletního genu *wdpC* či jeho proteinkinázové domény se připravit nepodařilo.

### 3.13.2 Exprese genů *wdpB*, resp. *wdpC* pomocí expresních plazmidů

Přes noc narostlá bakteriální kultura *E. coli* CAG629 nesoucí rekombinantní plazmid pMALWDBg byla inokulována do Rich média (10 g trypton; 5 g yeast extract; 5 g NaCl; 2 g glukóza) s tetracyklinem a ampicilinem a bakterie byly kultivovány při 30 °C. Při  $OD_{600} = 0,5$  byla syntéza proteinu WdpB-MBP indukována přidávkem 0,3 mM IPTG a po indukci byly buňky kultivovány 2–4 hod. Buňky byly sklizeny centrifugací 20 min, 4000 g při 4 °C, resuspendovány v kolonovém pufru (20 mM Tris-HCl; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM azid sodný) a zmrazeny v -20 °C přes noc. Poté byly buňky rozmrazeny v ledové vodě a za neustálého chlazení dezintegrovány sonikací v krátkých 15 s pulzech (celková doba sonikace 2 min). Vzorky byly stočeny 30 min, 9000 g a supernatant představující hrubý proteinový extrakt byl zamrazen v -80 °C.

Kultivace bakteriální kultury *E. coli* TB1 nesoucí rekombinantní plazmid pWDCM10 probíhala za stejných podmínek jako kultivace *E. coli* CAG629 s plazmidem pMALWDBg v tomto případě byla však použita kultivační teplota 37 °C a Rich médium pouze s ampicilinem. Indukce syntézy proteinu WdpC-MBP, sklizení buněk a izolace fúzního proteinu WdpC-MBP probíhaly rovněž za stejných podmínek jako u kmene *E. coli* CAG629 s plazmidem pMALWDBg.

Vzorky proteinů izolovaných z buněk před a po indukci byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE.

### 3.13.3 Purifikace fúzních proteinů

Fúzní proteiny WdpB-MBP, resp. WdpC-MBP byly z hrubého proteinového extraktu izolovány pomocí afinitní chromatografie podle instrukcí výrobce (pMAL™ Protein Fusion and Purification System Instruction Manual, New England Biolabs). Čisté fúzní proteiny byly použity na produkci a purifikaci králičích polyklonálních protilátek anti-WdpB a anti-WdpC (viz kap. 3.8.5).

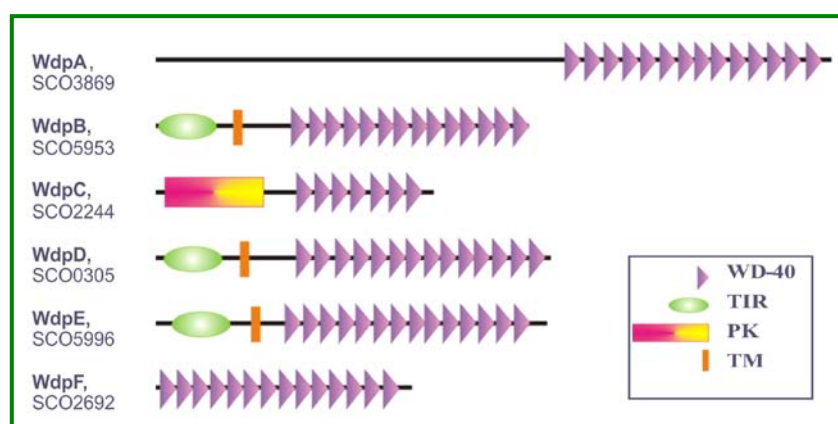
## 4. VÝSLEDKY

Experimentální část této dizertační práce navazuje na výsledky získané v rámci grantového projektu GA ČR 204/02-D120 řešeného v letech 2003–2005 „Eukaryotic-type regulatory proteins in streptomycetes: The role of WD-40 proteins and protein Ser/Thr kinases” (řešitel K. Petříčková). V této dizertační práci byly použity následující plazmidové konstrukty připravené řešitelkou výše zmíněného projektu: disruptční plazmidy pWDBA1 a pWC35, expresní plazmidy pMALWDBg a pWDCM1D a multikopiové plazmidy pWDS41 a pWDC622.

### 4.1 Genom *Streptomyces coelicolor* obsahuje 6 genů kódujících potenciální proteiny s WD-40 repetitivními doménami

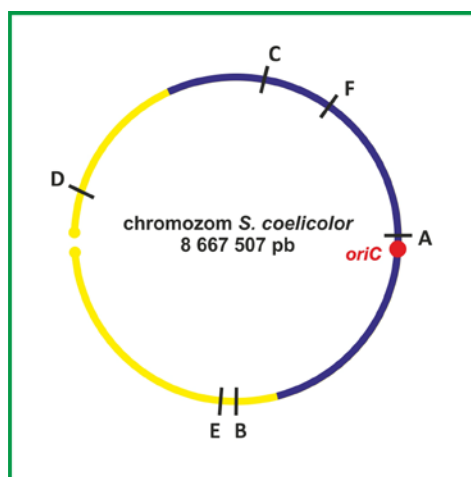
Jako modelový bakteriální organizmus byl zvolen bakteriální kmen *Streptomyces coelicolor* M145. Díky dokončené sekvenaci genomu *S. coelicolor* M145 (Bentley *et al.*, 2002) (<http://streptdb.streptomyces.org.uk>) bylo na základě sekvenční homologie zjištěno, že tento mikroorganismus nese 6 potenciálních genů, které kódují WD-40 repetitivní motivy. Tyto geny byly označeny jako *wdpA*, *B*, *C*, *D*, *E* a *F*. Schematické znázornění jednotlivých produktů těchto genů *wdp* u *S. coelicolor* je uvedeno na obr. 4-1.

Úkolem tohoto projektu je porozumět úloze 2 vybraných genů kódujících WD-40 proteiny. Jedná se o geny *wdpB* (SCO5953) a *wdpC* (SCO2244).



**Obr. 4-1: Schematické znázornění proteinů s WD-40 repetitivními doménami u *S. coelicolor*.** Kromě WD-40 domén se u těchto proteinů vyskytují další funkční domény: Toll a interleukin-1 receptorová doména (TIR), proteinkinázová doména (PK) a transmembránová doména (TM).

Rozložení genů *wdp* na chromozomu je znázorněno na obr. 4-2. Geny *wdpA*, *C* a *F* jsou umístěny v konzervativní části chromozomu (gen *wdpA* dokonce v blízkosti replikačního počátku *oriC*), zatímco geny *wdpB*, *D* a *E* jsou lokalizovány mimo konzervativní část na ramenech chromozomu.



**Obr. 4-2:** Rozmístění genů s WD-40 repeticemi na chromozomu u *S. coelicolor*. Modře je označeno konzervativní jádro chromozomu obsahující esenciální geny, žlutě ramena chromozomu nesoucí spíše postradatelné geny a červeně replikační počátek *oriC*.

## 4.2 Složení funkčních domén u genů *wdpB* a *wdpC* a analýza příslušných genových lokusů

Sekvenční analýza předpokládaného proteinu WdpB (SCO5953) odhalila přítomnost 14 WD repetice na C-konci. Na N-konci je lokalizovaná tzv. TIR doména, nazvaná podle tzv. Toll a interleukin-1 receptorů, u kterých byla poprvé popsána. Obě tyto domény jsou od sebe odděleny predikovaným transmembránovým úsekem. TIR domény se u eukaryot účastní protein-protein interakcí v různých signálních drahách, ovlivňují např. embryonální vývoj, či hrají klíčovou roli v přirozené antibakteriální a antifungální imunitní odpovědi. U prokaryot se však vyskytují pouze zřídka a jejich funkce není známa. Před genem *wdpB* se na chromozomu nachází gen SCO5951 kódující domnělý transkripční regulátor, který je podobný regulátoru pro export antibiotik u *S. hygroscopicus*. Dále pak gen SCO5952 kódující membránový protein, který těsně navazuje na gen *wdpB* a pravděpodobně s ním vytváří transkripční jednotku. Před genem *wdpB* není konsenzuální ribozomální vazebné místo. Za genem *wdpB* leží gen SCO5954 kódující předpokládaný sekretovaný protein podobný chitinázám.

Předpokládaný protein WdpC (SCO2244) má na N-konci Ser/Thr proteinkinázovou doménu eukaryotického typu a na C-konci 7 WD repetit. Protein WdpC je složením funkčních domén podobný proteinu PkwA z termofilní aktinomycety *Thermomonospora curvata* (Petrickova *et al.*, 2006). Před genem *wdpC* se ve stejném směru transkripce nachází malý gen SCO2245 kódující protein podobající se řadě hypotetických proteinů ve streptomycetách, jako např. produktu genu ORFD z lokusu *abaA*, který ovlivňuje produkci antibiotik (Fernandez-Moreno *et al.*, 1992). Za genem *wdpC* leží v opačném směru čtení gen SCO2243 kódující předpokládaný transkripční regulátor z rodiny TetR regulátorů; TetR řídí expresi *tet* genů zodpovědných za rezistenci vůči tetracyklinu.

### 4.3 Disrupce genů *wdpB* a *wdpC* u *S. coelicolor* M145 a jejich fenotypový projev

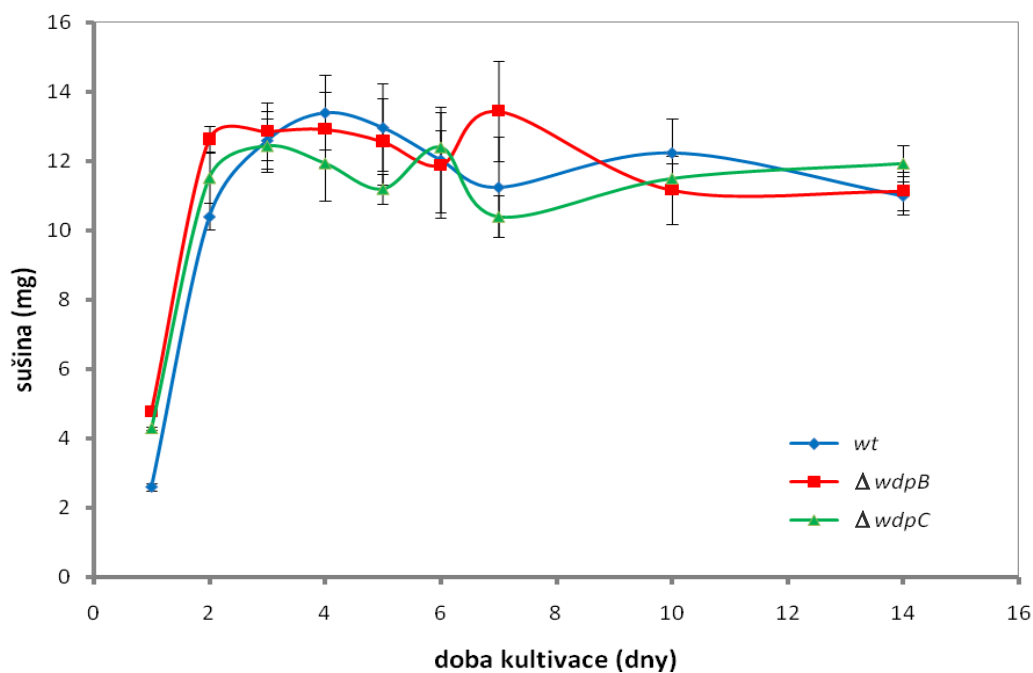
#### 4.3.1 Příprava disrupčních mutantních kmenů

Za účelem objasnění, jakou úlohu v životním cyklu streptomycet hrají produkty genů *wdp*, jsme se pokusili připravit disrupční mutanty ve třech ze šesti potenciálních genů kódujících WD-40 domény, což se u dvou genů ze tří, u genů *wdpB* (SCO5953) a *wdpC* (SCO2244), podařilo. U genu *wdpA* (SCO3869) se delečního mutantu připravit nezdařilo (Petříčková, nepublikováno). Protože gen *wdpA* leží v konzervované části chromozomu *S. coelicolor* a navíc se nachází v blízkosti replikačního počátku, lze se domnívat, že by se mohlo jednat o esenciální gen. Tato práce se bude nadále zabývat pouze geny *wdpB* a *wdpC*.

U genů *wdpB* a *wdpC* byla podstatná část kódující sekvence vyjmuta a nahrazena genem *aac(3)IV* pro apramycin acetyltransferázu, udějující mutantním kmenům rezistenci k apramycinu a umožňující selekci rekombinantních delečních mutantů. Proces výměny divokých alel za mutantní byl proveden prostřednictvím homologní rekombinace s využitím plazmidu s teplotně senzitivní replikací pGM160. Správnost připravených mutantních kmenů byla ověřena pomocí PCR s vhodně navrženými oligonukleotidy (viz tab. 3-1), a také pomocí hybridizace restrikčních fragmentů chromozomální DNA s příslušnými DNA sondami (viz tab. 3-1).

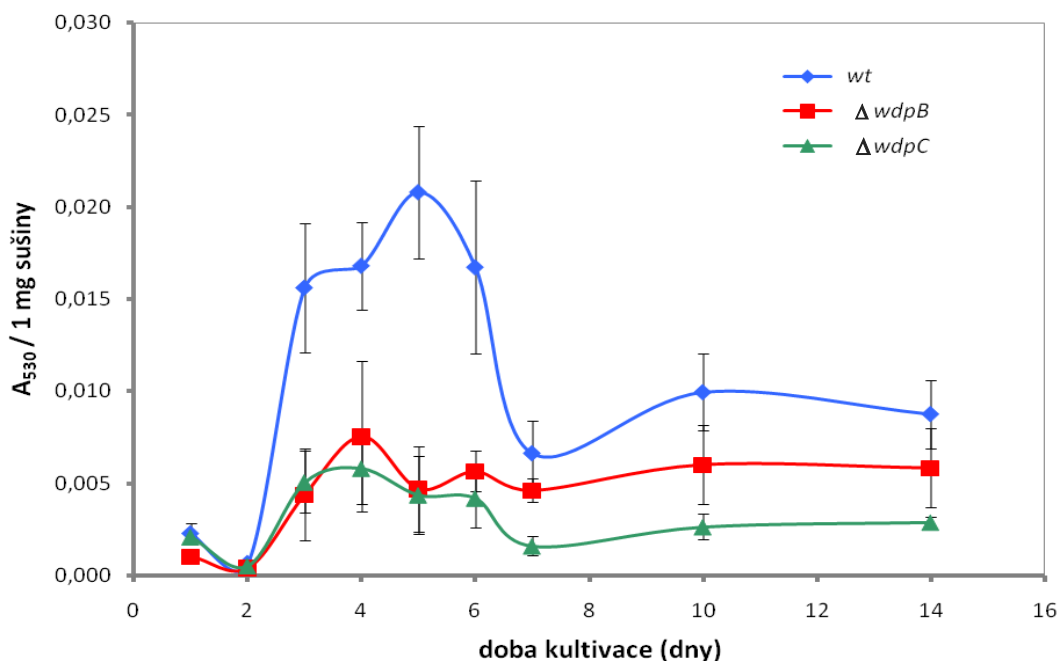
### 4.3.2 Vliv mutantních kmenů $\Delta wdpB$ a $\Delta wdpC$ na produkci sekundárních metabolitů

Za účelem charakterizace fenotypových projevů byly připravené mutantní kmeny  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  kultivovány paralelně s divokým typem na několika minimálních a kompletních médiích, agarových i tekutých. Bylo zjištěno, že u obou mutantů dochází jednoznačně ke změnám ve fenotypu ve srovnání s divokým kmenem, avšak míra fenotypového projevu je závislá na podmínkách kultivace. Nejvýraznějšího fenotypového rozdílu oproti divokému kmeni bylo dosaženo kultivací na modifikovaném R3 médiu. Pro otestování změn fenotypů u mutantních kmenů v porovnání s divokým kmenem byly použity metody stanovení produkce sekundárních metabolitů – aktinorodinu a undecylprodigosinu, což jsou dva nejčastěji používané a zároveň jednoduše stanovitelné znaky sekundárního metabolismu u *S. coelicolor*. Produkce undecylprodigosinu byla u obou mutantních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  ve srovnání s divokým typem výrazně snížena (graf 4-2). U mutantu  $\Delta wdpC$  je produkce aktinorodinu opožděna (graf 4-3; obr 4-3), zatímco mutant  $\Delta wdpB$  se v produkci aktinorodinu od divokého typu neliší. Růstová rychlost u obou mutantních kmenů měřená jako přírůstek sušiny v čase byla shodná s divokým typem (graf 4-1).

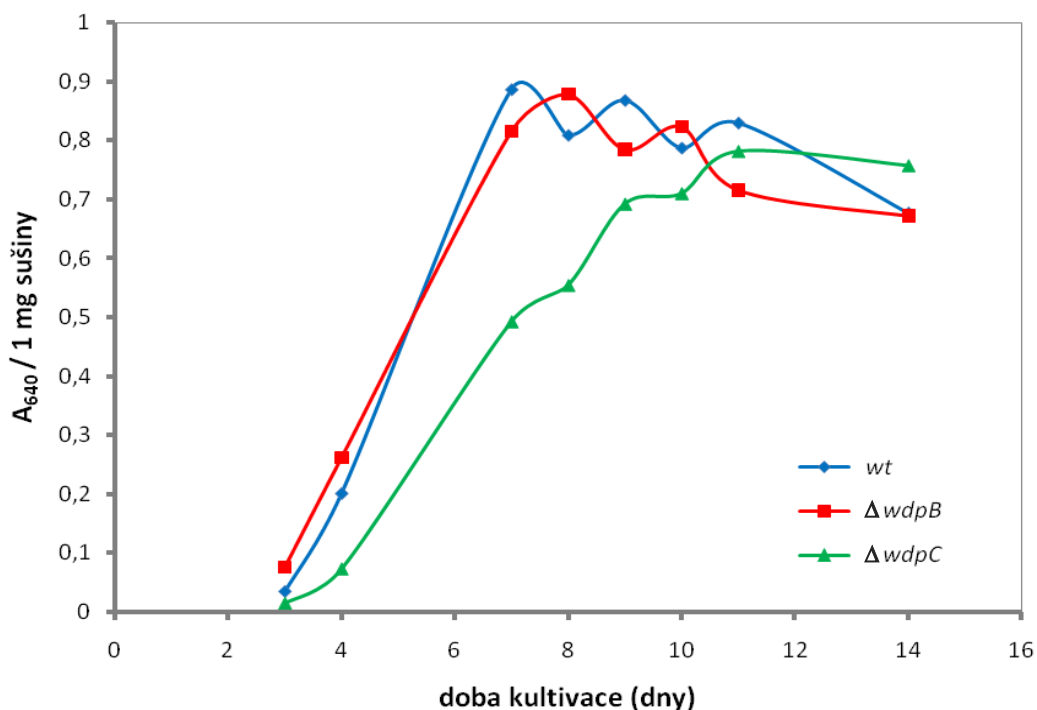


**Graf 4-1: Růstová křivka.** Divoký typ (*wt*) a oba mutantní kmeny  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru. Růstová kinetika byla sledována jako přírůstek suché biomasy v závislosti na čase. Celý experiment trval 14 dní. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze čtyř nezávislých měření provedených vždy ve dvou paralelách. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.





**Graf 4-2: Produkce undecylprodigiosinu.** Divoký typ (*wt*) a oba mutantní kmeny  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru. Produkce RED pigmentu v čase byla měřena spektrofotometricky jako  $A_{530}$  a vztahena na 1 mg biomasy. Celý experiment trval 14 dní. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze čtyř nezávislých měření provedených vždy ve dvou paralelách. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.



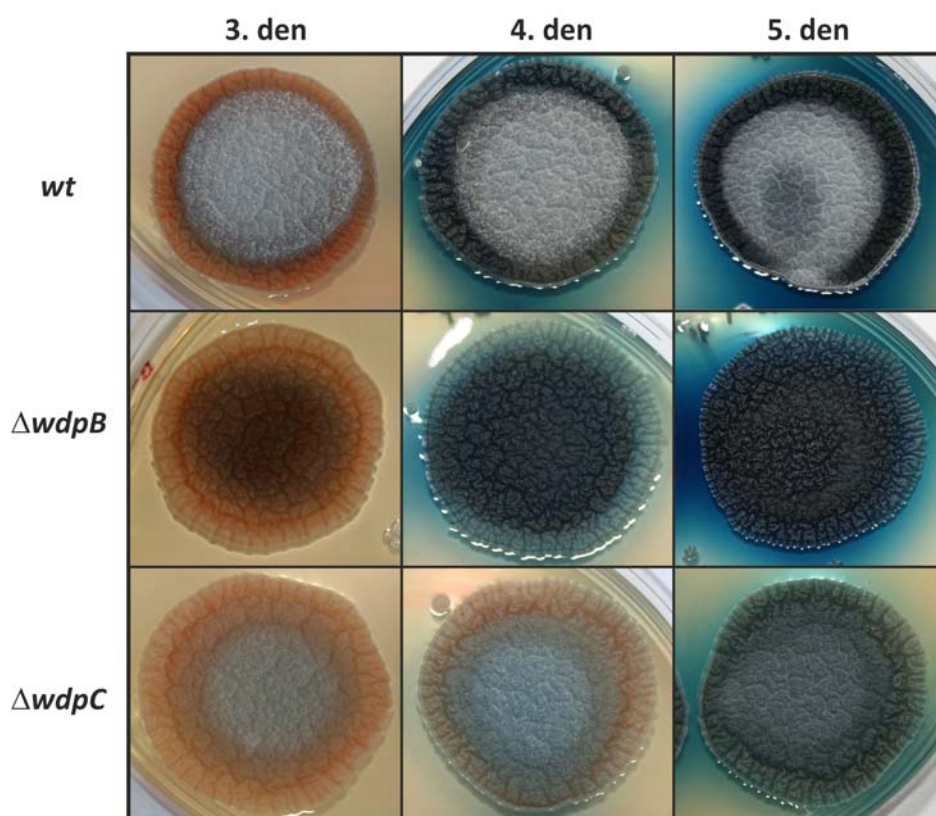
**Graf 4-3: Produkce aktinorodinu.** Divoký typ (*wt*) a oba mutantní kmeny  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru. Produkce Act pigmentu v čase byla měřena spektrofotometricky jako  $A_{640}$  a vztahena na 1 mg biomasy. Celý experiment trval 14 dní. Graf znázorňuje reprezentativní experiment ze tří nezávislých měření provedených vždy ve dvou paralelách.

### 4.3.3 Vliv mutantních kmenů $\Delta wdpB$ a $\Delta wdpC$ na morfologickou diferenciaci

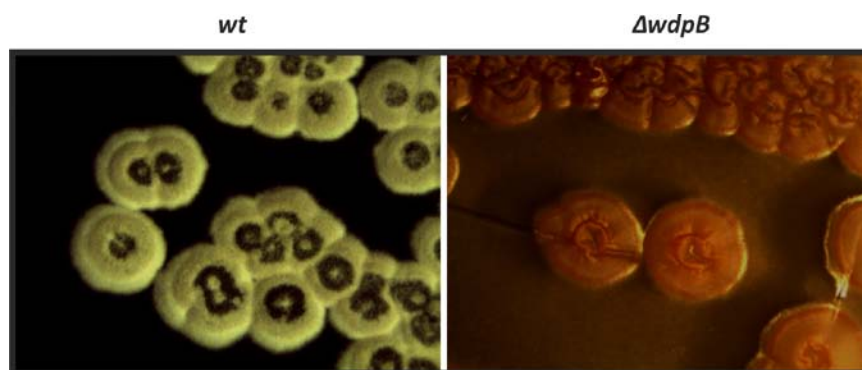
#### 4.3.3.1 Makroskopické snímky z kultivace na pevných půdách

Pro určení fenotypového projevu mutantních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  byly bakterie kultivovány na mR3 agaru a v různých vývojových stádiích byly pořízeny makroskopické snímky.

U mutantu  $\Delta wdpB$  byla zaznamenána prokazatelně výrazná redukce tvorby vzdušného mycélia na agarové plotně, potažmo defekt v buněčné diferenciaci (obr. 4-3; 4-4), zatímco u mutantu  $\Delta wdpC$  se tvorba vzdušného mycélia redukovala pouze nepatrně a víceméně se fenotypově podobal divokému kmeni (obr. 4-3).



**Obr. 4-3: Formování vzdušného mycélia u mutantních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  a produkce antibiotik ve srovnání s divokým typem.** Divoký kmen (*wt*) a oba mutantní kmeny  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  byly kultivovány 5 dní na modifikovaném R3 agaru. Snímky pocházejí ze 3., 4. a 5. dne kultivace. U mutantu  $\Delta wdpB$  byla pozorována výrazná redukce tvorby vzdušného mycélia a snížená produkce RED. U mutantu  $\Delta wdpC$  dochází k mírné redukci tvorby vzdušného mycélia v porovnání s divokým typem a ke zpomalení produkce Act a RED.



**Obr. 4-4:** Srovnání tvorby vzdušného mycélia u jednotlivých kolonií *wt* a  $\Delta wd p B$ . Snímky divokého a mutantního kmene  $\Delta wd p B$  byly pořízeny binokulární lupou (zvětšení 10x) na vzorcích po pětidenní kultivaci na mR3 agaru. Mutant  $\Delta wd p B$  je defektní v tvorbě vzdušného mycélia oproti divokému typu.

#### 4.3.3.2 Snímky z rastrovací elektronové mikroskopie

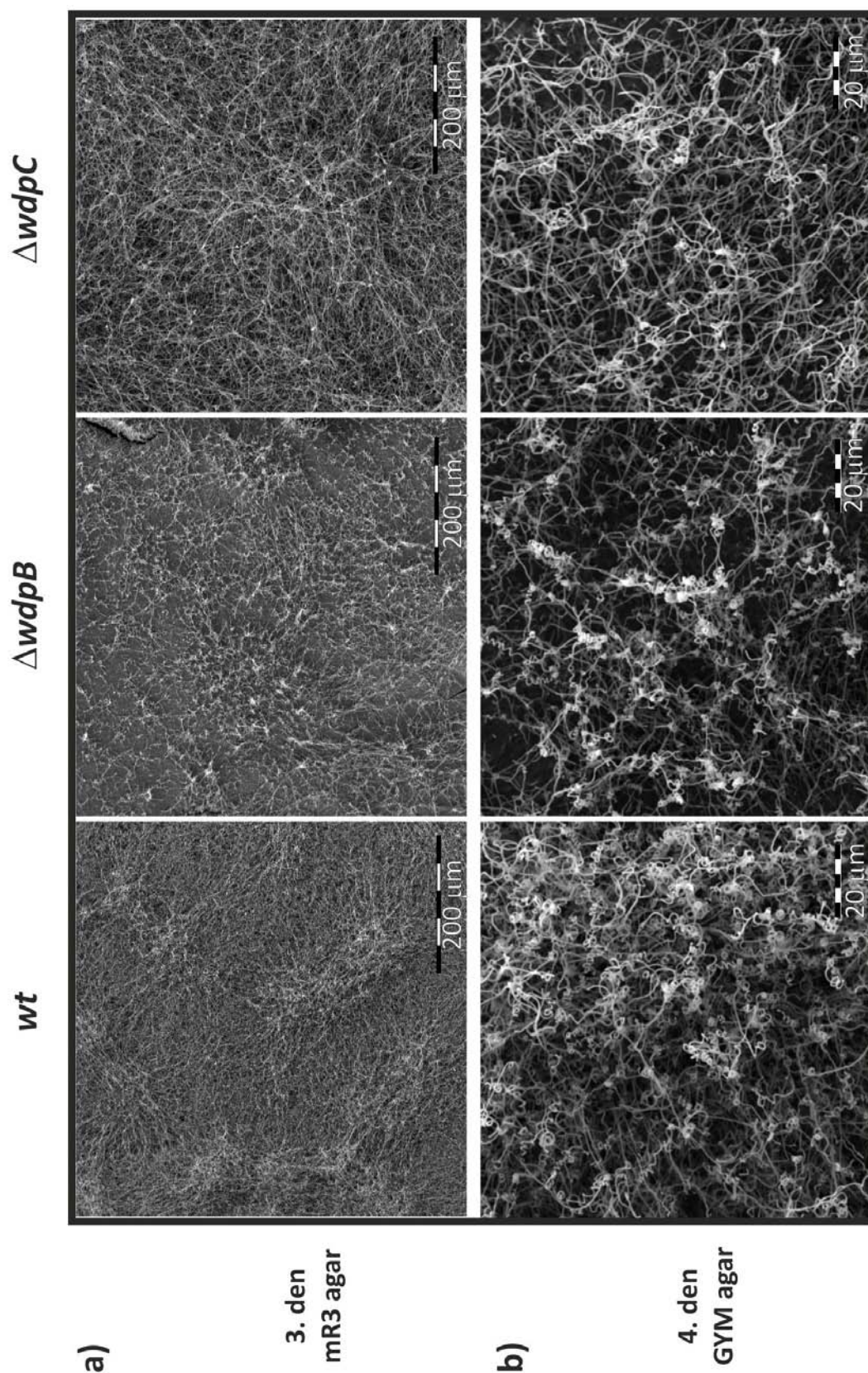
Pro podrobnější analýzu morfologie vzdušného mycélia byly mutantní kmeny podrobeny rastrovací elektronové mikroskopii, která potvrdila fenotypy pozorované již na agarových miskách: defekt ve vývoji vzdušného mycélia u mutantního kmene  $\Delta wd p B$  a zároveň nižší hustotu vzdušného mycélia u  $\Delta wd p C$  (obr. 4-5a, b).

Z důvodu snížené tvorby spór na modifikovaném R3 agaru byl pro další morfologické studie zvolen GYM agar, kde *S. coelicolor* roste pomaleji a sporulace je mnohem intenzivnější. Navíc fenotypový projev mutantních kmenů se zdá být na první pohled podobný fenotypu pozorovanému na miskách s modifikovaným R3 agarem.

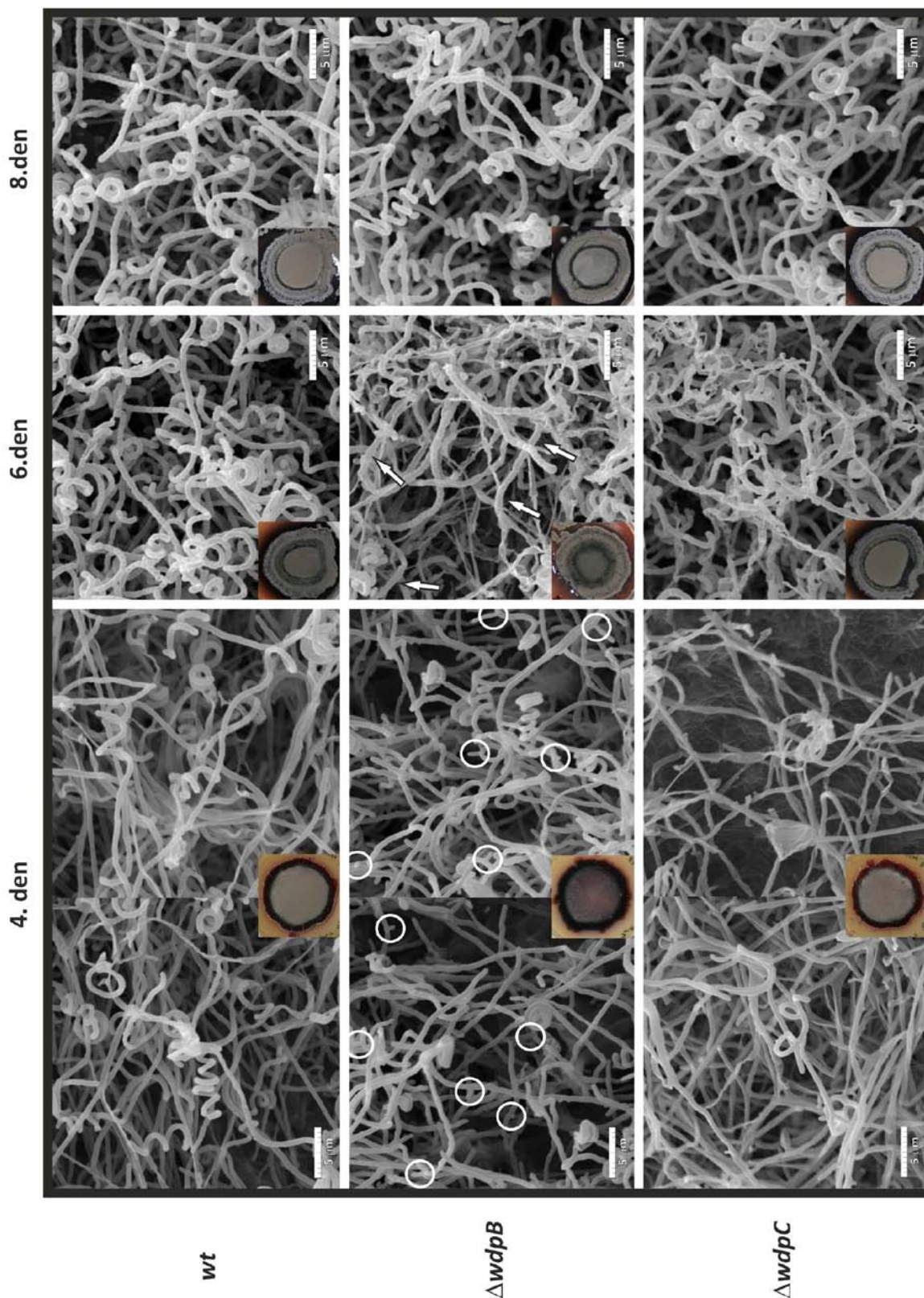
Po 6 dnech kultivace na GYM agaru se u obou mutantů objevuje častá předčasná lyze vláken, která je výrazná především u  $\Delta wd p C$  a na snímcích se projevuje v podobě prázdných pomačkaných vláken (obr. 4-6).

Po 4 dnech kultivace na GYM agaru docházelo u mutantního kmene  $\Delta wd p B$  k abnormálnímu větvení vzdušného mycélia (obr. 4-6). U tohoto kmene byla dále pozorována opožděná tvorba přepážek při sporulaci. Ke kompletní sporulaci s pravidelnými septy mezi jednotlivými spórami u  $\Delta wd p B$  docházelo až v 8. dni kultivace, zatímco u divokého typu byly řetězky spór s pravidelnými přepážkami patrné již 6. den (obr. 4-6).

U  $\Delta wd p C$  byl pozorován defekt v diferenciaci vzdušného mycélia ve srovnání s divokým kmenem. Zatímco u *wt* bylo možné pozorovat spirálovité stáčení vzdušných vláken již 4. den růstu, u  $\Delta wd p C$  se spirálovitě stočená vlákna objevují 4. den pouze výjimečně a k jejich typickému kroucení docházelo ve větší míře až 6. den růstu (obr. 4-5b, 4-6). 8. den se zdála být morfologie sporulujících vláken u mutantu  $\Delta wd p C$  shodná s *wt* (obr. 4-6).



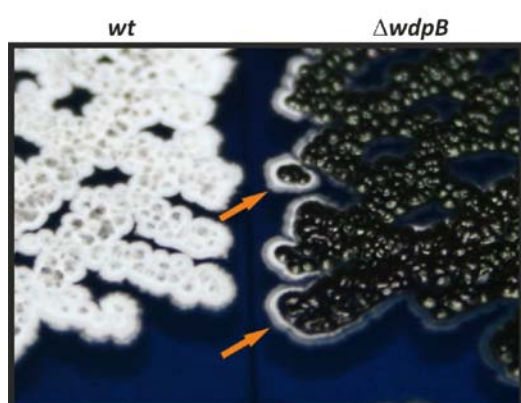
**Obr. 4-5: Snímky z elektronového mikroskopu – redukce tvorby vzdušného mycélia a morfologie vzdušného mycélia u  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  v porovnání s *wt*. U  $\Delta wdpB$  dochází ke značné redukci vzdušného mycélia, u  $\Delta wdpC$  je redukce vzdušného mycélia pouze mírnější (a). U mutanta  $\Delta wdpC$  je zpomalená tvorba typického spirálovitého stáčení vzdušných hyf na začátku sporulace, které se u něj po 4 dnech růstu vyskytují pouze sporadicky na rozdíl od *wt*. Tvorba spirálovitě stočených hyf je u  $\Delta wdpB$  podobná *wt* (b). Snímky byly pořízeny 3. den růstu z modifikovaného R3 agaru a 4. den z GYM agaru.**



**Obr. 4-6: Snímky z elektronového mikroskopu – morfologie vzdušného mycélia a sporulace u  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  v porovnání s *wt*. U  $\Delta wdpB$  dochází k aberantnímu větvení vzdušného mycélia (bílé kroužky). Navíc kmen  $\Delta wdpB$  částečně předčasně lyzuje a tvorba přepážek při sporulaci je opožděná (bílé šipky). U kmene  $\Delta wdpC$  dochází k výrazné předčasné lyzi vláken a k opoždění tvorby spirálovitě stočených vzdušných vláken. Bakterie byly kultivovány 8 dní na GYM agaru. Snímky byly pořízeny 4., 6., a 8. den kultivace. Ke každému snímku z elektronového mikroskopu byl přiřazen malý náhled makroskopického snímku kultury na agarové misce.**

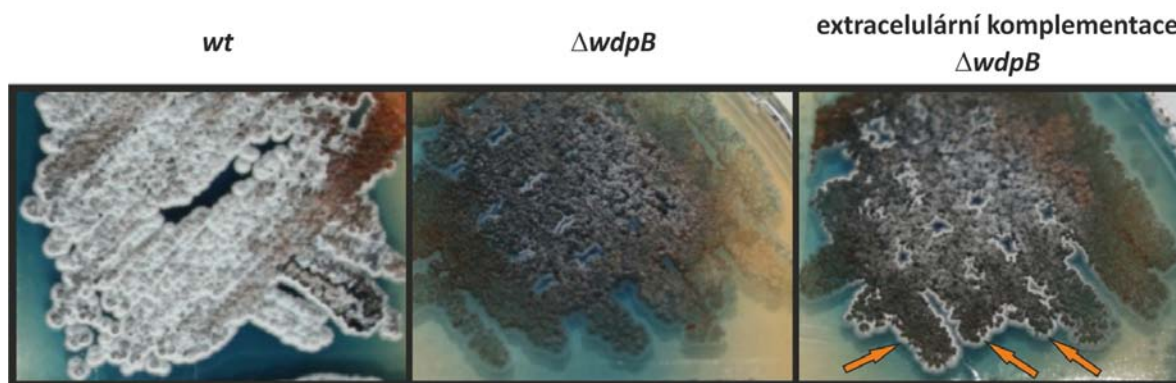
#### 4.4 Extracelulární komplementace mutantu $\Delta wdpB$

Jelikož mutantní kmen  $\Delta wdpB$  vykazoval na některých kultivačních půdách tzv. fenotyp *bld*, nastala otázka, zdali u něj nedochází k supresi fenotypu *bld* tzv. extracelulární komplementací, která je charakteristická pro mutanty *bld* (viz kap. 2.2.4.1). Proto byly bakterie divokého a mutantního kmene  $\Delta wdpB$  kultivovány v těsném sousedství a byl sledován efekt extracelulární komplementace. Z obrázku 4-7 jasně vyplývá, že u  $\Delta wdpB$  dochází částečně k obnovení tvorby vzdušného mycélia vlivem kultivace v blízkosti divokého kmene.



**Obr. 4-7: Stimulace tvorby vzdušného mycélia u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  při kultivaci v sousedství *wt*.** Bakterie *wt* a  $\Delta wdpB$  byly kultivovány ve vzájemné blízkosti na společné misce s modifikovaným R3 agarem po dobu 6 dní. Oranžovými šipkami jsou označena místa stimulace tvorby vzdušného mycélia u  $\Delta wdpB$  způsobená vlivem *wt* kultivovaného v blízkosti mutantu.

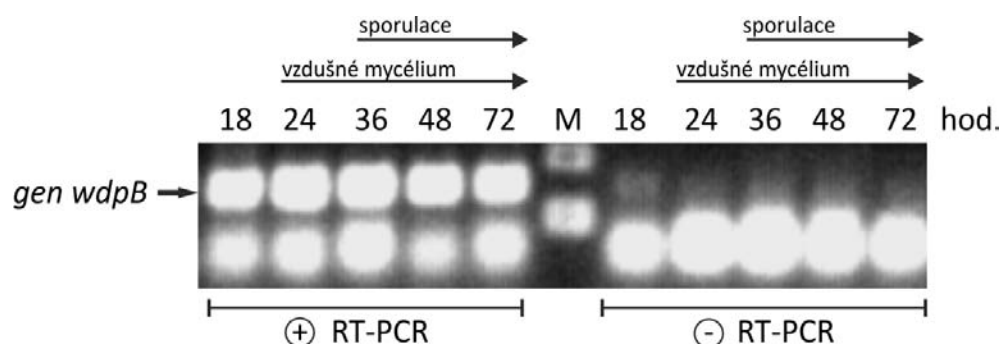
Při alternativním uspořádání experimentu bylo prokázáno, že ke stimulaci formování vzdušného mycélia dochází i po kultivaci mutantního kmene  $\Delta wdpB$  na agaru, na kterém byl původně kultivován divoký kmen, což dokazuje, že k extracelulární komplementaci  $\Delta wdpB$  není zapotřebí přímé přítomnosti mycélia divokého kmene (obr. 4-8).



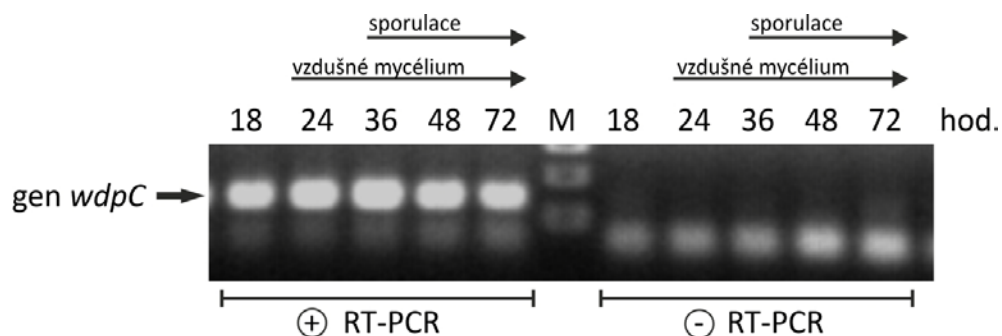
**Obr. 4-8: Stimulace tvorby vzdušného mycélia u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  médiem použitým pro kultivaci *wt*.** Po 98 hodinách (cca 4 dnech) kultivace byly pořízeny snímky bakterií kultivovaných na čerstvém modifikovaném R3 agaru (*wt* a  $\Delta wdpB$ ) a na agaru, kde byl původně kultivován divoký kmen (extracelulární komplementace  $\Delta wdpB$ ). Vzorek  $\Delta wdpB$  použitý pro testování extracelulární komplementace byl po 38 hodinách kultivace přenesen i s celofánem na misku, kde byl původně kultivován divoký kmen. Oranžové šipky označují výrazná místa stimulace formování vzdušného mycélia u mutantního  $\Delta wdpB$ , které je způsobeno účinkem extracelulární signální molekuly sekretované divokým kmenem.

## 4.5 Přepis genů *wdpB* a *wdpC* v průběhu životního cyklu

Testování transkripce genů *wdpB* (obr. 4-9) a *wdpC* (obr. 4-10) v různých vývojových fázích růstu pomocí metody RT-PCR ukázalo, že oba geny jsou přepisovány konstitutivně a jejich exprese není tudíž závislá na vývojovém stádiu mycélia. Pro tuto analýzu byly bakterie kultivovány na mR3 agaru a sklizeny v různých časových intervalech a z nich izolovaná celková RNA byla přepsána do cDNA a následně použita pro RT-PCR analýzu.



**Obr. 4-9: Přítomnost transkriptu genu *wdpB* stanovená metodou RT-PCR v průběhu životního cyklu *S. coelicolor* M145.** Celková RNA extrahovaná z mycélia po 18, 24, 36, 48 a 72 hodinách růstu na pevném mR3 agaru byla podrobena cDNA syntéze a následné RT-PCR. Pro RT-PCR byla použita cDNA syntetizovaná v přítomnosti (+) a v nepřítomnosti (-) reverzní transkriptázy. Gen *hrdB* byl použit jako referenční gen s konstantní expresí během životního cyklu (data nejsou prezentována). PCR produkty byly rozděleny v 1,5 % TAE-agarózovém gelu. M – marker molekulových hmotností



**Obr. 4-10: Přítomnost transkriptu genu *wdpC* stanovená metodou RT-PCR v průběhu životního cyklu *S. coelicolor* M145.** Celková RNA extrahovaná z mycélia po 18, 24, 36, 48 a 72 hodinách růstu na pevném mR3 agaru byla podrobena cDNA syntéze a následné RT-PCR. Pro RT-PCR byla použita cDNA syntetizovaná v přítomnosti (+) a v nepřítomnosti (-) reverzní transkriptázy. Gen *hrdB* byl použit jako referenční gen s konstantní expresí během životního cyklu (data nejsou prezentována). PCR produkty byly rozděleny v 1,5 % TAE-agarózovém gelu. M – marker molekulových hmotností

## 4.6 Analýza transkriptomů mutantních kmenů $\Delta wdpB$ a $\Delta wdpC$

Výrazné fenotypové změny u kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  naznačují, že by oba testované geny mohly hrát důležitou úlohu v diferenciaci a produkci sekundárních metabolitů. Proto byla provedena analýza transkripčních profilů u obou mutantních kmenů prostřednictvím metody DNA microarray (Oxford Gene Technology). Bakteriální kmeny byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru a jejich mycélium sklizeno v době, kdy se u mutantních kmenů začínal projevovat aberantní fenotyp; tj. v 48. hod kultivace byl sklizen kmen  $\Delta wdpB$  a v 64. hod kultivace kmen  $\Delta wdpC$ . Mycélium divokého kmene bylo sklizeno v obou zmíněných časech. Syntéza cDNA byla provedena v přítomnosti fluorescenčně značených nukleotidů Cy3-dCTP, resp. Cy5-dCTP v tzv. „dye swap“ uspořádání (viz kap. 3.7.4). Celkově bylo provedeno 6 hybridizací ze 3 nezávislých izolací RNA divokého a mutantního kmene  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$ . Získané výsledky byly ověřeny pomocí metody real-time PCR.

### 4.6.1 Transkriptom mutantního kmene $\Delta wdpB$

U mutantního kmene  $\Delta wdpB$  bylo identifikováno celkem 293 genů s významně změněnou hladinou exprese ( $\geq 2x$ ) v porovnání s divokým kmenem, což představuje téměř 4 % genomu *S. coelicolor*. Seznam vybraných genů uspořádaných podle funkce, jejichž exprese byla ovlivněna v mutantním kmeni  $\Delta wdpB$ , je uveden v tabulkách 4-1 a 4-2.

#### 4.6.1.1 Klasifikace genů se zvýšenou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpB$

Bylo identifikováno celkem 51 genů, jejichž hladina mRNA byla u  $\Delta wdpB$  zvýšena více než dvojnásobně v porovnání s *wt* (tab. 4-1). Kromě genů se zcela neznámou funkcí, které tvoří převážnou část této skupiny, dochází u  $\Delta wdpB$  ke zvýšení exprese genu kódující sporulační protein WhiI, který se podílí na tvorbě septa a kondenzaci nukleoidu ve sporách (Flärdh a Buttner, 2009), a také ke zvýšení exprese samotného genu *wdpB* (SCO5953) a k němu přilehlého genu SCO5954 (pravděpodobná chitináza) ve směru transkripce.



Kategorie	Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	P-value	Změna exprese
<b>1. Gen <i>wdpBa</i> sousední gen SCO5954</b>				
	SCO5953	<i>wdpB</i> , putative membrane protein with WD-40 repetitive domains	0,000	2,92
	SCO5954	probable chitinase (putative secreted protein)	0,001	12,43
<b>2. Sporulace</b>				
	SCO6029	<i>whiI</i> , two-component regulator	0,000	3,79
<b>4. Ostatní a hypotetické geny</b>				
	SCO7019	<i>aml</i> , secreted alpha-amylase	0,011	2,00
	SCO0983	<i>aceB2</i> , malate synthase	0,005	2,07
	SCO1739	putative DNA polymerase III, alpha chain	0,001	2,84
	SCO6479	probable secreted peptidase	0,006	2,53
	SCO6480	hypothetical protein	0,002	2,43
	SCO6481	conserved hypothetical protein	0,000	3,37

**Tab. 4-1: Seznam vybraných genů, jejichž exprese byla zvýšena u mutantu  $\Delta wdpB$  v porovnání s divokým kmenem M145.** Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpB$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná hodnota znamená, že exprese genů u  $\Delta wdpB$  se vůči divokému kmeni zvýšila. Použitá hladina významnosti *P*-value < 0,05.

#### 4.6.1.2 Klasifikace genů se sníženou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpB$

Celkem bylo identifikováno 242 genů, jejichž hladina mRNA byla u  $\Delta wdpB$  snížena více než dvojnásobně v porovnání s *wt* (tab. 4-2). U tohoto mutantu dochází k represí exprese genů kódujících proteiny, které se podílejí na tvorbě vzdušného mycélia – rodliny, chapliny a kompletní genový shluk *ram*. Dále se jedná o několik sporulační genů, a také o genové shluky pro syntézu následujících sekundárních metabolitů: coelichelinu, karotenoidů, kalcium-dependentního antibiotika, methylisoborneolu a geosminu. Posledními ovlivněnými skupinami genů se sníženou hladinou transkripce u  $\Delta wdpB$  jsou geny primárního metabolismu a dále řada neznámých genů.

**Chaplíny.** Snížená exprese byla zaznamenána u genů *chpB*, *C*, *D*, *E* a *H*, z čehož byl největší pokles transkripce zaznamenán u *chpC* (3,4x) a *chpD* (3,8x). Kromě jejich funkce ve formování vzdušného mycélia jsou chapliny společně s rodlinou zodpovědné za tvorbu tzv. „rodlet“ ultrastruktury (Claessen *et al.*, 2004; Claessen *et al.*, 2006) a dále hrají důležitou úlohu ve schopnosti přichycení bakterie *S. coelicolor* k podkladu (de Jong *et al.*, 2009b).

**Genový shluk *ram*.** Druhou skupinou morfogenu podílejících se na formování vzdušného mycélia, u které byla detekována snížená hladina exprese u mutantního kmene  $\Delta wdpB$ , je celý shluk *ram*, včetně genu *ramS* kódujícího povrchově aktivní peptid SapB.

**Rodliny.** Další skupinou genů, u nichž byla zaznamenána snížená hladina exprese u mutanta  $\Delta wdpB$ , jsou rodliny (*rdlA*, 13,5x a *rdlB*, 6,3x), které se zdá, že plní u *S. coelicolor* funkci především strukturní a spolu s chapliny vytvářejí charakteristickou povrchovou strukturu, tzv. „rodlet“ ultrastrukturu (Claessen *et al.*, 2004; Claessen *et al.*, 2006).

**Sporulační geny.** Mezi geny, jejichž exprese byla u mutanta  $\Delta wdpB$  reprimována, patří také sporulační gen *whiH* (2,6x) zodpovědný za tvorbu sept při sporulaci a za segregaci chromozomu při dělení buněk (Flärdh a Buttner, 2009) a gen *whiE-ORFVIII* (2,1x) podílející se na syntéze šedého sporulačního pigmentu. Další geny, u nichž byla zaznamenána snížená exprese u mutanta  $\Delta wdpB$ , jsou hypotetické geny SCO4675, SCO4676 a hned k nim přilehlý gen SCO4677 (*rsfA*) kódující anti-sigma faktor pro  $\sigma^F$ , který ovlivňuje pozdní sporulaci (viz kap. 2.2.6). Delece genu SCO4677 způsobuje zvýšení produkce Act a urychluje sporulaci (Kim *et al.*, 2008).

Posledním z genů uplatňujících se při morfologické diferenciaci jehož exprese byla u  $\Delta wdpB$  snížena, je gen *nepA* (2,6x), který je zodpovědný za udržení dormance u spór (de Jong *et al.*, 2009).

**Biosyntéza sekundárních metabolitů.** U celkem 26 genů CDA biosyntetického shluku z možných 40 byla zaznamenána 2–3x snížená exprese. Podobně byla zaznamenána 2–5,6x snížená exprese u genového shluku *crt* pro syntézu karotenoidů a cca 2x snížená exprese 6 z celkem 11 možných genů genového shluku *cch* pro biosyntézu coelichelinu. Dále téměř 3x sníženou expresi u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  vykazoval gen *geoA* (SCO6073) pro biosyntézu geosminu a 3–4x sníženou expresi vykazovaly geny SCO7700 a SCO7701 pro biosyntézu methylisoborneolu. V bezprostředním sousedství genu SCO7700 proti směru transkripce leží gen *eshA* (SCO7699), jehož exprese byla rovněž snížena. Jedná se o gen kódující protein sdílející značnou podobnost se sporulačním specifickým proteinem EshA *S. griseus* (Kwak *et al.*, 2001). U *S. coelicolor* ovlivňuje produkci Act (Kawamoto *et al.*, 2001). V neposlední řadě byla zaznamenána cca 3,5x snížená hladina transkripce genu *absR1*, což je potenciální aktivátor sekundárního metabolismu.

**Primární metabolismus.** Mezi geny primárního metabolismu, jejichž exprese byla výrazně snížena, patří komponenty regulonu PhoP, který umožňuje buňkám monitorovat dostupnost fosfátu. U mutanta  $\Delta wdpB$  je pozorována represe exprese operonu *pst* (vysokoafinitní systém pro transport fosfátu), genu *pitH2* (nízkoafinitní systém pro transport fosfátu) a genu *ppk* pro polyfosfátkinázu zajišťující reverzibilní polymeraci zásobního polyfosfátu. Kromě genů pro transport a ukládání fosfátu dochází u  $\Delta wdpB$  k snížení exprese genů pro metabolismus síry (2–5,4x), dusíku (2,3–2,7x), aminokyselin argininu

a prolinu (2–3,3x) a genů velkého genového shluku (SCO3472–3496) neznámé funkce s pravděpodobnou úlohou v metabolismu cukrů.

Začátek tab. 4-2

Kategorie	Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	P-value	Změna exprese*
<b>1. Tvorba a diferenciacie vzdušného mycélia</b>				
<b>a) Chapliny</b>				
	SCO7257	<i>chpB</i>	0,032	-2,11
	SCO1674	<i>chpC</i>	0,000	-3,40
	SCO2717	<i>chpD</i>	0,000	-3,83
	SCO1800	<i>chpE</i>	0,003	-1,76
	SCO1675	<i>chpH</i>	0,000	-2,66
<b>b) Rodliny</b>				
	SCO2718	<i>rdIA</i>	0,000	-13,50
	SCO2719	<i>rdIB</i>	0,001	-6,29
<b>c) Genový shluk ram</b>				
	SCO6681	<i>ramC</i> , putative serine/threonine protein kinase	0,001	-3,87
	SCO6682	<i>ramS</i> , surface-active peptide SapB	0,000	-5,95
	SCO6683	<i>ramA</i> , probable ABC transporter	0,003	-2,20
	SCO6684	<i>ramB</i> , probable ABC transporter	0,001	-2,42
	SCO6685	<i>ramR</i> , two-component system response regulator	0,004	-2,25
<b>d) Gen nepA</b>				
	SCO4002	<i>nepA</i>	0,000	-2,61
<b>2. Sporulace</b>				
	SCO5321	<i>whiE</i> , ORFVIII polyketide hydroxylase	0,011	-2,08
	SCO5819	<i>whiH</i> , sporulation transcription factor	0,004	-2,64
	SCO4675	conserved hypothetical protein	0,000	-2,69
	SCO4676	hypothetical protein	0,000	-2,00
	SCO4677	<i>rsfA</i> , putative regulatory protein (probably anti- $\sigma^F$ factor)	0,000	-2,04
<b>3. Sekundární metabolismus</b>				
<b>a) Kalcium-dependentní antibiotikum</b>				
	SCO6992	<i>absR1</i> , regulatory protein	0,013	-3,45
	SCO3210	probable 2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	0,010	-2,20
	SCO3214	<i>trpE2</i> , probable anthranilate synthase component I	0,018	-2,95
	SCO3215	hypothetical protein	0,002	-2,07
	SCO3218	putative small conserved hypothetical protein	0,003	-2,07
	SCO3220	putative secreted protein	0,000	-2,90
	SCO3221	probable oxidoreductase	0,000	-2,91
	SCO3222	possible small secreted protein	0,000	-2,55
	SCO3227	putative aminotransferase	0,001	-2,70
	SCO3229	putative 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	0,000	-2,97
	SCO3230	<i>cdaPS1</i> , CDA peptide synthetase I	0,004	-2,41
	SCO3231	<i>cdaPS2</i> , CDA peptide synthetase II	0,005	-2,14
	SCO3232	<i>cdaPS3</i> , CDA peptide synthetase III	0,016	-2,15
	SCO3233	probable hydrolase	0,001	-2,32
	SCO3234	possible phosphotransferase	0,000	-2,11
	SCO3235	probable ABC transporter	0,000	-2,07
	SCO3236	possible oxygenase	0,000	-2,36
	SCO3237	conserved hypothetical protein	0,009	-2,26
	SCO3239	conserved hypothetical protein	0,001	-3,22
	SCO3241	possible isomerase	0,019	-2,14
	SCO3243	possible myo-inositol phosphate synthase	0,000	-2,10
	SCO3244	putative secreted protein	0,000	-2,30
	SCO3245	possible salicylate hydroxylase (putative secreted protein)	0,004	-2,28

Pokračování tab. 4-2

Kategorie	Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	P-value	Změna exprese
<b>a) Kalcium-dependentní antibiotikum (pokračování)</b>				
	SCO3246	<i>fabH4</i> , probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase III	0,002	-3,12
	SCO3247	possible acyl CoA oxidase	0,002	-2,32
	SCO3248	<i>fabF3</i> , probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II	0,000	-2,51
	SCO3249	probable acyl carrier protein	0,000	-2,32
<b>b) Coelichelin</b>				
	SCO0489	conserved hypothetical protein	0,007	-2,59
	SCO0490	<i>cchJ</i> , putative esterase	0,017	-2,33
	SCO0492	<i>cchH</i> , putative peptide synthetase	0,022	-2,07
	SCO0494	<i>cchF</i> , putative iron-siderophore binding lipoprotein	0,010	-1,98
	SCO0498	<i>cchB</i> , putative peptide monooxygenase	0,012	-2,60
	SCO0499	putative formyltransferase	0,018	-2,27
<b>c) Karotenoidy</b>				
	SCO0191	<i>crtY</i> , probable lycopene cyclase	0,018	-2,18
	SCO0193	<i>litR</i> , putative DNA-binding regulator	0,000	-2,08
	SCO0194	<i>litS</i> , putative sigma factor	0,001	-5,58
	SCO0195	<i>litA</i> , putative lipoprotein	0,001	-3,64
	SCO0196	<i>litB</i> , hypothetical protein	0,002	-2,33
<b>d) Methylisoborneol</b>				
	SCO7699	<i>eshA</i> , nucleotide-binding protein	0,005	-2,65
	SCO7700	possible cyclase	0,002	-3,25
	SCO7701	2-methylgeranyl diphosphate synthase	0,035	-4,02
<b>e) Geosmin</b>				
	SCO6073	<i>geoA</i> , possible cyclase	0,001	-2,77
<b>4. Primární metabolismus</b>				
<b>a) Meatabolizmus fosforu</b>				
	SCO4139	<i>pstB</i> , phosphate ABC transport system ATP-binding protein	0,004	-6,31
	SCO4140	<i>pstA</i> , phosphate ABC transport system permease protein	0,017	-4,08
	SCO4141	<i>pstC</i> , phosphate ABC transport system permease protein	0,025	-2,64
	SCO4142	<i>pstS</i> , phosphate-binding protein precursor	0,012	-4,08
	SCO4143	putative mutT-like protein	0,054	-1,71
	SCO4144	conserved hypothetical protein	0,022	-1,82
	SCO4145	<i>ppk</i> , polyphosphate kinase	0,000	-2,09
	SCO1845	<i>pitH2</i> , low-affinity phosphate transport protein	0,021	-2,20
<b>b) Meatabolizmus síry</b>				
	SCO6095	probable ABC transporter ATP-binding protein	0,009	-3,04
	SCO6096	probable lipoprotein	0,008	-3,32
	SCO6098	<i>cysD</i> , sulfate adenylyltransferase subunit 2	0,251	-2,19
	SCO6099	<i>cysC</i> , adenylylsulfate kinase	0,013	-2,24
	SCO6100	<i>cysH</i> , phosphoadenosine phosphosulfate reductase	0,050	-2,17
	SCO6101	hypothetical protein	0,052	-4,43
	SCO6102	probable nitrite/sulphite reductase	0,034	-5,42
<b>c) Meatabolizmus dusíku</b>				
	SCO2404	putative sugar-binding receptor	0,011	-2,61
	SCO2405	putative sugar-transport ATP binding protein	0,029	-2,28
	SCO2407	putative aldose 1-epimerase	0,026	-2,70
<b>c) Meatabolizmus aminokyselin argininu a prolinu</b>				
	SCO5976	<i>arcB</i> , ornithine carbamoyltransferase	0,002	-2,05
	SCO5980	possible bifunctional hydroxylase/oxidoreductase	0,004	-2,04
	SCO5983	possible fatty acid-CoA ligase	0,000	-2,47
	SCO7034	aminotransferase (fragment)	0,010	-2,84
	SCO7035	<i>gabD</i> , succinate-semialdehyde dehydrogenase (fragment)	0,003	-3,32
	SCO7036	<i>argG</i> , argininosuccinate synthase	0,004	-1,82
	SCO2298	<i>kdgA</i> , KHG/KDPG aldolase	0,001	-1,99

Pokračování tab. 4-2

Kategorie	Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	P-value	Změna exprese
<b>d) Klastř neznámé funkce - pravděpodobně úloha v metabolismu cukrů</b>				
	SCO3472	putative transposase remnant	0,019	-2,42
	SCO3473	putative aldolase	0,014	-3,47
	SCO3474	putative sugar kinase	0,022	-2,85
	SCO3475	putative isomerase	0,031	-2,92
	SCO3476	putative short-chain dehydrogenase	0,023	-3,07
	SCO3477	putative dehydrogenase	0,027	-3,02
	SCO3478	putative dehydrogenase	0,017	-3,27
	SCO3479	putative beta-galactosidase	0,029	-2,75
	SCO3480	putative racemase	0,028	-2,86
	SCO3481	hypothetical protein	0,032	-2,75
	SCO3482	putative sugar-permease	0,039	-2,99
	SCO3483	putative integral membrane transport protein	0,030	-3,07
	SCO3484	putative secreted sugar-binding protein	0,019	-3,21
	SCO3485	putative lacI-family transcriptional regulator	0,032	-1,65
	SCO3486	putative aldehyde dehydrogenase	0,018	-2,17
	SCO3487	putative hydrolase	0,044	-2,39
	SCO3496	putative lyase precursor	0,001	-3,24
<b>5. Ostatní a hypotetické geny</b>				
	SCO3540	<i>slpD</i> , proteinase (putative secreted protein)	0,006	-2,01
	SCO3595	<i>ddlA2</i> , <i>vanA</i> , probable D-alanine:D-lactate ligase	0,015	-3,74
	SCO4873	hypothetical protein	0,047	-2,19
	SCO4879	conserved hypothetical protein	0,042	-4,40
	SCO4880	putative transferase	0,067	-2,52
	SCO4881	putative polysaccharide biosynthesis related protein	0,030	-5,46
	SCO4882	hypothetical protein	0,004	-7,36

**Tab. 4-2: Seznam vybraných genů, jejichž exprese byla snížena u mutantu  $\Delta wdpB$  v porovnání s divokým kmenem M145.** Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpB$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná hodnota znamená, že exprese genů  $\Delta wdpB$  se vůči divokému kmeni zvýšila. Použitá hladina významnosti  $P$ -value < 0,05; vyšší hladina významnosti  $P$ -value (\*) použita pouze ve výjimečných případech (viz kap. 3.7.4)

#### 4.6.2 Transkriptom mutantního kmene $\Delta wdpC$

U mutantního kmene  $\Delta wdpC$  bylo identifikováno celkem 205 genů s významně změněnou hladinou exprese ( $\geq 2x$ ) v porovnání s divokým kmenem, což představuje přes 2,5 % genomu *S. coelicolor*. Seznam vybraných genů uspořádaných podle funkce, jejichž exprese byla ovlivněna v mutantním kmeni  $\Delta wdpC$ , je uveden v tabulkách 4-3 a 4-4.

#### 4.6.2.1 Klasifikace genů se zvýšenou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpC$

Celkem bylo identifikováno 76 genů, jejichž hladina mRNA byla u  $\Delta wdpC$  zvýšena více než dvojnásobně v porovnání s *wt* (tab. 4-3). Nejvyšší indukce exprese byla zaznamenána u samotného genu *wdpC* (SCO2244) (28x), u pravděpodobného AbaA-like regulačního genu SCO4214 (29x) a u předpokládaného operonu SCO4173–5 (6–17x). Dále dochází k indukci exprese u sporulačního genu *whiI* (4,4x) kódující protein, který se podílí na tvorbě septa a kondenzaci nukleoidu ve sporách (Flärdh a Buttner, 2009). Zvýšená hladina exprese byla rovněž zaznamenána u mnoha hypotetických genů a u některých komponent  $\sigma^U$  regulonu (cca 3x). Deregulace aktivity  $\sigma^U$  způsobuje fenotyp *bld* a zpoždění produkce Act (Gehring *et al.*, 2001).

Kategorie	Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	P-value	Změna exprese
<b>1. Gen <i>wdpC</i></b>				
	SCO2244	<i>wdpC</i> , probable serine/threonine protein kinase with WD-40 repetitive domains	0,000	8,77
<b>2. Sporulace</b>				
	SCO6029	<i>whiI</i> , two-component regulator	0,004	4,44
<b>3. Komponenty <math>\sigma^U</math> regulonu</b>				
	SCO0644	putative membrane protein.	0,012	2,98
	SCO0930	putative lipoprotein	0,025	2,87
	SCO2217	putative secreted protein	0,000	2,91
	SCO0828	<i>phoC</i> , putative alkaline phosphatase	0,009	3,05
<b>4. Ostatní a hypotetické geny</b>				
	SCO7511	<i>gap2</i> , glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0,000	3,27
	SCO4173	hypothetical protein SCD66.10c	0,000	14,97
	SCO4174	putative integral membrane protein	0,000	6,05
	SCO4175	hypothetical protein SCD66.12c	0,000	16,75
	SCO4176	conserved hypothetical protein	0,001	2,15
	SCO4214	putative AbaA-like regulatory protein	0,000	28,47
	SCO0162	conserved hypothetical protein	0,002	2,15
	SCO0163	conserved hypothetical protein	0,024	2,08
	SCO0168	possible regulator protein	0,001	2,03
	SCO0169	conserved hypothetical protein	0,000	2,03
	SCO0170	conserved hypothetical protein	0,001	2,40
	SCO0171	conserved hypothetical protein	0,002	2,01
	SCO0180	conserved hypothetical protein	0,018	2,06
	SCO0181	hypothetical protein	0,005	2,05
	SCO0184	conserved hypothetical protein	0,001	3,04

**Tab. 4-3: Seznam významných genů, jejichž exprese byla zvýšena u mutantu  $\Delta wdpC$  v porovnání s divokým kmenem M145.** Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpC$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná hodnota znamená, že exprese genů u  $\Delta wdpC$  se vůči divokému kmeni zvýšila. Použitá hladina významnosti *P*-value < 0,05.

#### 4.6.2.2 Klasifikace genů se sníženou expresí u mutantního kmene $\Delta wdpC$

Celkem bylo identifikováno 129 genů, jejichž hladina mRNA byla u  $\Delta wdpC$  snížena více než dvojnásobně v porovnání s *wt* (tab. 4-4). U mutantního kmene  $\Delta wdpC$  dochází ke snížení exprese celých genových shluků sekundárního metabolismu jako jsou: Act, CDA, coelichelin a sekundárních metabolitů kódovaných genovým shlukem *cpk*. Snížená hladina mRNA byla dále zaznamenána u genů podílejících se na morfologické diferenciaci. V neposlední řadě byla u  $\Delta wdpC$  zaznamenána snížená exprese u genů primárního metabolismu, a také u řady hypotetických genů.

***ramS*.** Mezi morfogeny, jejichž exprese byla u  $\Delta wdpC$  snížena přibližně 2x, patří také gen *ramS* kódující povrchově aktivní peptid SapB usnadňující přechod substrátového mycélia ve vzdušné mycélium.

**Sporulační gen.** Také u jednoho ze sporulačních genů byla zaznamenána snížená hladina exprese (3,8x). Jedná se o pozdní sporulační gen *whiE ORF3* podílející se na syntéze šedého sporulačního pigmentu.

**Biosyntéza sekundárních metabolitů.** Největší skupina genů, jejichž exprese byla u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  reprimována, jsou geny sekundárního metabolismu. Celkem u 20 ze známých 23 genů biosyntetického genového shluku *act* byla zaznamenána přibližně 2–6x snížená exprese, a to včetně specifického transkripčního aktivátoru *actII-ORF4* (3,4x). Podobně byla zaznamenána snížená exprese 18 genů z možných 40 u biosyntetického genového shluku *cda* (2–3,4x), 5 genů z 11 u genového shluku *cch* pro biosyntézu coelichelinu (2–3x) a 2 genů z genového shluku *cpk* (2x).

**Primární metabolismus.** Mezi geny primárního metabolismu, jejichž exprese byla výrazně reprimována u mutantu  $\Delta wdpC$ , patří komponenty regulonu PhoP, který umožňuje buňkám monitorovat dostupnost fosfátu. Byla pozorována snížená hladina exprese operonu *pst* (vysokoafinitní systém pro transport fosfátu) (přibližně 2x) a genu *ppk* pro polyfosfátkinázu (2x) zajišťující reverzibilní polymeraci zásobního polyfosfátu. Kromě genů pro transport a ukládání zásobního fosfátu dochází u  $\Delta wdpC$  k represí exprese genů pro metabolismus síry (2x).

Pokračování tab. 4-4

Kategorie	Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	P-value	Změna exprese
<b>1. Sekundární metabolismus</b>				
<b>a) Aktinorodin</b>				
	SCO5070	<i>actVI ORF B</i> , ORFB hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	0,006	-2,44
	SCO5071	<i>actVI ORF A</i> , ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	0,000	-4,84
	SCO5072	<i>actVI ORF 1</i> , ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	0,000	-3,88
	SCO5073	<i>actVI ORF 2</i> , putative oxidoreductase	0,001	-3,86
	SCO5074	<i>actVI ORF 3</i> , putative dehydratase	0,000	-4,41
	SCO5075	<i>actVI ORF 4</i> , possible oxidoreductase	0,000	-3,76
	SCO5076	<i>actVA1</i> , integral membrane protein	0,029	-2,68
	SCO5077	<i>actVA2</i> , hypothetical protein	0,000	-2,25
	SCO5078	<i>actVA3</i> , hypothetical protein	0,000	-3,32
	SCO5079	<i>actVA4</i> , conserved hypothetical protein	0,000	-4,49
	SCO5080	<i>actVA5</i> , putative hydrolase	0,001	-3,33
	SCO5081	<i>actVA6</i> , hypothetical protein	0,002	-3,66
	SCO5085	<i>actII-ORF4</i> , actinorhodin cluster activator	0,001	-3,43
	SCO5086	<i>actIII</i> , ketoacyl reductase	0,000	-4,59
	SCO5087	<i>actI-ORF1</i> , actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit	0,005	-3,72
	SCO5088	<i>actI-ORF2</i> , actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit	0,002	-4,66
	SCO5089	<i>actI-ORF3</i> , actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein	0,000	-6,16
	SCO5090	<i>actVII</i> , actinorhodin polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase	0,000	-4,57
	SCO5091	<i>actIV</i> , cyclase	0,002	-3,74
	SCO5092	<i>actVB</i> , actinorhodin polyketide possible dimerase	0,018	-3,50
<b>b) Kalcium-dependentní antibiotikum</b>				
	SCO3218	putative small conserved hypothetical protein	0,001	-3,22
	SCO3220	putative secreted protein	0,000	-3,41
	SCO3221	probable oxidoreductase	0,001	-3,04
	SCO3222	possible small secreted protein	0,000	-2,85
	SCO3227	putative aminotransferase	0,021	-2,61
	SCO3229	putative 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	0,005	-2,77
	SCO3230	<i>cdaPS1</i> , CDA peptide synthetase I	0,010	-2,66
	SCO3231	<i>cdaPS2</i> , CDA peptide synthetase II	0,013	-2,60
	SCO3232	<i>cdaPS3</i> , CDA peptide synthetase III	0,022	-2,21
	SCO3233	probable hydrolase	0,040	-2,43
	SCO3234	possible phosphotransferase	0,002	-2,98
	SCO3235	probable ABC transporter	0,003	-2,58
	SCO3236	possible oxygenase	0,003	-2,37
	SCO3244	putative secreted protein	0,000	-2,86
	SCO3245	possible salicylate hydroxylase (putative secreted protein)	0,035	-1,98
	SCO3247	possible acyl CoA oxidase	0,011	-2,42
	SCO3248	<i>fabF3</i> , probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II	0,000	-2,40
	SCO3249	probable acyl carrier protein	0,000	-2,67
<b>c) Coelichelin</b>				
	SCO0489	conserved hypothetical protein	0,001	-2,90
	SCO0490	<i>cchJ</i> , putative esterase	0,011	-2,05
	SCO0492	<i>cchH</i> , putative peptide synthetase	0,007	-2,29
	SCO0498	<i>cchB</i> , putative peptide monooxygenase	0,010	-3,14
	SCO0499	putative formyltransferase	0,016	-2,25
<b>d) Žlutý pigment (produkt <i>cpk</i> genového klastru)</b>				
	SCO6272	possible secreted FAD-binding protein	0,044	-1,96
	SCO6273	<i>cpkC</i> , probable type I polyketide synthase	0,006	-2,40



Pokračování tab. 4-4

Kategorie	Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	P-value	Změna exprese
<b>2. Morfologická diference</b>				
<b>a) Tvorba vzdušného mycélia</b>				
	SCO6681	<i>ramC</i> , probable SapB synthetase	0,024	-2,35
	SCO6682	<i>ramS</i> , peptide SapB	0,000	-2,42
<b>b) Sporulace</b>				
	SCO5318	<i>whiE-ORFIII</i> , polyketide beta-ketoacyl synthase alpha	0,000	-3,80
<b>3. Primární metabolismus</b>				
<b>a) Metabolismus fosforu</b>				
	SCO4139	<i>pstB</i> , phosphate ABC transport system ATP-binding protein	0,000	-2,44
	SCO4140	<i>pstA</i> , phosphate ABC transport system permease protein	0,019	-2,98
	SCO4141	<i>pstC</i> , phosphate ABC transport system permease protein	0,000	-1,97
	SCO4142	<i>pstS</i> , phosphate-binding protein precursor	0,004	-2,30
	SCO4145	<i>ppk</i> , polyphosphate kinase	0,002	-2,03
<b>b) Metabolismus síry</b>				
	SCO6099	<i>cysC</i> , adenylylsulfate kinase	0,002	-2,27
	SCO6102	putative nitrite/sulphite reductase	0,022	-2,16
<b>4. Ostatní</b>				
	SCO3595	<i>ddlA2</i> , <i>vanA</i> , probable D-alanine:D-lactate ligase	0,001	-4,01
	SCO4873	hypothetical protein	0,020	-2,39
	SCO4874	possible integral membrane protein	0,002	-2,91
	SCO4879	conserved hypothetical protein	0,001	-3,81
	SCO4880	possible transferase	0,004	-2,06
	SCO4881	possible polysaccharide biosynthesis related protein	0,002	-3,83
	SCO4882	hypothetical protein	0,000	-6,02
	SCO2828	probable amino acid ABC transporter protein, solute-binding component	0,016	-2,31
	SCO2829	amino acid ABC transporter protein, integral membrane component	0,014	-2,13
	SCO2830	probable amino acid ABC transporter protein, integral membrane component	0,000	-1,98
	SCO2831	probable amino acid ABC transporter protein, ATP-binding component	0,002	-1,97

**Tab. 4-4: Seznam významných genů, jejichž exprese byla snížena u mutantu  $\Delta wdpC$  v porovnání s divokým kmenem M145. Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpC$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpC$  se vůči divokému kmeni snížila. Použitá hladina významnosti  $P$ -value < 0,05.**

### 4.6.3 Ověření výsledných dat získaných z DNA čipů pomocí metody qRT-PCR.

K ověření získaných dat z analýzy transkriptomu obou mutantních kmenů byla použita metoda qRT-PCR umožňující kvantifikaci exprese genů v reálném čase. Bylo testováno celkem 33 genů pro mutantní kmen  $\Delta wdpB$  a 21 genů pro  $\Delta wdpC$ , jejichž exprese byla podle výsledků analýzy transkriptomu významně ovlivněna. Kromě těchto genů bylo navíc testováno ještě následujících 6 genů: (i) Gen *cdaR* kódující specifický transkripční aktivátor CDA genového shluku, jehož exprese se z analýzy transkriptomu zdá být neovlivněna, přestože exprese velké části CDA genového shluku je reprimována u obou mutantních kmenů; (ii) geny *redD* a *redZ* kódující specifické transkripční aktivátory RED genového shluku, jejichž exprese (stejně tak exprese celého RED shluku) se rovněž zdá být z analýzy transkriptomu neovlivněna, ale podle fenotypového projevu dochází u obou mutantů k redukci tvorby RED pigmentu; (iii) gen SCO2245 ležící na chromozomu v těsném sousedství před genem *wdpC*; (iv) geny SCO6277 a SCO6279, které jsou součástí genového shluku *cpk* a mohly by přispět k objasnění, zdali je celý genový shluk *cpk* reprimován, jak naznačuje transkriptom mutantního kmene  $\Delta wdpC$ .

Pro tuto analýzu byly použity stejné izoláty RNA jako pro analýzu pomocí DNA čipů. Získaná výsledná data jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů a jsou uvedena v tabulce 4-5 pro mutantu  $\Delta wdpB$  a v tabulce 4-6 pro  $\Delta wdpC$ .

Pomocí metody qRT-PCR byly u valné většiny genů potvrzeny výsledky získané z analýzy transkripčních profilů pomocí DNA čipů (tab. 4-5 a 4-6). V mnoha případech byla dokonce hodnota změny relativní genové exprese výrazně větší (pro indukované, resp. reprimované geny výrazně vyšší, resp. nižší) než v globální analýze transkriptomu příslušných mutant, což bylo patrné především u exprese genů SCO4173–5, SCO4214 a *wdpC* (SCO2244) výrazně indukovaných u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  a také u exprese genu *wdpB*, který byl indukován u mutantního kmene  $\Delta wdpB$ . Pouze u několika málo genů (*pitH2*, *whiE ORFVIII*, *chpB* a *cdaR* pro  $\Delta wdpB$ ; *cchB*, *phoC* a *ramC* u  $\Delta wdpC$ ) nebyla změna jejich exprese zaznamenána. Pouze dva geny (*whiJ* a *whiE ORFIII*) se nepodařilo pomocí qRT-PCR amplifikovat.

Navíc byla zjištěna zvýšená exprese genu SCO2245 (16,5x) a mírně snížená exprese *cdaR* (-2,15x) kódující transkripční aktivátor pro CDA biosyntetický shluk u mutantu  $\Delta wdpC$ . Exprese genů pro transkripční aktivátory RedD a RedZ nebyla ani u jednoho z mutantních kmenů v porovnání s divokým kmenem ovlivněna.

Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	Změna exprese	
		DNA microarrays	qRT-PCR
SCO0194	<i>litS</i> , putative sigma factor	-5,58	-4,65 (± 0,92)
SCO0492	<i>cchH</i> , putative peptide synthetase	-2,07	-2,45 (± 0,33)
SCO0498	<i>cchB</i> , putative peptide monooxygenase	-2,60	-4,61 (± 1,70)
SCO1674	<i>chpC</i>	-3,40	-2,69 (± 0,60)
SCO1675	<i>chpH</i>	-2,66	-10,24 (± 3,69)
SCO1800	<i>chpE</i>	-1,76	-1,97 (± 0,20)
SCO1845	<i>pitH2</i> , low-affinity phosphate transport protein	-2,20	-1,46 (± 0,70)
SCO2717	<i>chpD</i>	-3,83	-3,55 (± 1,11)
SCO2718	<i>rdlA</i>	-13,50	-15,19 (± 7,95)
SCO2719	<i>rdlB</i>	-6,29	-9,59 (± 3,14)
SCO3217	<i>cdaR</i> , transcriptional activator for the CDA biosynthesis cluster	-2,07	-1,88 (± 0,63)
SCO3230	<i>cdaPS1</i> , CDA peptide synthetase I	-2,41	-2,27 (± 0,73)
SCO3231	<i>cdaPS2</i> , CDA peptide synthetase II	-2,14	-2,67 (± 0,39)
SCO3236	possible oxygenase	-2,36	-2,75 (± 0,39)
SCO3476	putative short-chain dehydrogenase	-3,07	-5,03 (± 2,89)
SCO3480	putative racemase	-2,86	-4,46 (± 2,38)
SCO3483	putative integral membrane transport protein	-3,07	-4,99 (± 3,15)
SCO4002	<i>nepA</i>	-2,61	-4,31 (± 0,59)
SCO4142	<i>pstS</i> , phosphate-binding protein precursor	-4,08	-22,37 (± 10,08)
SCO4677	<i>rsfA</i> , putative regulatory protein (probably anti- $\sigma^F$ factor)	-2,04	-2,58 (± 0,46)
SCO5321	<i>whiE</i> , <i>ORFVIII</i> polyketide hydroxylase	-2,08	-1,15 (± 0,22)
SCO5819	<i>whiH</i> , sporulation transcription factor	-2,64	-3,42 (± 0,01)
SCO5877	<i>redD</i> , specific transcriptional activator for RED biosynthesis cluster	1,08	1,63 (± 0,44)
SCO5881	<i>redZ</i> , specific transcriptional activator for RED biosynthesis cluster	-1,17	1,20 (± 0,34)
SCO5953	<i>wdpB</i> , putative membrane protein with WD-40 repetitive domains	2,92	19,54 (± 3,74)
SCO5954	probable chitinase (putative secreted protein)	12,43	34,51 (± 7,14)
SCO6029	<i>whiI</i> , two-component regulator	3,79	nd
SCO6073	<i>geoA</i> , possible cyclase	-2,77	-3,32 (± 1,01)
SCO6099	<i>cysC</i> , adenylylsulfate kinase	-2,24	-7,44 (± 3,95)
SCO6681	<i>ramC</i> , putative serine/threonine protein kinase	-3,87	-3,49 (± 0,61)
SCO6682	<i>ramS</i> , surface-active peptide SapB	-5,95	-17,51 (± 7,15)
SCO6685	<i>ramR</i> , two-component system response regulator	-2,25	-2,27 (± 0,51)
SCO6992	<i>absR1</i> , regulatory protein	-3,45	-8,95 (± 4,23)
SCO7035	<i>gabD</i> , succinate-semialdehyde dehydrogenase (fragment)	-3,32	-2,24 (± 0,17)
SCO7257	<i>chpB</i>	-2,11	-1,12 (± 0,55)
SCO7701	2-methylgeranyl diphosphate synthase	-4,02	-3,34 (± 0,80)

**Tab. 4-5: Ověření výsledků z analýzy transkriptomu mutantního kmene  $\Delta wdpB$  pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.** Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpB$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpB$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Zkratka nd znamená, že gen nebyl detekován (jeho amplifikace se nezdařila)

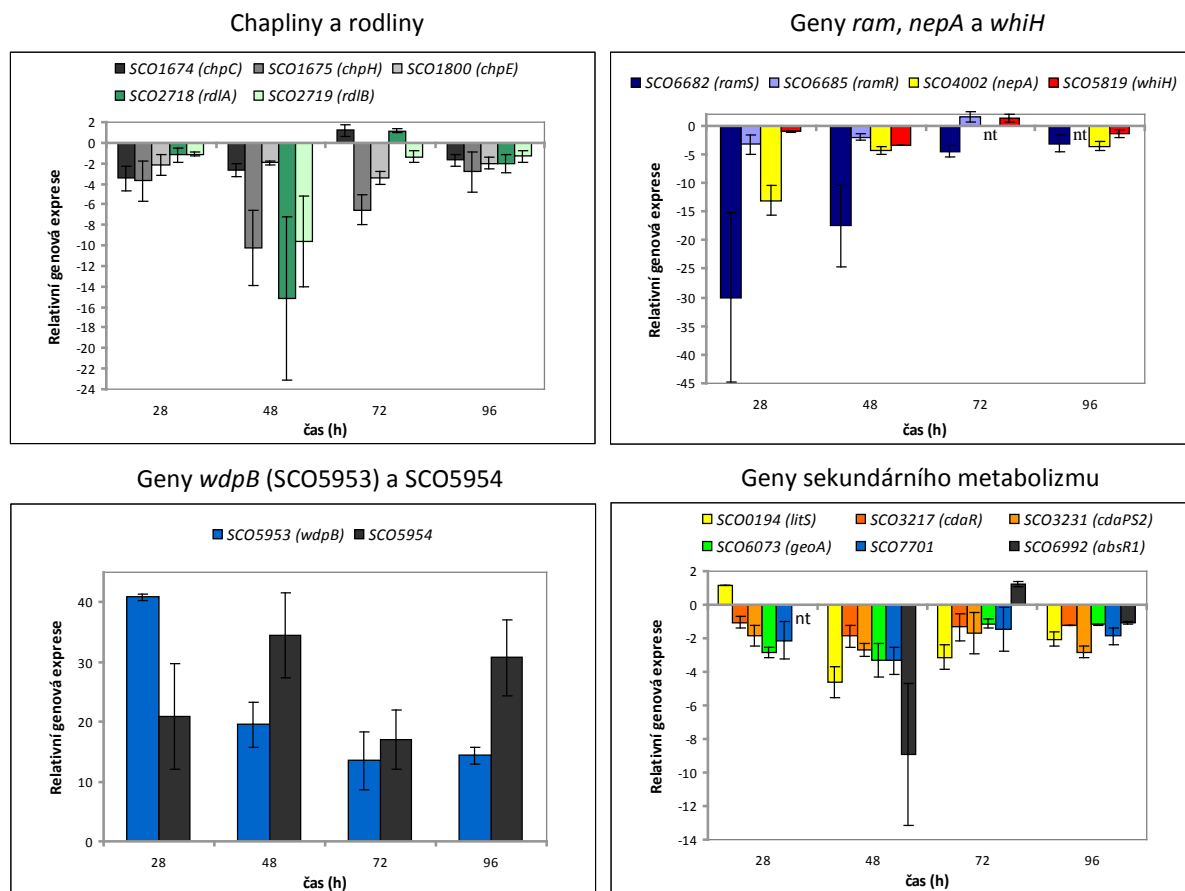
Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	Změna exprese	
		DNA microarrays	qRT-PCR
SCO0492	<i>cchH</i> , putative peptide synthetase	-2,29	-2,18 (± 0,55)
SCO0498	<i>cchB</i> , putative peptide monooxygenase	-3,14	-1,48 (± 0,71)
SCO0828	<i>phoC</i> , putative alkaline phosphatase	3,05	-1,19 (± 0,27)
SCO2217	putative secreted protein	2,91	4,89 (± 0,70)
SCO2244	<i>wdpC</i> , probable serine/threonine protein kinase with WD-40 repetitive domains	8,77	34,51 (± 6,64)
SCO2245	hypothetical protein	-1,25	16,50 (± 4,86)
SCO3217	<i>cdaR</i> , transcriptional activator for the CDA biosynthesis cluster	-1,41	-2,15 (± 0,64)
SCO3230	<i>cdaPSI</i> , CDA peptide synthetase I	-2,66	-3,00 (± 0,99)
SCO3231	<i>cdaPS2</i> , CDA peptide synthetase II	-2,60	-4,55 (± 1,12)
SCO3236	possible oxygenase	-2,37	-3,42 (± 0,55)
SCO4173	hypothetical protein SCD66.10c	14,97	70,41 (± 1,10)
SCO4174	putative integral membrane protein	6,05	305,02 (± 90,89)
SCO4175	hypothetical protein SCD66.12c	16,75	243,8 (± 38,00)
SCO4214	putative AbaA-like regulatory protein	28,47	325,17 (± 56,75)
SCO5074	<i>actVI ORF 3</i> , putative dehydratase	-4,41	-7,03 (± 3,20)
SCO5080	<i>actVA5</i> , putative hydrolase	-3,33	-6,33 (± 2,57)
SCO5085	<i>actII-ORF4</i> , actinorhodin cluster activator	-3,43	-4,23 (± 0,68)
SCO5087	<i>actI-ORF1</i> , actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase a subunit	-3,72	-6,93 (± 3,41)
SCO5318	<i>whiE-ORFIII</i> , polyketide beta-ketoacyl synthase alpha	-3,80	nd
SCO5877	<i>redD</i> , specific transcriptional activator for RED biosynthesis cluster	-1,27	-1,45 (± 0,65)
SCO5881	<i>redZ</i> , specific transcriptional activator for RED biosynthesis cluster	-1,46	-1,22 (± 0,06)
SCO6029	<i>whiI</i> , two-component regulator	4,44	nd
SCO6273	<i>cpkC</i> , probable type I polyketide synthase	-2,40	-2,38 (± 0,08)
SCO6277	<i>cpkE</i> , putative epoxide hydrolase	-1,40	-2,07 (± 0,22)
SCO6279	<i>cpkG</i> , putative diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase	-1,24	-2,24 (± 0,25)
SCO6681	<i>ramC</i> , probable SapB synthetase	-2,35	1,15 (± 0,52)
SCO6682	<i>ramS</i> , peptide SapB	-2,42	-2,35 (± 0,49)

**Tab. 4-6: Ověření výsledků z analýzy transkriptomu mutantního kmene  $\Delta wdpC$  pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.** Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpC$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpC$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Zkratka nd znamená, že gen nebyl detekován (jeho amplifikace se nezdařila)

## 4.7 Transkripční profily vybraných genů v průběhu životního cyklu

Na základě výsledků transkripčních profilů získaných pomocí DNA čipů byla u obou mutantních kmenů testována změna genové exprese u vybrané skupiny genů v průběhu životního cyklu streptomycet. Stanovení transkripčních profilů vybraných genů u mutantu *wdpB*, resp. *wdpC* v průběhu životního cyklu by mohlo napomoci porozumět úloze produktů těchto genů v diferenciaci *S. coelicolor*. K tomuto účelu byla použita metoda kvantitativní PCR v reálném čase. Získané výsledky jsou graficky znázorněny v grafu 4-4,

resp. 4-5 a číselně zaznamenány v tabulce tab. 4-7, resp. 4-8 pro mutantu  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$ .



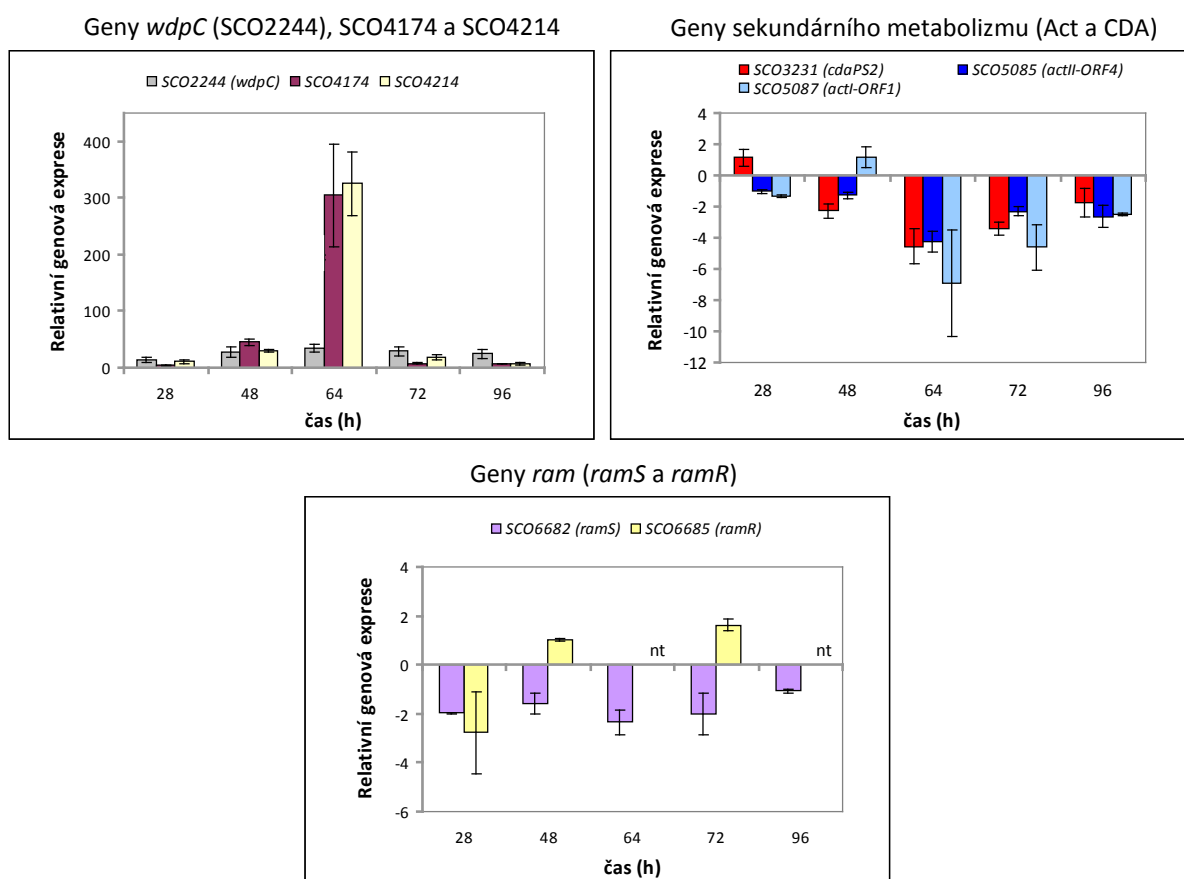
**Graf 4-4: Transkripční profily vybraných genů u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  v průběhu životního cyklu *S. coelicolor* (grafické znázornění tabulky 4-7).** Celková RNA izolovaná z různých vývojových stádií (28., 48., 72. a 96. hod kultivace na mR3 agaru) životního cyklu byla přepsána do cDNA, která posloužila jako templát pro qRT-PCR. Relativní genová expozice udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpB$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina expozice genů u  $\Delta wdpB$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Analýza byla provedena pomocí qRT-PCR. Graf znázorňuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru. nt – geny *nepA*, *ramR* a *absR1* nebyly v daném časovém intervalu testovány.

Gen (název)	doba kultivace (h)			
	28	48	72	96
SCO0194 ( <i>litS</i> )	1,14 (± 0,01)	-4,65 (± 0,92)	-3,12 (± 0,74)	-2,04 (± 0,40)
SCO1674 ( <i>chpC</i> )	-3,46 (± 1,17)	-2,69 (± 0,60)	1,19 (± 0,59)	-1,72 (± 0,53)
SCO1675 ( <i>chpH</i> )	-3,73 (± 1,93)	-10,24 (± 3,69)	-6,54 (± 1,43)	-2,85 (± 1,92)
SCO1800 ( <i>chpE</i> )	-2,14 (± 0,98)	-1,97 (± 0,20)	-3,43 (± 0,63)	-1,99 (± 0,61)
SCO2718 ( <i>rdlA</i> )	-1,19 (± 0,71)	-15,19 (± 7,95)	1,17 (± 0,14)	-2,01 (± 0,87)
SCO2719 ( <i>rdlB</i> )	-1,13 (± 0,17)	-9,59 (± 3,14)	-1,4 (± 0,57)	-1,34 (± 0,60)
SCO3217 ( <i>cdaR</i> )	-1,05 (± 0,33)	-1,88 (± 0,63)	-1,34 (± 0,79)	-1,22 (± 0,01)
SCO3231 ( <i>cdaPS2</i> )	-1,84 (± 0,64)	-2,67 (± 0,39)	-1,7 (± 1,23)	-2,83 (± 0,35)
SCO4002 ( <i>nepA</i> )	-13,12 (± 2,61)	-4,31 (± 0,59)	nt	-3,59 (± 0,76)
SCO5819 ( <i>whiH</i> )	-1,02 (± 0,15)	-3,42 (± 0,01)	1,27 (± 0,68)	-1,38 (± 0,61)
SCO5953 ( <i>wdpB</i> )	40,86 (± 0,50)	19,54 (± 3,74)	13,47 (± 4,79)	14,33 (± 1,48)
SCO5954	20,88 (± 8,88)	34,51 (± 7,14)	16,94 (± 4,99)	30,70 (± 6,28)
SCO6073 ( <i>geoA</i> )	-2,85 (± 0,28)	-3,32 (± 1,01)	-1,14 (± 0,27)	-1,18 (± 0,06)
SCO6682 ( <i>ramS</i> )	-30,00 (± 14,84)	-17,52 (± 7,15)	-4,49 (± 1,07)	-3,11 (± 1,39)
SCO6685 ( <i>ramR</i> )	-3,28 (± 1,68)	-2,27 (± 0,51)	1,49 (± 0,93)	nt
SCO6992 ( <i>absR1</i> )	nt	-8,95 (± 4,23)	1,21 (± 0,17)	-1,07 (± 0,07)
SCO7701	-2,12 (± 1,09)	-3,34 (± 0,80)	-1,48 (± 1,31)	-1,86 (± 0,49)

**Tab. 4-7: Transkripční profily vybraných genů u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  v průběhu životního cyklu *S. coelicolor*.** Celková RNA izolovaná z různých vývojových stádií (28., 48., 72. a 96. hod kultivace na mR3 agaru) životního cyklu byla přepsána do cDNA, která posloužila jako templát pro qRT-PCR. Hodnoty uvedené v tabulce představují změnu exprese stanovenou pomocí qRT-PCR, která udává poměr transkripce příslušného genu u mutantu  $\Delta wdpB$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpB$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Zkratka nt znamená, že gen nebyl testován v daném časovém bodě.

U mutantu  $\Delta wdpB$  bylo zjištěno, že exprese genu *wdpB* je ve srovnání s divokým kmenem zvýšena během životního cyklu (viz vysvětlení v kap. 5.3) a dosahuje nejvyšší hladiny v 28. hodině kultivace (počátek diferenciaci vzdušného mycélia). Druhým výrazně indukovaným genem během životního cyklu je u  $\Delta wdpB$  gen kódující pravděpodobnou chitinázu SCO5954, jenž se nachází v těsném sousedství genu *wdpB* na chromozomu. Nejvýrazněji reprimovaným genem u kmene  $\Delta wdpB$  je gen *ramS*, jehož produkt protein SapB funguje jako surfaktant a umožňuje přechod ze substrátového mycélia na vzdušné. Maximální represe transkripce genu *ramS* byla zaznamenána v 28. hodině kultivace (doba počátku tvorby vzdušného mycélia). Podobně jako *ramS* je také gen *ramR* (regulující celý operon *ram*) u mutantu  $\Delta wdpB$  reprimován, a to v časných fázích diferenciaci vzdušného mycélia. Další skupinou reprimovaných genů u mutantu  $\Delta wdpB$  jsou geny kódující chapliny plnicí především funkci surfaktantů a rodliny vytvářející (spolu s chapliny) charakteristickou ultrastrukturu fibril na povrchu spor. Maximum represe transkripce u rodlinů se pohybuje kolem 48. hodiny kultivace (časná fáze sporulace), u chaplinů *chpH* a *chpE* mezi 48.–72. hodinou kultivace (sporulace) a u chaplinu *chpC* byla zaznamenána

snížená exprese ve 28. a 48. hod kultivace. Potlačení exprese genů pro syntézu sekundárních metabolitů CDA (testovaný gen *cdaPS2*), karotenoidů (testovaný gen *litS*) a methylisoborneolu (testovaný gen *SCO7701*) u mutantu  $\Delta wdpB$  se začíná projevovat ve 8. hod kultivace, teda ve fázi časně sporulace a přetrvává minimálně až do 96. hod kultivace, kromě genu *SCO7701*, jehož exprese je ve srovnání s divokým kmenem snížena pouze ve 48. hod. Dalším testovaným genem sekundárního metabolismu, jehož exprese byla u mutantu  $\Delta wdpB$  reprimována ve 28. a 48. hod kultivace, byl gen *geoA* pro syntézu geosminu. Mezi testované geny jejichž exprese byla snížena pouze ve 48. hod životního cyklu patří sporulační gen *whiH* a gen *absR1* kódující potenciální aktivátor sekundárního metabolismu. Poslední testovaný gen s reprimovanou expresí u mutantu  $\Delta wdpB$  byl gen *nepA* (NepA přispívá k udržení dormance spór), který dosahoval maximální represe transkripce ve 28. hod kultivace a jeho snížená exprese v porovnání s divokým kmenem přetrvává minimálně až do 96. hod kultivace.



**Graf. 4-5: Transkripční profily vybraných genů u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  v průběhu životního cyklu *S. coelicolor* (grafické znázornění tabulky 4-8).** Celková RNA izolovaná z různých vývojových stádií (28., 48., 64., 72. a 96. hod kultivace na mR3 agaru) životního cyklu byla přepsána do cDNA, která posloužila jako templát pro qRT-PCR. Relativní genová exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpC$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpC$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Analýza byla provedena pomocí qRT-PCR. Graf znázorňuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru. nt – gen *ramR* nebyl v daných časových intervalech testován

U mutantu  $\Delta wdpC$  dochází během životního cyklu k indukci exprese samotného genu *wdpC* (viz vysvětlení v kap. 5.3), genu SCO4174 a genu SCO4214 s výrazným maximem kolem 64. hodiny kultivace, což odpovídá diferenciaci spor. U mutantu  $\Delta wdpC$  dále dochází k represí exprese genů kódujících syntézu sekundárních metabolitů Act (testované geny *actII-ORF4* a *actI-ORF1*) a CDA (testovaný gen *cdaPS2*) s maximem v 64. hodině kultivace (sporulační fáze). Zaznamenaná mírně snížená exprese genu *ramS* (kódující biosurfaktant SapB) s maximem v 64. hodině kultivace je na hranici statistické významnosti.

Gen (název)	doba kultivace (h)				
	28	48	64	72	96
SCO2244 ( <i>wdpC</i> )	13,77 ( $\pm$ 4,42)	27,33 ( $\pm$ 9,03)	34,51 ( $\pm$ 6,64)	29,2 ( $\pm$ 7,43)	25,00 ( $\pm$ 8,05)
SCO3231 ( <i>cdaPS2</i> )	1,14 ( $\pm$ 0,56)	-2,29 ( $\pm$ 0,45)	-4,55 ( $\pm$ 1,12)	-3,39 ( $\pm$ 0,41)	-1,73 ( $\pm$ 0,93)
SCO4174	4,08 ( $\pm$ 1,06)	45,70 ( $\pm$ 5,57)	305,02 ( $\pm$ 90,89)	7,88 ( $\pm$ 0,40)	6,93 ( $\pm$ 0,40)
SCO4214	10,80 ( $\pm$ 2,80)	30,69 ( $\pm$ 2,44)	325,17 ( $\pm$ 56,75)	18,65 ( $\pm$ 5,41)	7,63 ( $\pm$ 2,55)
SCO5085 ( <i>actII-ORF4</i> )	-1,03 ( $\pm$ 0,13)	-1,27 ( $\pm$ 0,19)	-4,23 ( $\pm$ 0,68)	-2,31 ( $\pm$ 0,27)	-2,64 ( $\pm$ 0,70)
SCO5087 ( <i>actI-ORF1</i> )	-1,36 ( $\pm$ 0,07)	1,18 ( $\pm$ 0,69)	-6,93 ( $\pm$ 3,41)	-4,59 ( $\pm$ 1,46)	-2,47 ( $\pm$ 0,08)
SCO6682 ( <i>ramS</i> )	-1,98 ( $\pm$ 0,03)	-1,60 ( $\pm$ 0,42)	-2,35 ( $\pm$ 0,49)	-2,03 ( $\pm$ 0,85)	-1,07 ( $\pm$ 0,07)
SCO6685 ( <i>ramR</i> )	-2,78 ( $\pm$ 1,68)	1,03 ( $\pm$ 0,06)	nt	1,63 ( $\pm$ 0,26)	nt

**Tab. 4-8: Transkripční profily vybraných genů u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  v průběhu životního cyklu *S. coelicolor*.** Celková RNA izolovaná z různých vývojových stádií (28., 48., 64., 72. a 96. hod kultivace na mR3 agaru) životního cyklu byla přepsána do cDNA, která posloužila jako templát pro qRT-PCR. Hodnoty uvedené v tabulce představují změnu exprese stanovenou pomocí qRT-PCR, která udává poměr transkripce příslušného genu u mutantu  $\Delta wdpC$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145. Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpC$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Zkratka nt znamená, že gen nebyl testován v daném časovém bodě.

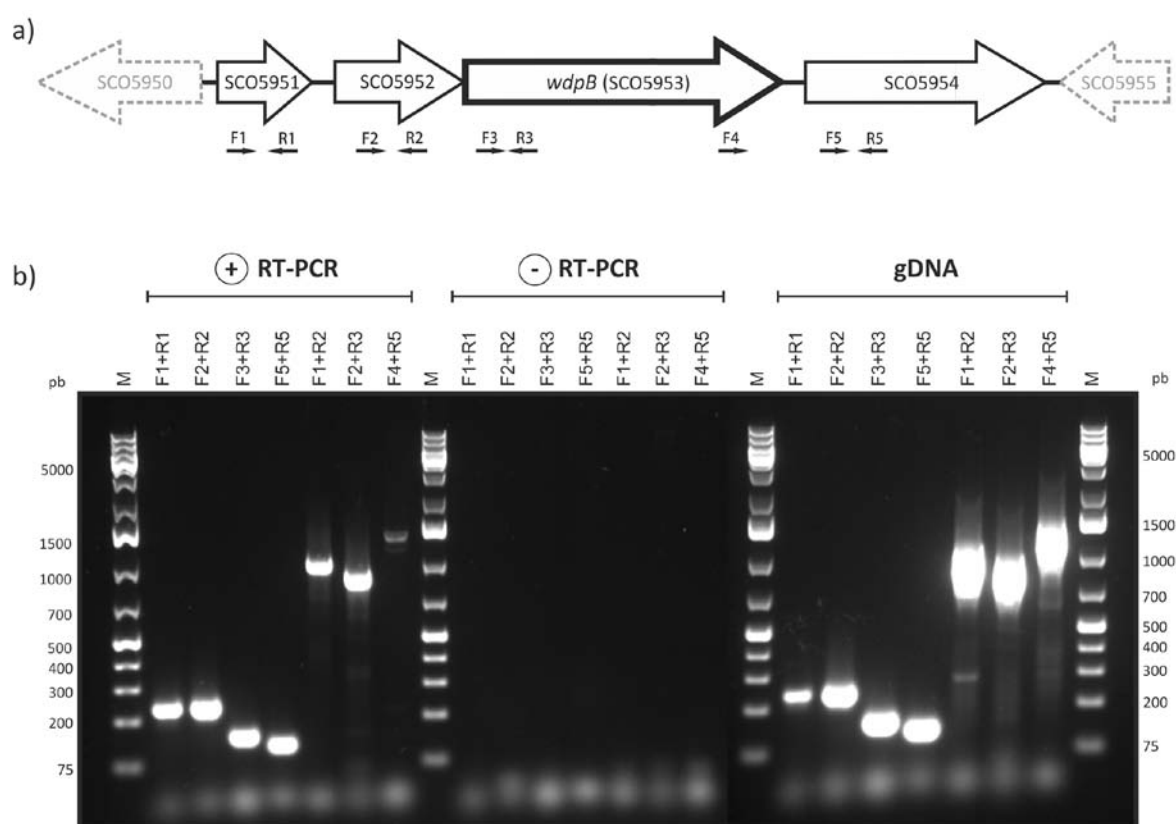
## 4.8 Koexpresní analýza

Aby se zjistilo, zdali se gen *wdpB*, resp. *wdpC* přepisuje jako monocistronní či polycistronní mRNA, byla provedena kotranskripční analýza pomocí metody RT-PCR. Z RNA izolované po 48 hodinách kultivace na mR3 agaru byla syntetizována cDNA, která byla použita jako templát pro RT-PCR reakci. Oligonukleotidy byly navrženy jednak pro samotné geny (pro ověření exprese daného genu) a jednak pro amplifikaci sekvence, která leží na rozhraní dvou testovaných genů a která je tvořena koncem jednoho a začátkem druhého genu (pro kotranskripční analýzu) (viz tab. 3-2).



### 4.8.1 Koexprese genů SCO5951–5954

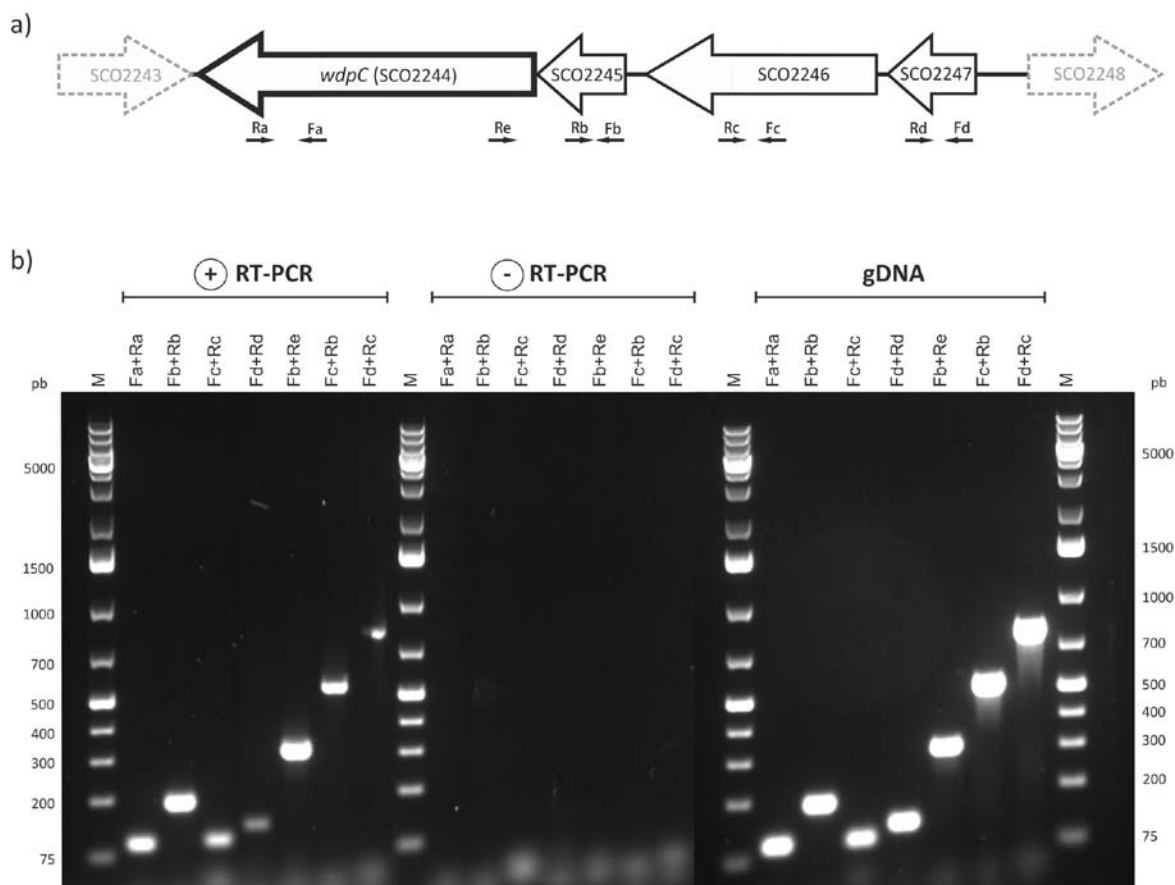
Získané specifické amplifikační produkty odpovídaly kotranskripci genů SCO5951–SCO5952, SCO5952–5953 a genů SCO5953–5954 (obr. 4-11). Stejně amplifikační produkty byly získány u PCR reakcí s chromozomální DNA jako templátem (pozitivní kontrola experimentu), zatímco u PCR reakcí, kde jako templát byla použita celková RNA (negativní kontrola experimentu), nebyl detekován žádný PCR produkt. Toto pozorování ukazuje, že všechny čtyři geny SCO5951–5954 a tedy i včetně genu *wdpB* (SCO5953) jsou koexprimovány v podobě polycistronní mRNA.



**Obr. 4-11: Operon SCO5951–5954.** a) Uspořádání genů v operonu SCO5951–5954. Uspořádání a orientace genů SCO5951–5954 je znázorněna velkými bílými šipkami. Šedé čárkované šipky korespondují s přilehlými ORF. Malé šipky (→) znázorňují orientaci a lokalizaci oligonukleotidů použitých v kotranskripční analýze genů SCO5951–5954. b) Kotranskripční analýza genů SCO5951–5954 v divokém kmeni. RNA byla izolována z mycélia sklizeného v 48. hod kultivace. Metoda RT-PCR byla použita pro stanovení kotranskripce sousedních párů genů SCO5951–5952, SCO5952–5953 a SCO5953–5954 s použitím párů oligonukleotidů znázorněných na obr. (a): F1+R1, F2+R2, F3+R3, F5+R5 (oligonukleotidy pro jednotlivé testované geny); F1+R2, F2+R3, F4+R5 (oligonukleotidy pro kotranskripci sousedních genů). Pro RT-PCR byla použita cDNA syntetizovaná v přítomnosti (+) a v nepřítomnosti (-) reverzní transkriptázy. Chromozomální DNA (gDNA) byla použita jako pozitivní kontrola PCR reakce. PCR produkty byly rozděleny v 1,5 % TAE-agarózovém gelu. M – marker molekulových hmotností.

### 4.8.2 Koexprese genů SCO2244-2247

Podobně jako u analýzy kotranskripce genů SCO5951–5954, také u genů SCO2244–2247 byla prokázána koexprese všech čtyř genů SCO2244–2247, včetně genu *wdpC* (SCO2244) (obr. 4-12). Výskyt polycistronní mRNA nesoucí tyto čtyři geny byl prokázán přítomností specifických PCR produktů odpovídajících kotranskripci genů SCO2244–2245, SCO2245–2246 a SCO2246–2247.



**Obr. 4-12: Operon SCO2244–2247. a) Uspořádání genů v operonu SCO2244–2247.** Uspořádání a orientace genů SCO2244–2247 je znázorněna velkými bílými šipkami. Šedé čárkované šipky korespondují s přílehlými ORF. Malé šipky (→) znázorňují orientaci a lokalizaci oligonukleotidů použitých v kotranskripční analýze genů SCO2244–2247. **b) Kotranskripční analýza genů SCO2244–2247 v divokém kmeni.** RNA byla izolována z mycélia sklizeného v 48. hod kultivace. Metoda RT-PCR byla použita pro stanovení kotranskripce sousedních párů genů SCO2244–2245, SCO2245–2246 a SCO2246–2247 s použitím párů oligonukleotidů znázorněných na obr. (a): Fa+Ra, Fb+Rb, Fc+Rc, Fd+Rd (oligonukleotidy pro jednotlivé testované geny); Fb+Re, Fc+Rb, Fd+Rc (oligonukleotidy pro kotranskripci sousedních genů). Pro RT-PCR byla použita cDNA syntetizovaná v přítomnosti (+) a v nepřítomnosti (-) reverzní transkriptázy. Chromozomální DNA (gDNA) byla použita jako pozitivní kontrola PCR reakce. PCR produkty byly rozděleny v 1,5 % TAE-agarózovém gelu. M – marker molekulových hmotností

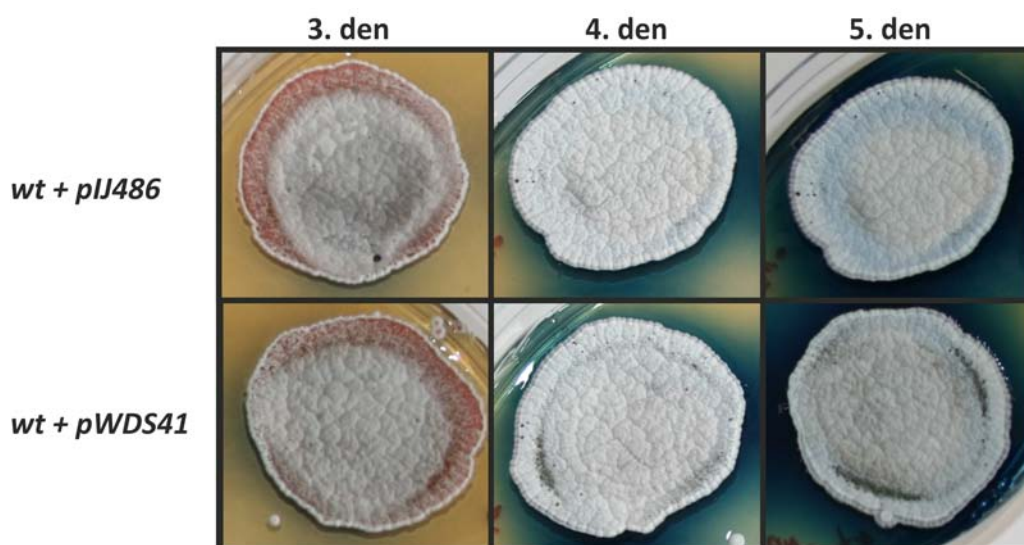
## 4.9 Kmeny *S. coelicolor* s vyšším počtem kopií genu *wdpB*, resp. *wdpC*

Pro stanovení fenotypu mutantních kmenů nadprodukcujících produkty genů *wdpB*, resp. *wdpC* byly připraveny kmeny s vyšším počtem kopií *wdpB*, resp. *wdpC* u *S. coelicolor* M145. Do mnohokopiového plazmidu pIJ486, resp. pIJ622 byla vložena sekvence nesoucí gen *wdpB*, resp. *wdpC* a vzniklé konstrukty pWDS41, resp. pWDC622 byly transformovány do divokého kmene M145.

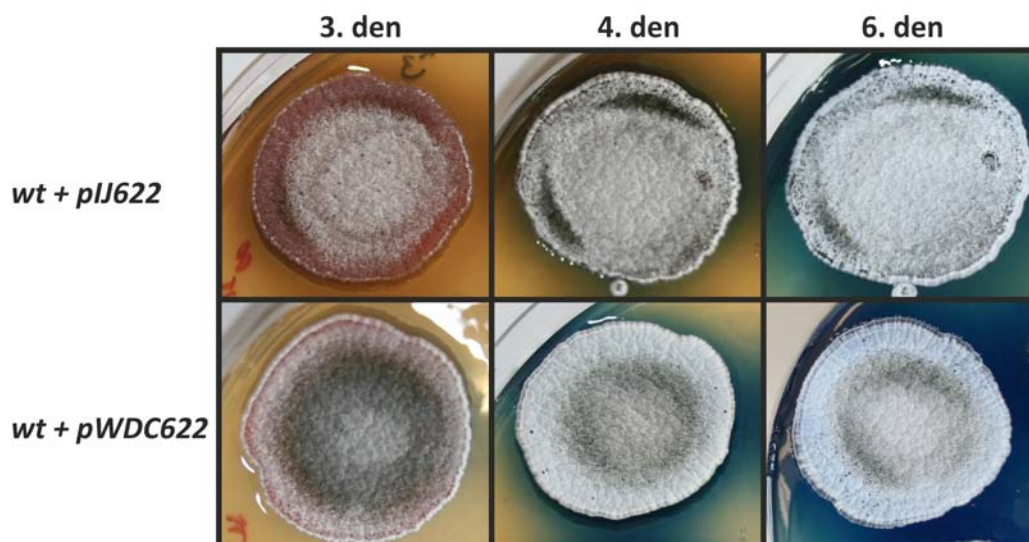
### 4.9.1 Fenotyp mutantních kmenů se zvýšenou genovou dávkou genu *wdpB*, resp. *wdpC*

U kmene se zvýšeným počtem kopií genu *wdpC* (kmen *wt* + pWDC622) bylo na agarové plotně zjištěno prokazatelné zvýšení tvorby aktinorodinu v porovnání s divokým kmenem nesoucím prázdný vektor (*wt* + pIJ622) (obr. 4-14; graf 4-6), zatímco kmen se zvýšeným počtem kopií genu *wdpB* (kmen *wt* + pWDS41) se od divokého kmene (*wt* + pIJ486) v produkci tvorby Act nelišil (obr. 4-13).

Tvorba vzdušného mycélia a sporulace se u obou kmenů se zvýšenou genovou dávkou zdály být shodné s divokým kmenem.



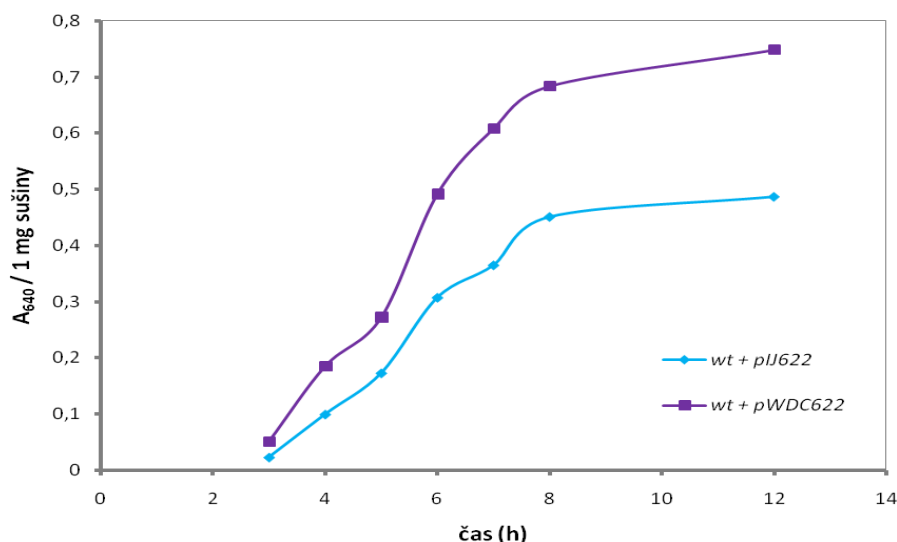
**Obr. 4-13: Fenotyp kmene se zvýšeným počtem kopií genu *wdpB*.** Divoký kmen s prázdným vektorem (*wt* + pIJ486) a mutantní kmen se zvýšeným počtem kopií genu *wdpB* (*wt* + pWDS41) byl kultivován 5 dní na modifikovaném R3 agaru. Snímky pocházejí ze 3., 4. a 5. dne kultivace. Fyziologická i morfoloická diference u kmene se zvýšeným počtem kopií genu *wdpB* se zdá být shodná s divokým kmenem.



**Obr. 4-14: Fenotyp kmene se zvýšeným počtem kopií genu *wdpC*.** Divoký kmen s prázdným vektorem (*wt + pIJ622*) a mutantní kmen se zvýšeným počtem kopií genu *wdpC* (*wt + pWDC622*) byl kultivován 6 dní na modifikovaném R3 agaru. Snímky pocházejí ze 3., 4. a 6. dne kultivace. U kmene *wt + pWDC622* dochází ke zvýšené produkci Act; morfologická diference se zdá být shodná s divokým kmenem *wt + pIJ622*.

#### 4.9.2 Stanovení produkce Act u mutantních kmenů se zvýšenou genovou dávkou genu *wdpB*, resp. *wdpC*

Prokazatelné zvýšení produkce Act bylo u mutantu *wt + pWDC622* také stanoveno spektrofotometricky při  $A_{640}$  (graf 4-6). U mutantu *wt + pWDS41* je produkce Act totožná s divokým kmenem *wt + pIJ486* (data nejsou prezentována). Růstová rychlost u obou mutantních kmenů měřená jako přírůstek sušiny v čase byla shodná s divokým kmenem (data neuvedena).



**Graf 4-6: Produkce aktinorodinu u kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpC* v buňce *S. coelicolor*.** Divoký typ s prázdným multikopiovým vektorem (*wt* + pIJ622) a mutantní kmen s vyšším počtem kopií genu *wdpC* (*wt* + pWDC622) byly kultivovány na modifikovaném R3 agaru. Produkce Act pigmentu v čase byla měřena spektrofotometricky jako  $A_{640}$  a vztažena na 1 mg biomasy. Celý experiment trval 12 dní. Graf znázorňuje reprezentativní experiment ze tří nezávislých měření provedených vždy ve dvou paralelách.

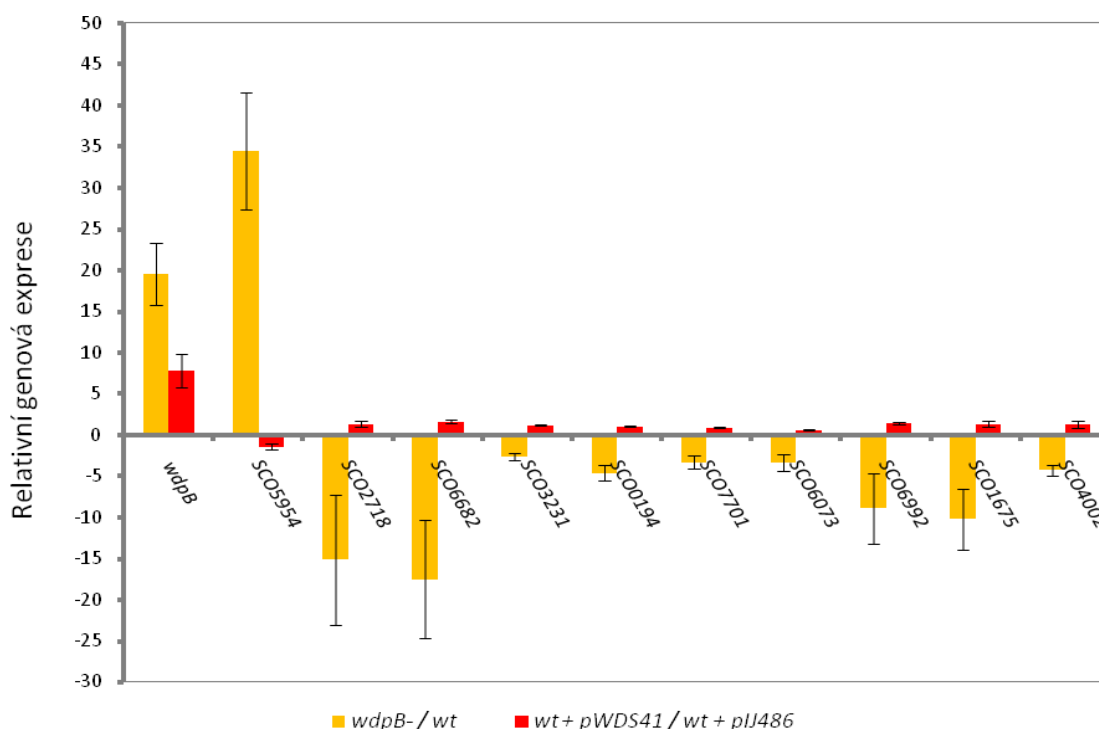
### 4.9.3 Transkripční profil vybraných genů u mutantních kmenů s vyšším počtem kopií genu *wdpB*, resp. *wdpC*

Pro potvrzení vlivu disrupce genu *wdpB*, resp. *wdpC* na buněčnou fyziologii byl stanoven transkripční profil vybraných genů u kmenů s vyšší genovou dávkou genu *wdpB*, resp. *wdpC*.

Pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase byla u obou mutantních kmenů testována změna genové exprese u vybrané skupiny genů. Celkem bylo testováno 11, resp. 10 genů u kmenů s vyšším počtem kopií genu *wdpB*, resp. *wdpC*. Testovanými geny byly ty geny, jejichž exprese byla významně ovlivněna u mutantních kmenů  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$ .

RNA použitá pro tuto analýzu byla izolována z mycélia kultivovaného na mR3 agaru a sklizeného ve stejných časových intervalech jako vzorky připravované pro analýzu transkriptomu, tj. kmeny *wt* + pWDS41 a *wt* + pIJ486 v 48. hod kultivace, zatímco kmeny *wt* + pWDC622 a *wt* + pIJ622 v 64. hod kultivace.

U kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpB* bylo zjištěno, že kromě samotného genu *wdpB*, u kterého byla stanovena zvýšená exprese v porovnání s divokým typem, nedochází ke změně exprese u žádného z testovaných genů. Výsledná data byla porovnána s relativní genovou expresí vybraných genů u mutantu  $\Delta wdpB$  a jsou graficky znázorněna v grafu 4-7 a číselně v tabulce 4-9.

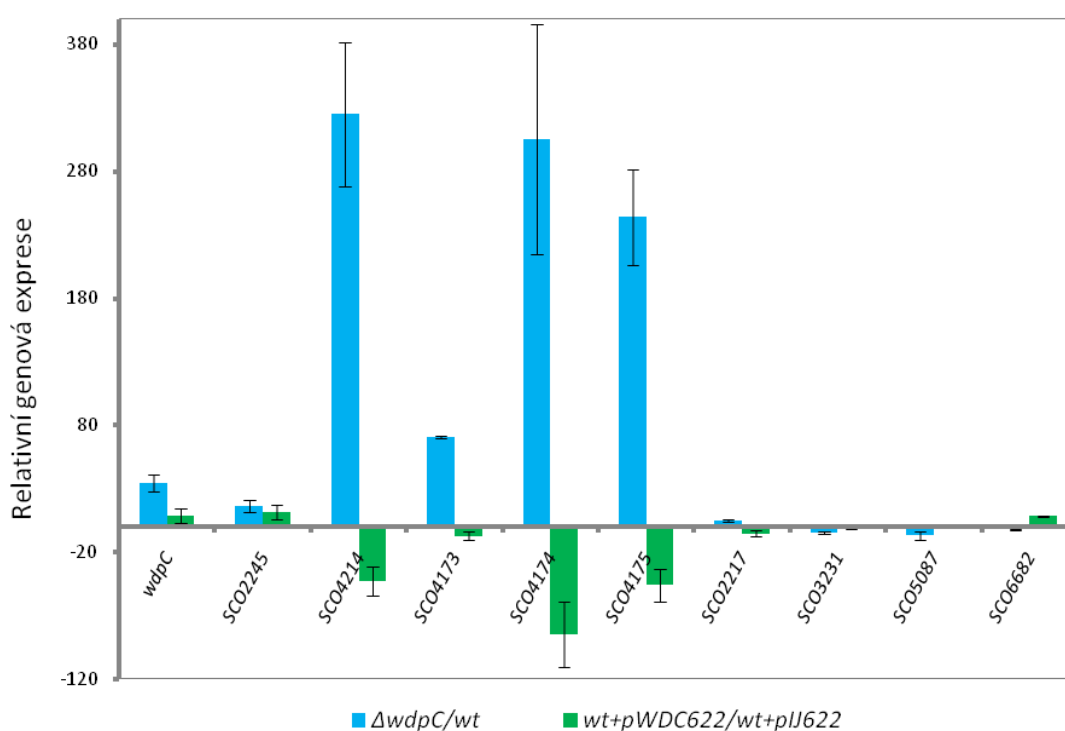


**Graf. 4-7: Hladina exprese vybraných genů u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  a u kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpB* v porovnání s divokým kmenem (grafické znázornění tabulky 4-9).** Relativní genová exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpB$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145, resp. poměr kmene s více funkčními kopiemi genu *wdpB* (*wt* + pWDS41) ku divokému kmeni M145 s prázdným vektorem (*wt* + pIJ486). Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpB$  nebo u *wt* + pWDS41 se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Analýza byla provedena pomocí qRT-PCR. Graf znázorňuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.

Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	Změna exprese	
		$\Delta wdpB$ / <i>wt</i>	<i>wt</i> +pWDS41 / <i>wt</i> +pIJ486
SCO0194	<i>litS</i> , putative sigma factor	-4,65 ( $\pm$ 0,92)	1,04 ( $\pm$ 0,02)
SCO1675	<i>chpH</i>	-10,24 ( $\pm$ 3,69)	1,29 ( $\pm$ 0,37)
SCO2718	<i>rdIA</i>	-15,19 ( $\pm$ 7,95)	1,31 ( $\pm$ 0,39)
SCO3231	<i>cdaPS2</i> , CDA peptide synthetase II	-2,67 ( $\pm$ 0,39)	1,15 ( $\pm$ 0,09)
SCO4002	<i>nepA</i>	-4,31 ( $\pm$ 0,59)	1,32 ( $\pm$ 0,45)
SCO5953	<i>wdpB</i> , putative membrane protein with WD-40 repetitive domains	19,54 ( $\pm$ 3,71)	7,81 ( $\pm$ 2,08)
SCO5954	probable chitinase (putative secreted protein)	34,51 ( $\pm$ 7,14)	-1,45 ( $\pm$ 0,33)
SCO6073	<i>geoA</i> , possible cyclase	-3,32 ( $\pm$ 1,01)	-1,64 ( $\pm$ 0,25)
SCO6682	<i>ramS</i> , surface-active peptide SapB	-17,52 ( $\pm$ 7,15)	1,61 ( $\pm$ 0,25)
SCO6992	<i>absR1</i> , regulatory protein	-8,95 ( $\pm$ 4,23)	1,37 ( $\pm$ 0,16)
SCO7701	2-methylgeranyl diphosphate synthase	-3,34 ( $\pm$ 0,80)	-1,18 ( $\pm$ 0,05)

**Tab. 4-9: Vliv delece genu *wdpB* a nadprodukce *wdpB* na expresi vybraných genů v porovnání s divokým kmenem.** Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpB$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145, resp. poměr kmene s více funkčními kopiemi genu *wdpB* (*wt* + pWDS41) ku divokému kmeni M145 s prázdným vektorem (*wt* + pIJ486). Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpB$  nebo u *wt* + pWDS41 se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty získané pomocí qRT-PCR ze tří nezávislých experimentů.

U kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpC* bylo zjištěno, že kromě samotného genu *wdpC* a genu *SCO2245* ležícího v jeho těsném sousedství dochází k indukci exprese také u genu *ramS* (*SCO6682*) kódující peptid SapB. U genů *SCO3231* a *SCO5087* (tedy genů sekundárního metabolismu) nebyla exprese nijak ovlivněna. U ostatních testovaných genů (*SCO2217*, *SCO4173–5* a *SCO4214*) byla exprese u kmenů s vyšším počtem kopií genu *wdpC* reprimována v porovnání s divokým kmenem. Výsledná data byla porovnána s relativní genovou expresí vybraných genů u mutantu  $\Delta wdpC$  a jsou graficky znázorněna v grafu 4-8 a číselně v tabulce 4-10.



**Graf. 4-8: Hladina exprese vybraných genů u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  a u kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpC* v porovnání s divokým kmenem (grafické znázornění tabulky 4-10).** Relativní genová exprese udává poměr transkripce genu u mutantu  $\Delta wdpC$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145, resp. poměr kmene s více funkčními kopiemi genu *wdpC* ( $wt + pWDC622$ ) ku divokému kmeni M145 s prázdným vektorem ( $wt + pIJ622$ ). Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů u  $\Delta wdpC$  nebo u  $wt + pWDC622$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. Analýza byla provedena pomocí qRT-PCR. Graf znázorňuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.

Název lokusu	Název genu, produkt genu (anglicky)	Změna exprese	
		$\Delta wdpC / wt$	$wt+pWDC622 / wt+pIJ622$
SCO2217	putative secreted protein	4,89 ( $\pm$ 0,70)	-5,27 ( $\pm$ 2,06)
SCO2244	<i>wdpC</i> , probable serine/threonine protein kinase with WD-40 repetitive domains	34,51 ( $\pm$ 6,64)	8,53 ( $\pm$ 5,82)
SCO2245	hypothetical protein	16,50 ( $\pm$ 4,86)	11,23 ( $\pm$ 5,65)
SCO3231	<i>cdaPS2</i> , CDA peptide synthetase II	-4,55 ( $\pm$ 1,12)	-1,55 ( $\pm$ 0,36)
SCO4173	hypothetical protein SCD66.10c	70,41 ( $\pm$ 1,10)	-7,16 ( $\pm$ 3,35)
SCO4174	putative integral membrane protein	305,02 ( $\pm$ 90,89)	-84,54 ( $\pm$ 25,59)
SCO4175	hypothetical protein SCD66.12c	243,80 ( $\pm$ 38,00)	-46,20 ( $\pm$ 12,87)
SCO4214	putative AbaA-like regulatory protein	325,17 ( $\pm$ 56,75)	-42,92 ( $\pm$ 11,41)
SCO5087	<i>actI-ORF1</i> , actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase a subunit	-6,93 ( $\pm$ 3,41)	1,14 ( $\pm$ 0,54)
SCO6682	<i>ramS</i> , peptide SapB	-2,35 ( $\pm$ 0,49)	8,23 ( $\pm$ 1,14)

**Tab. 4-10: Vliv delece genu *wdpC* a nadprodukce *wdpC* na expresi vybraných genů v porovnání s divokým kmenem.** Změna exprese udává poměr transkripce genu u mutantů  $\Delta wdpC$  ku divokému kmeni *S. coelicolor* M145, resp. poměr kmene s vícero funkčními kopiemi genu *wdpC* ( $wt + pWDC622$ ) vztaženo k divokému kmeni M145 s prázdným vektorem ( $wt + pIJ622$ ). Její kladná, resp. záporná hodnota znamená, že hladina exprese genů  $\Delta wdpC$  nebo u  $wt + pWDC622$  se vůči divokému kmeni zvýšila, resp. snížila. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty získané pomocí qRT-PCR ze tří nezávislých experimentů.

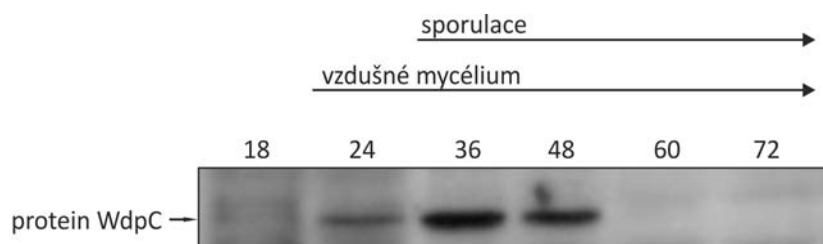
## 4.10 Detekce WD proteinů v buňkách *S. coelicolor* polyklonálními protilátkami

Testováním transkripce genů *wdpB* a *wdpC* v různých vývojových fázích růstu pomocí RT-PCR bylo zjištěno, že hladina transkriptu obou genů je v průběhu životního cyklu konstantní (viz kap. 4.5). Samotná přítomnost transkriptu nemusí znamenat, že koncentrace genových produktů (WdpB a WdpC) je rovněž neměnná. Pro stanovení přítomnosti proteinů WdpB, resp. WdpC byly připraveny polyklonální protilátky proti oběma WD proteinům a použity pro jejich detekci v celkových proteinových lyzátech získaných z mycélia sklizeného z mR3 agaru v různých časových intervalech.

Pomocí polyklonálních protilátek byl detekován protein odpovídající molekulové velikosti proteinu WdpC s expresí závislou na fázi životního cyklu. Zdá se, že protein WdpC se začíná exprimovat na začátku tvorby vzdušného mycélia (24. hod kultivace), nejvyšší hladiny exprese dosahuje na počátku sporulace (36. hod kultivace) a během následující sporulace postupně zcela vymizí (obr. 4-15).

Na rozdíl od proteinu WdpC se přítomnost proteinu WdpB polyklonální protilátkou prokázat nepodařilo, což může být dáno příliš nízkou hladinou testovaného proteinu v buňkách, která je pod detekčním limitem použitých metod.





**Obr. 4-15: Detekce proteinu WdpC polyklonální protilátkou v buněčném lyzátu *S. coelicolor* M145.** 30  $\mu$ g celkového proteinového lyzátu získaného z mycélia kultivovaném na mR3 miskách a sklizeném v různých časových intervalech (18., 24., 36., 48., 60. a 72. hod) bylo rozděleno pomocí SDS-PAGE a přeneseno na PVDF membránu. Imunodetekce byla provedena polyklonální protilátkou anti-WdpC a signál zachycen metodou ECL. Jako pozitivní kontrola byl použit fúzní protein s maltózo-vázající kotvou na N-konci (WdpC-MBP) exprimovaný v *E. coli*.

## 5. DISKUZE

### 5.1 Mutace v genech $\Delta wdpB$ a $\Delta wdpC$ způsobují defekt v morfologické i ve fyziologické diferenciaci

Je známo, že WD-40 repetitivní proteiny hrají významnou roli v eukaryotických regulačních drahách. Kromě jejich výskytu u rostlin a živočichů (včetně člověka) se uplatňují také u eukaryotických hub, kde se mimo jiné podílejí na regulaci diferenciaci.

Např. protein Fzr1 u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* je potřebný pro normální produkci spór. Mutace v genu *fzr1* způsobuje tvorbu aberantních věcek obsahujících pouze jednu až dvě zralé spóry, často bez vnější vrstvy buněčné stěny (Asakawa *et al.*, 2001). Na regulaci diferenciaci u plísně *Aspergillus nidulans* se podílí WD protein SfaD. Mutace v genu *sfaD* způsobuje potlačení vegetativního růstu, zvýšení sporulace a neschopnost tvořit pohlavní plodnice (Rosen *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2005). Další protein s WD-40 repetitivy u *Aspergillus nidulans* je protein RcoA, jehož disrupce způsobuje defekt ve vegetativním růstu, v produkci nepohlavních spór a v produkci toxinu strigmatocystinu (Hicks *et al.*, 2001). Podobně protein RCO1 u *Neurospora crassa* je nezbytný pro kontrolu vegetativního růstu, pohlavní rozmnožování a rovněž pro nepohlavní vývoj (Yamashiro *et al.*, 1996). Dobře prostudovaným WD repetitivním regulátorem u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je protein Tup1 vytvářející s proteinem Ssn6 korepresorový komplex (Keleher *et al.*, 1992), který se mj. podílí na regulaci pohlavního rozmnožování a sporulace (Smith a Johnson, 2000). Stejně jako eukaryotické houby jsou rovněž prokaryotické streptomycey půdními organizmy, které procházejí životním cyklem s morfologickou a fyziologickou diferenciací. Studium *S. coelicolor* odhalilo skutečnost, že existují také výrazné podobnosti v molekulární biologii diferenciaci vzdušného mycélia u hub a bakterií (Talbot, 2003). Díky podobnosti životních cyklů těchto jinak dosti odlišných organismů se dá předpokládat, že by mohly WD-40 repetitivní proteiny hrát důležitou roli jak v morfogenezi, tak v produkci sekundárních metabolitů také u těchto prokaryot.

Pro studium funkce WD-40 repetitivních proteinů u *S. coelicolor* byli vybráni tři zástupci z šesti možných kandidátů – WdpA, WdpB a WdpC. V případě proteinu WdpA se dá předpokládat, že se jedná o esenciální protein. Gen *wdpA* (SCO3869) je lokalizován v konzervované oblasti chromozomu v sousedství replikačního počátku *oriC* a mutantní

kmen s delecí v genu *wdpA* se dosud nepodařilo standardními postupy připravit (Petříčková, nepublikováno). Dizertační práce se tedy dále věnovala studiu dvou WD proteinů – WdpB a WdpC.

Připravené disruptční mutanty  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  jsou životaschopné, ale fenotypem se od divokého kmene liší. Pro kultivaci *S. coelicolor* byla zvolena pevná kultivační média, která připomínají přirozené prostředí pro půdní bakterie mnohem více než půdy tekuté. Navíc *S. coelicolor* patří mezi ty streptomyce, které nejsou schopné diferenciaci vzdušného mycélia a ani sporulace v tekutém médiu, a tudíž je tekuté médium pro morfologické studie zcela nevhodné prostředí. Kultivací  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  na různých minimálních i komplexních pevných půdách bylo zjištěno, že míra fenotypového projevu mutantních kmenů v porovnání s divokým kmenem je závislá na použitém kultivačním médiu. Pro veškeré fyziologické experimenty byly použity pevná kultivační média mR3 a GYM, na kterých mutantní kmeny  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  vykazovaly nejvýraznější fenotypový rozdíl v porovnání s divokým kmenem.

Přestože růstová rychlost byla u obou mutantních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  totožná s divokým kmenem, produkce pigmentu RED byla u obou mutantů výrazně redukována. Produkce druhého testovaného antibiotika Act byla opožděná pouze u mutantu  $\Delta wdpC$ .

Kromě vlivu disrupce genů *wdpB* a *wdpC* na produkci sekundárních metabolitů byl rovněž pozorován jejich vliv na morfologickou diferenciaci. Na agarových miskách s mR3 půdou byla zaznamenána razantní redukce tvorby vzdušného mycélia u mutantu  $\Delta wdpB$  a pomocí snímků z elektronového mikroskopu byl detekován defekt ve sporulaci na GYM agaru. Na začátku sporulace, což odpovídá 4. dni kultivace na GYM agaru, dochází u  $\Delta wdpB$  k netypickému větvení vzdušného mycélia, připomínajícímu substrátové mycélium. V průběhu sporulace, konkrétně 6. den kultivace, byla dále pozorována předčasná lyze vláken a nepravidelná tvorba sept mezi jednotlivými spórami. Po 8 dnech kultivace byly však u tohoto mutantu přítomny plně diferencované spóry, které se od divokého kmene nijak nelišily. Mutant je tedy schopen vytvořit typické spóry, ale ve srovnání s divokým typem je zpomalena septace sporogenních hyf. Podobný fenotyp byl zaznamenán u mutantu *whiG*. Mutant *whiG* se vyznačoval dlouhými rovnými vlákny vzdušného mycélia bez spirálovitého stáčení s občasným větvením podobajícím se substrátovým hyfám (Chater 1972; Flärdh 1999).  $\sigma^{WhiG}$  je alternativní  $\sigma$  faktor RNA polymerázy, který je považován za spouštěcí element celé sporulace. Jeho nadprodukce pak způsobuje předčasnou ektopickou sporulaci substrátového mycélia (Flärdh *et al.*, 1999). San Paolo a spol. (San Paolo *et al.*, 2006) zjistili, že také mutant v genovém shluku *rag* se

vyznačuje velice podobným fenotypem jako mutant *whiG*: neobvyklým větvením vzdušného mycélia bez spirálovitého stáčení a tvorbou krátkých řetízků spór s dvoudenním zpožděním v porovnání s divokým kmenem *S. coelicolor* J1501. Lokus *rag* aktivuje dráhu nezávislou na surfaktinu SapB vedoucí k formování vzdušného mycélia i sporulaci (San Paolo *et al.*, 2006) (viz obr. 2-9). Bylo navrženo, že genový shluk *rag* by mohl být zodpovědný za iniciaci sporulace aktivací regulační dráhy WhiG (San Paolo *et al.*, 2006). Popsaný fenotyp mutantu *rag* je velice podobný fenotypu mutantu *wdpB*. Nelze tedy vyloučit, že *wdpB* je součástí stejné regulační dráhy. Mutantní fenotyp pozorovaný u mutantu  $\Delta wdpB$  lze také přirovnat aberantnímu fenotypu mutantního kmene *bldM*, konkrétně mutantní alely R655. Mutantní alela R655 se vyznačuje nediferencovaným spirálovitě stočeným vzdušným mycéliem s občasným větvením (Ryding *et al.*, 1999). Na rozdíl od opožděné sporulace  $\Delta wdpB$ , mutantní alela R655 tvoří kolonie bílého zbarvení pouze se vzácným výskytem spór. Zatímco deleční mutace v celém lokusu *bldM* způsobuje fenotyp *bld*, bodové mutace ve třech různých alelách lokusu *bldM* se projevují v podobě různých defektů ve sporulaci, což znamená, že různé alely tohoto lokusu mohou blokovat vývoj streptomycet v odlišném stádiu vývoje.

U mutantu  $\Delta wdpC$  bylo pozorováno, že dochází k slabé redukci tvorby vzdušného mycélia. Po 4 dnech kultivace na GYM agaru vytvářel kmen  $\Delta wdpC$  abnormálně rovná vlákna bez spirálovitého stáčení. Spirálovité stáčení vzdušného mycélia jako první fáze diferenciace spór se u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  objevuje až převážně 6. den kultivace na rozdíl od divokého kmene, kdy je jasně patrné již 4. den kultivace na GYM agaru. Lze tedy konstatovat, že i u mutantu  $\Delta wdpC$  dochází k opoždění tvorby spór. Diferenciace vzdušného mycélia u mutantu  $\Delta wdpC$  se vyznačuje ještě jedním významným defektem, a tím je rozsáhlá předčasná lyze vláken objevující se 6. den kultivace. Po 8 dnech se zdá být morfologie sporulujících vláken u mutantu  $\Delta wdpC$  shodná s *wt*.

Protein WdpC se složením funkčních domén podobá MEK kináze (MEKK $\alpha$ ) u hlenky *Dictyostelium discoideum* (Chung *et al.*, 1998). Kromě F-boxu obsahuje MEKK $\alpha$ , stejně jako WdpC, proteinkinázovou doménu a WD-40 repetice a podílí se na regulaci buněčné diferenciace podobně jako WdpC. Protein WdpC se složením funkčních domén také podobá proteinu PkwA z termofilní aktinomycety *Thermomonospora curvata* (Petrickova *et al.*, 2006). Ovšem jak uvádějí autoři, s vysokou pravděpodobností se nejedná o ortologní proteiny, jelikož jejich odvozené aminokyselinové sekvence jsou značně odlišné (vykazují pouze podobnost 30,5 %), a rovněž geny sousedící s *pkwA* a *wdpC* na chromozomu se dosti liší. Domněnku, že proteiny PkwA a WdpC plní v buňce odlišnou

funkci, potvrzuje i skutečnost, že PkwA je exprimován v časných fázích životního cyklu, zatímco protein WdpC se začíná exprimovat na začátku tvorby vzdušného mycélia a nejvyšší hladiny exprese dosahuje na počátku sporulace (viz kap. 5.5).

## 5.2 Proteiny WdpB a WdpC ovlivňují expresi celé řady genů *S. coelicolor*

Analýza globálního transkriptomu mutantního kmene  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$  v porovnání s divokým kmenem *S. coelicolor* pomocí DNA čipů odhalila skutečnost, že produkty obou testovaných genů výrazně ovlivňují expresi řady genů. U obou mutantních kmenů bylo mnoho genů v porovnání s divokým kmenem převážně reprimováno. Geny, jejichž exprese byla, ať už pozitivně, či negativně ovlivněna v disrupčních mutantech  $\Delta wdpB$  či  $\Delta wdpC$ , kódují mimo jiné proteiny nezbytné pro formování vzdušného mycélia, sporulaci, produkci sekundárních metabolitů a také kódují proteiny primárního metabolismu a řadu proteinů o neznámé funkci. Dále bude podrobněji diskutována pouze funkce některých z nich, jelikož z převážné většiny se jedná právě o geny s neznámou funkcí.

### 5.2.1 Vliv disrupce genu *wdpB* na expresi genů u *S. coelicolor*

**Formování vzdušného mycélia.** U mutantního kmene  $\Delta wdpB$  byla zaznamenána snížená exprese genů kódujících proteiny uplatňující se při formování vzdušného mycélia. Do této skupiny genů patří genový shluk *ram*, chapliny a rodliny.

**Genový shluk *ram*.** Exprese operonu *ramCSAB* je řízena transkripčním aktivátorem *RamR* (Nguyen *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2002; O'Connor a Nodwell, 2005), jehož exprese byla u mutantu  $\Delta wdpB$  rovněž reprimována, a dosahuje podobně jako gen *ramS* nejvyšší represe transkripce na začátku formování vzdušného mycélia. Promotor genu *ramR* vykazuje největší aktivitu právě těsně před začátkem a na začátku tvorby vzdušného mycélia a během následující diferenciaci mycélia postupně jeho aktivita slábne (Keijser *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002). U mutantu  $\Delta wdpB$  byla potlačena exprese celého operonu *ramCSAB*, včetně genu *ramS* kódující peptid SapB, a to díky snížené expresi genu *ramR*. Toto pozorování je v souladu s výše zmíněným fenotypovým projevem, kdy u mutantu  $\Delta wdpB$  byla zaznamenána snížená tvorba vzdušného mycélia. Redukce vzdušných vláken u  $\Delta wdpB$  je pravděpodobně způsobena sníženou hladinou produkce

povrchově aktivních látek, které usnadňují překonání povrchového napětí a dovolují vzniku a diferenciaci vzdušného mycélia ze substrátového (Wosten a Willey, 2000). Jedním z těchto biosurfaktantů je peptid SapB, který je produkován na bohatých médiích (Capstick *et al.*, 2007).

Jak bylo uvedeno v kapitole 5.1, transkripční regulátor RamR aktivuje kromě operonu *ramCSAB* také genový shluk *rag*, který se svým složením genů výrazně podobá shluku *ram* (San Paolo *et al.*, 2006). Lze předpokládat, že zaznamenaný pokles exprese regulačního genu *ramR* by se měl projevit i snížením exprese operonu *rag*. Ve 48. hodině, která byla základním časovým bodem pro analýzu změn transkripčních profilů u mutanta  $\Delta wdpB$ , byla však úroveň transkripce *rag* shluku stejná s divokým typem. Následující experimenty, sledující detailněji průběh exprese vybraných postižených genů v čase, však prokázaly největší pokles exprese regulačního genu *ramR* již mnohem dříve, v 28. hodině kultivace. Je tedy možné, že k významnému snížení exprese shluku *rag* dochází právě v této fázi životního cyklu. Tuto hypotézu dále podporuje skutečnost, že fenotyp vzdušného mycélia kmene  $\Delta wdpB$  je téměř identický s fenotypem  $\Delta ragABKR$  (viz kap. 5.1) (San Paolo *et al.*, 2006). Protein WdpB by mohl být transkripčním aktivátorem genu *ramR* kódující transkripční regulátor RamR, který způsobuje aktivaci genového shluku *rag* a ten následně spouští sporulaci prostřednictvím  $\sigma^{WhiG}$ .

**Chapliny.** Druhou skupinou genů kódujících povrchově aktivní látky, jejichž exprese byla u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  v porovnání s divokým kmenem snížena, jsou chapliny. U čtyř z osmi těchto amfipatických proteinů byl zaznamenán pokles exprese – u chaplinů *C*, *D*, *E* a *H*. Chapliny jsou, podobně jako SapB, zodpovědné za tvorbu vzdušného média na různých kultivačních médiích, např. R2YE, MS (Claessen *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2004; Elliot *et al.*, 2003). Tvorbou povrchově aktivního pouzdra amyloidního charakteru na povrchu vláken usnadňují prolomení interfáze vzduch-voda a uvolnění vzdušných hyf ze substrátu (Claessen *et al.*, 2003). Kromě jejich funkce ve formování vzdušného mycélia jsou chapliny společně s rodliny zodpovědné za tvorbu tzv. „rodlet“ ultrastruktury, typické vrstvy s tyčinkovitým designem na povrchu vzdušného mycélia a spor (Claessen *et al.*, 2004; Claessen *et al.*, 2006). V neposlední řadě hrají chapliny také důležitou úlohu ve schopnosti adheze *S. coelicolor* k podkladu (de Jong *et al.*, 2009b).

**Rodliny.** Třetí skupinou genů podílejících se na morfogenezi *S. coelicolor*, jejíž exprese byla u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  reprimována, jsou rodliny. Jedná se o geny *rllA* a *rllB*, které kódují proteiny potřebné spolu s chapliny pro vytvoření charakteristické vrstvy

s tyčinkovitým designem na povrchu vzdušného mycélia a spór (tzv. rodlet layer). Rodliny jsou nezbytné pro adhezi k hydrofobním povrchům, ale nikoliv pro vzpřimování vzdušného mycélia z kultivačního média do vzduchu (Claessen *et al.*, 2002; Claessen *et al.*, 2004).

**Gen *nepA*.** Gen uplatňující se během morfologické diferenciaci *S. coelicolor*, jehož exprese byla u mutantu  $\Delta wdpB$  reprimována, je gen *nepA*. K nejvyšší repressi transkripce genu *nepA* u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  dochází během formování vzdušného mycélia, během sporulace pak postižení postupně slábne. Gen *nepA*, jehož exprese je závislá na faktoru  $\sigma^N$ , je přepisován během diferenciaci vzdušného mycélia a sporulace (Dalton *et al.*, 2007). Je exprimován ve spórách (de Jong *et al.*, 2009) a v nově objeveném buněčném kompartmentu v tzv. subapikálním stonku (Dalton *et al.*, 2007). Jedná se kompartment spojující substrátové mycélium se sporulační částí vzdušného mycélia. NepA je strukturální nerozpustný protein buněčné stěny, který se uplatňuje v udržení dormance spór za nepříznivých podmínek prostředí. Mutace v genu *nepA* způsobuje urychlení germinace a následné morfogeneze (de Jong *et al.*, 2009). Skutečnost, že mutace genu *nepA* se projevuje urychlením germinace, koresponduje s pozorováním, že mutant  $\Delta wdpB$ , v genetickém pozadí bezplazmidového derivátu kmene *S. coelicolor* J1501, vykazoval schopnost předčasné germinace nezralých spór, které bylo pozorováno jako boční klíčení spór na sporulačním vlákne (Petříčková, nepublikováno).

**Sporulační geny.** U mutantu  $\Delta wdpB$  byla zaznamenána snížená exprese také několika sporulačních genů – *whiH*, SCO4675, SCO4676 a SCO4677 (*rsfA*) a zvýšená exprese sporulačního genu *whiI*.

**Geny *whiH* a *whiI*.** Protein WhiH aktivuje expresi genu *ftsZ* kódujícího protein nezbytný pro tvorbu sporulačních sept (Flärdh *et al.*, 2000). Mutace v genu *whiH* se projevuje redukcí spórového pigmentu a vznikem z velké části nediferencovaných vzdušných vláken s ojedinělými sporulačními septy a nepravidelně rozdělovaným nukleoidem (Flärdh *et al.*, 1999; Schwedock *et al.*, 1997). V souladu s tím jsme u *wdpB* mutantu pozorovali nepravidelnou či opožděnou tvorbu přepážek mezi spórami, která by mohla být přímým důsledkem nižší hladiny transkriptu genu *whiH* u mutantu  $\Delta wdpB$  v porovnání s divokým kmenem. Zvýšení transkripce dalšího sporulačního genu *whiI*, by zde také mohlo sehrát určitou roli. Protein WhiI je totiž rovněž zodpovědný za tvorbu sept, a navíc také za kondenzaci nukleoidu (Ainsa *et al.*, 1999). Kromě své vlastní exprese reprimuje protein WhiI také expresi genu *whiH* (Ainsa *et al.*, 1999). K poklesu exprese

*whiH* by tedy mohlo docházet také vlivem zvýšení transkripce genu pro jeho represor, *WhiI*. Je však třeba vzít v úvahu, že zvýšená exprese genu *whiI* u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  v porovnání s divokým typem nebyla zdárně ověřena pomocí qRT-PCR, jelikož se nepodařilo navrhnout funkční oligonukleotidy pro amplifikaci. Nemůžeme tedy zcela vyloučit možnost vzniku artefaktu naměřeného pomocí DNA čipů.

**Geny SCO4675–77.** Další geny, u nichž byla zaznamenána snížená exprese u mutantu  $\Delta wdpB$ , jsou hypotetické geny SCO4675, SCO4676 a s nimi sousedící gen SCO4677 (*rsfA*) kódující anti-sigma faktor pro  $\sigma^F$ , který je potřebný k navození pozdní fáze sporulace. Delece genu SCO4677 způsobuje nadprodukcí Act a urychluje sporulační proces (Kim *et al.*, 2008).

**Sekundární metabolismus.** Dále byla u mutantního kmene  $\Delta wdpB$  pozorována snížená exprese genů kódujících proteiny, jež jsou zapojeny do regulace či biosyntézy sekundárních metabolitů. Významně byla snížena exprese genu *absR1* (SCO6992), kódujícího pravděpodobný aktivátor sekundárního metabolismu.

**Genový shluk *cda*.** U  $\Delta wdpB$  dochází ve 48. a 96. hod kultivace ke snížení exprese biosyntetického genového shluku *cda*. Efekt mutace byl prokazatelně pozorován u 26 ze 40 genů biosyntetického genového shluku *cda*, nicméně u specifického transkripčního aktivátoru shluku, *cdaR*, jsme jej v našich pokusech nezaznamenali. Je možné, že snížení hladiny exprese *cdaR* u  $\Delta wdpB$  bylo pod detekčním limitem použité metody.

**Genový shluk *cch*.** U mutantu  $\Delta wdpB$  bylo rovněž pozorováno mírné snížení exprese genů genového shluku *cch* pro syntézu coelichelinu.

**Genový shluk *crt*.** Další genový shluk sekundárního metabolismu se sníženou expresí u  $\Delta wdpB$  je genový shluk *crt* pro syntézu karotenoidů. Exprese genového shluku *crt* je u  $\Delta wdpB$  nejvíce snížena ve 48. hod kultivace a efekt mutace se s narůstajícím časem postupně zmenšuje.

**Geosmin a methylisoborneol.** Výsledky z globálního transkriptomu ověřené pomocí qRT-PCR odhalily, že je též postižena exprese genů kódujících enzymy pro syntézu sekundárních metabolitů, které udělají mycéliu charakteristickou „vůni vlhké zeminy“ – methylisoborneolu a geosminu. Jak u genu *geoA* (SCO6073) pro syntézu geosminu, tak u genu SCO7701 (součást lokusu pro syntézu methylisoborneolu) byla ve 48. hod kultivace stanovena přechodná snížená exprese v porovnání s divokým kmenem. V pozdějších časových stádiích vývoje je hladina transkriptu těchto genů shodná s divokým kmenem.



**Gen *eshA* (SCO7699).** V bezprostřední blízkosti proti směru transkripce genu SCO7700 kódující 2-methylisoborneol syntázu leží gen *eshA* (SCO7699), jehož exprese byla u  $\Delta wdpB$  rovněž snížena. Jedná se o gen kódující protein sdílející značnou podobnost se sporulačním specifickým proteinem EshA z *S. griseus* (Kwak *et al.*, 2001). U *S. coelicolor* ovlivňuje produkci Act (Kawamoto *et al.*, 2001).

**Geny *wdpB* a SCO5954.** Vůbec k nejvýraznější změně exprese u mutantu  $\Delta wdpB$  dochází u samotného genu *wdpB* (SCO5953) a s ním sousedícího genu SCO5954. Expresе obou těchto genů byla značně zvýšena v porovnání s divokým kmenem. V této dizertační práci bylo prokázáno, že oba geny *wdpB* a SCO5954 jsou přepisovány společně v rámci jednoho operonu, do kterého jsou zapojeny ještě dva geny SCO5951 a SCO5952 ležící proti směru transkripce genu *wdpB*. Tento výsledek ovšem ještě neznamená, že tato sekvence čtyř genů obsahuje pouze jeden společný promotor. Naopak zvýšená exprese obou genů *wdpB* a SCO5954 a nezměněná exprese genů SCO5951 a SCO5952  $\Delta wdpB$  naznačují, že oba tyto geny, ležící na konci testovaného kotranskriptu, by mohly mít ještě navíc vlastní promotor. Zvýšená exprese genu SCO5954 by se dala vysvětlit tím, že gen SCO5954 kódující potenciální chitinázu je reprimován proteinem WdpB, který by mohl působit zároveň jako autoregulátor vlastní transkripce (viz 5.3). Ovšem nelze ani vyloučit možnost, že indukce exprese genu SCO5954  $\Delta wdpB$  byla důsledkem polárního efektu, který byl způsoben konstrukcí disruptivní mutanty, a jedná se tak o artefakt. K vyloučení této pochybnosti by přispěla příprava komplementačního mutantu, který by se fenotypově a i na úrovni exprese mRNA měl podobat divokému kmeni, čímž by se jednoznačně prokázalo, že sledované projevy jsou funkčním důsledkem proteinu WdpB. V současné době se snažíme připravit komplementační konstrukt s genem *wdpB* na nízkokopiovém vektoru, který bohužel nebyl z časových důvodů do odevzdání dizertační práce dokončen.

### 5.2.2 Vliv disrupce genu *wdpC* na expresi genů u *S. coelicolor*

Nejvýraznější indukce exprese u mutantu  $\Delta wdpC$  byla detekována u genů *wdpC*, SCO2245, SCO4214 a operonu SCO4173–5.

**Gen *wdpC* (SCO2244) a SCO2245.** U mutantu  $\Delta wdpC$  byla zaznamenána, podobně jako v případě genu *wdpB* u mutantu  $\Delta wdpB$ , zvýšená exprese samotného genu *wdpC*, což se dá vysvětlit autoregulační funkcí produktu genu *wdpC* (viz 5.3). Kromě zvýšené exprese genu *wdpC* docházelo také u  $\Delta wdpC$  k indukci exprese genu SCO2245 ležícího před genem

*wdpC* ve směru transkripce. Gen SCO2245 kóduje hypotetický protein podobající se řadě hypotetických proteinů ve streptomycetách, jako např. produktu genu ORFD z lokusu *abaA*, který ovlivňuje produkci antibiotik (Fernandez-Moreno *et al.*, 1992). V této dizertační práci bylo prokázáno, že oba geny *wdpC* a SCO2245 spolu s geny SCO2246 a SCO2247 tvoří operon a jsou tudíž přepisovány v podobě polycistronní mRNA. Protože změna exprese genů SCO2246 a SCO2247 nebyla u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  detekována, je možné se domnívat, že geny SCO2245 a *wdpC* mohou být přepisovány nejenom ze společného promotoru pro celý operon SCO2244–47, ale také z vlastního promotoru.

**Gen SCO4214.** Další gen, u kterého dochází k indukci exprese u mutantu  $\Delta wdpC$ , je gen SCO4214. Jedná se o pravděpodobný protein příbuzný pleiotropním regulátorům typu AbaA. Podobně jako dříve popsané geny *afs* a *abs*, také lokus *abaA* přispívá k pleiotropní regulaci produkce antibiotik u streptomycet (Fernandez-Moreno *et al.*, 1992).

**Operon SCO4173–5.** U mutantu  $\Delta wdpC$  byla detekována výrazná zvýšená exprese tří genů ležících vedle sebe na chromozomu: SCO4173–5. Kotranskripční analýzou pomocí RT-PCR bylo prokázáno, že geny SCO4173–5 jsou koexprimovány v podobě polycistronní mRNA (data nejsou prezentována). Jedná se tedy o operon složený ze tří genů SCO4173–5. Gen SCO4173 kóduje hypotetický protein a sdílí vysokou sekvenční podobnost s geny neznámé funkce u *S. avermitilis*, *S. griseus*, *S. flavogriseus* a *S. scabies*. Ve směru transkripce se před genem SCO4173 nachází gen SCO4174 kódující pravděpodobný integrální membránový protein. A konečně před genem SCO4174 ve směru transkripce leží v těsném sousedství gen SCO4175 kódující hypotetický protein. Sprusansky a spol. zjistili, že inzerční inaktivace genu SCO4174 způsobila nadprodukcí antibiotik a předčasnou sporulaci na bohatém médiu (Sprusansky *et al.*, 2003). Pozorovaná zvýšená exprese celého operonu SCO4173–5 u mutantu  $\Delta wdpC$ , snížená produkce pigmentů RED a Act a opožděná sporulace u  $\Delta wdpC$  jsou v souladu s výše zmíněným pozorováním u mutantního kmene s inzerční inaktivací genu SCO4174. Lze se domnívat, že zvýšená hladina genu SCO4174, potažmo celého operonu SCO4173–5, u mutantu  $\Delta wdpC$  mohla vyvolat pozorovaný fenotyp, který je zcela opačný fenotypu u mutantního kmene s inzerční inaktivací genu SCO4174. Tento předpoklad potvrzuje i pozorování, že mutantní kmen s vyšším počtem kopií genu *wdpC* (kmen *wt* + pWDC622), u něhož byla zaznamenána represe transkripce celého operonu SCO4173–5, nadprodukuje pigment Act. Chová se tedy podobně jako kmen s inzerční inaktivací genu SCO4174 (Sprusansky *et al.*, 2003).

Podobnost kinetiky transkripčních profilů genu *wdpC*, genu SCO4214 a operonu SCO4173–5 (viz tab. 4-8 a graf 4-5) napovídá, že by funkce těchto genů mohla spolu úzce

souviset a mohly by být součástí jedné regulační dráhy. Geny *wdpC*, SCO4214 a SCO4171, a tedy i pravděpodobně celý operon SCO4173–5 dosahovaly maximální indukce exprese ve 48. hod kultivace (během sporulace).

**Gen *whiI*.** U mutantního kmene  $\Delta wdpC$  byla pomocí DNA čipů stanovena zvýšená exprese sporulačního genu *whiI*. Jak bylo uvedeno výše, protein WhiI je zodpovědný za tvorbu sept a za kondenzaci nukleoidu (Ainsa *et al.*, 1999).

Je třeba si však uvědomit, že zvýšenou expresí genu *whiI* u mutantního kmene  $\Delta wdpC$  v porovnání s divokým typem se podobně jako u mutantu *wdpB* nepodařilo pomocí qRT-PCR ověřit. Na druhou stranu bylo popsáno, že jedním z cílových genů, jehož exprese je závislá na přítomnosti proteinu WhiI, je gen SCO4174 kódující pravděpodobný integrální membránový protein (viz výše). Analýzou transkriptomu delečního mutantního kmene *whiI* bylo zjištěno, že u mutantu *whiI* dochází k represí exprese genu SCO4174 (Tian *et al.*, 2007). Zvýšená hladina WhiI by tedy mohla být přímou příčinou vyšší transkripce operonu SCO4173-5.

**$\sigma^U$  regulon.** U mutantu  $\Delta wdpC$  byla zaznamenána zvýšená exprese u několika genů patřících do  $\sigma^U$  regulonu. Jedná se o geny SCO0644, SCO0930 a SCO2217. Sigma faktor RNA polymerázy  $\sigma^U$  s extracytoplazmatickou funkcí není za běžných podmínek pro diferenciaci streptomycet vyžadován. Avšak deregulace aktivity  $\sigma^U$  dosažená inzerční inaktivací genu *rsuA* kódujícího anti-sigma faktor způsobuje fenotyp *bld* a zpoždění produkce Act (Gehring *et al.*, 2001). Gordon a spol. stanovil extracelulární proteom u mutantu v genu *rsuA*, který vykazoval zvýšenou aktivitu v genu *sigU* (Gordon *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že u tohoto mutantu *rsuA* dochází ke zvýšení exprese řady proteinů, mj. i produktů genů SCO0644, SCO0930 a SCO2217. Ke zvýšení exprese genů kódující tyto proteiny dochází také u mutantu  $\Delta wdpC$ . Zvýšená hladina sigU ovšem nebyla u  $\Delta wdpC$  zaznamenána.

**Morfologická diference.** Disrupce genu *wdpC* ovlivnila i expresi několika genů uplatňujících se v morfogenezi. Jedná se o genový shluk *ram* a sporulační gen *whiE*.

**Genový shluk *ram*.** Snížená exprese genového shluku *ram*, přesněji řečeno genů *ramS* a *ramC*, zaznamenaná u mutantu  $\Delta wdpC$  na DNA čípech, byla ověřena pomocí qRT-PCR testováním exprese genu *ramS* a genu *ramR* kódující aktivátor transkripce operonu *ramCSAB*. Z výsledků vyplývá, že pozorovaný mírný pokles exprese není statisticky signifikantní (*ramR*), a nebo je na hranici statistické významnosti (*ramS*

testovaný ve 28. a 64. hod kultivace). Zdali ve skutečnosti dochází k mírné represi exprese genu *ramS* a tedy i operonu *ramCSAB*, nelze tudíž zcela jasně říci.

**Gen *whiE*.** U mutanta  $\Delta wdpC$  dále dochází k potlačení exprese pozdního sporulačního genu *whiE-ORFIII*. Lokus *whiE* je složen z osmi genů, z nichž většina kóduje enzymy pro syntézu polyketidů. Geny *whiE* jsou přepisovány v pozdní fázi sporulace a zajišťují syntézu typického šedého spórového pigmentu (Kelemen *et al.*, 1998). Fenotypový projev odlišné intenzity zbarvení spór nebyl mezi mutantem  $\Delta wdpC$  a divokým typem pozorován.

**Sekundární metabolismus.** U mutanta  $\Delta wdpC$  byla pozorována snížená exprese řady genů sekundárního metabolismu. Jedná se o biosyntetické genové shluky *act*, *cda*, *cch* a *cpk*.

**Genový shluk *act*.** U mutanta  $\Delta wdpC$  bylo detekováno snížení exprese genů kódujících proteiny zodpovědné za syntézu pigmentu Act, a to včetně genu *actII-ORF4* kódující specifický aktivátor transkripce celého genového shluku *act*. Ke snížení hladiny transkriptu těchto genů u  $\Delta wdpC$  začalo docházet v 64. hod kultivace a s rostoucím časem se represe transkripce genů postupně snižovala. Toto pozorování je v souladu s fenotypem určeným jak porovnáním kultivačních misek, tak spektrofotometricky stanovením aktinorodinu u mutanta  $\Delta wdpC$ , který rovněž vykazoval sníženou produkci Act.

**Biosyntetický genový shluk *cda*.** Dalším genovým shlukem sekundárního metabolismu, jehož exprese byla u  $\Delta wdpC$  potlačena v porovnání s divokým kmenem byl genový shluk *cda* pro biosyntézu antibiotika CDA, a to včetně genu *cda* kódujícího specifický aktivátor transkripce lokusu *cda*. Mírné snížení exprese těchto genů u  $\Delta wdpC$  bylo pozorováno ve 48. hod kultivace a dosahovalo maxima v 64. a 72. hod kultivace.

**Genový shluk *cch*.** U mutanta  $\Delta wdpC$  byla také pozorována snížená exprese genů genového shluku *cch* pro syntézu coelichelinu. Po ověření výsledků z DNA čipů pomocí qRT-PCR bylo však zjištěno, že snížená hladina transkriptu u genů genového shluku *cch* v mutantním kmeni  $\Delta wdpC$  byla na hranici statistické významnosti.

**Genový shluk *cpk*.** Poslední genový shluk sekundárního metabolismu, u něhož došlo k represi transkripce u mutantního kmene  $\Delta wdpC$ , je lokus *cpk* pro syntézu žlutého pigmentu yCPK a sloučeninu s antimikrobiální aktivitou abCPK (Gottelt *et al.*, 2010; Pawlik *et al.*, 2010).

Lze konstatovat, že výsledky získané analýzou transkriptomu a analýzou transkripčních profilů vybraných genů během životního cyklu u mutantů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  potvrdily aberantní fenotypový projev obou mutantních kmenů. Analýza transkriptomů odhalila, že delece genu *wdpB*, nebo *wdpC*, mají pleiotropní efekt a ovlivňují především expresi genů zodpovědných za morfologickou diferenciaci, a také genů sekundárního metabolismu. Jedinou výjimkou je produkce pigmentu RED, jehož redukce byla zaznamenána u obou disruptčních mutantů jak na snímcích mycélia kultivovaném na mR3 agaru, tak spektrofotometrickým stanovením chloroformového extraktu z mycélia, ovšem snížená exprese genů genového shluku RED nebyla detekována. Je možné předpokládat, že přímá či nepřímá regulace exprese genů kódujících proteiny zodpovědné za biosyntézu RED není zajišťována na úrovni transkripce, ale spíše na úrovni posttranskripční či posttranslační regulace.

### 5.3 Autorepresní a regulační účinek produktů genů *wdpB* a *wdpC*

Výše zmíněné výsledky odhalily skutečnost, že u obou mutantních kmenů *wdpB* a  $\Delta wdpC$  dochází ke zvýšení exprese samotných testovaných genů *wdpB*, resp. *wdpC*, což by mohlo znamenat, že tyto geny s WD-40 repeticemi podléhají autoregulaci a jsou samy sobě represorem transkripce. Jiným možným vysvětlením je změna stability mRNA způsobená delecí části genové sekvence při konstrukci mutantních kmenů. Skutečnost, že dochází ke zvýšení exprese obou testovaných genů v příslušných disruptčních mutantech, byla zjištěna díky tomu, že na DNA čípech od firmy Oxford Gene Technology je pro jeden gen navrženo často několik sond. Pokud tedy je alespoň jedna ze sond navržena mimo sekvenci genu *wdpB*, resp. *wdpC*, která byla odstraněna při konstrukci mutantního kmene, lze změnu v expresi testovaného genu *wdpB*, resp. *wdpC* stanovit i v samotném mutantním kmeni  $\Delta wdpB$ , resp.  $\Delta wdpC$ .

Kromě jejich předpokládané autoregulační funkce lze ze získaných transkripčních profilů obou mutantních kmenů  $\Delta wdpB$  a  $\Delta wdpC$  usuzovat, že působí rovněž jako represory transkripce. Zdá se, že protein WdpB by mohl reprimovat expresi genu SCO5954 a protein WdpC expresi genů SCO2245, SCO4173–5, SCO4214 a SCO2217. Vzhledem k tomu, že ani jeden z proteinů neobsahuje ve své sekvenci predikovaný DNA vazebný motiv a naopak obsahují protein-proteinový motiv WD-40 domén, je pravděpodobné, že jejich regulační funkce jsou zprostředkovány vytvořením např. korepresorového komplexu s neznámým regulačním DNA vazebným proteinem. Obdobně je tomu u celé řady eukaryotických

WD-40 regulátorů, např. u korepresorového komplexu Tup1-Ssn6 u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Keleher *et al.*, 1992), který se mimo jiné podílí na regulaci pohlavního rozmnožování a sporulace (Smith a Johnson, 2000). Není ovšem vyloučena ani jejich aktivační funkce, ať už přímá či nepřímá. Protein WdpB by mohl aktivovat geny např. *chpH*, *rldA*, *nepA*, genový shluk *ram*, zatímco protein WdpC by mohl aktivovat např. genový shluk *cda* či *act*. Stejně tak komplex Tup1-Ssn6 může působit na některé geny zcela opačně, a to jako aktivátor transkripce (Kim *et al.*, 2005b; Mennella *et al.*, 2003; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2002; Proft a Struhl, 2002).

## 5.4 Peptid SapB jako hlavní příčina redukce vzdušného mycélia u $\Delta wdpB$

Předpoklad, že snížená produkce peptidu SapB byla hlavní příčinou redukce tvorby vzdušného mycélia u  $\Delta wdpB$ , byl podpořen extracelulární komplementací mutantního kmene  $\Delta wdpB$  kmenem divokým. Pokud byly oba kmeny kultivovány ve vzájemném sousedství, pak došlo k částečnému obnovení tvorby vzdušného mycélia na okraji kolonií mutanta. V alternativním uspořádání experimentu bylo navíc prokázáno, že tato indukce tvorby vzdušného mycélia u  $\Delta wdpB$  není závislá na přímé přítomnosti divokého kmene, ale dochází k ní i při kultivaci mutantního kmene  $\Delta wdpB$  na médiu použitém původně pro kultivaci divokého kmene. Z těchto experimentů lze usoudit, že stimulace formování vzdušného mycélia u  $\Delta wdpB$  je způsobena účinkem extracelulárního signálu, který byl produkován divokým kmenem do média. Touto látkou by v souladu s výsledky z transkriptomu mutantního kmene  $\Delta wdpB$  mohl být surfaktant SapB sekretovaný do média, jehož exprese je v  $\Delta wdpB$  výrazně redukována, a to především na začátku formování vzdušného mycélia. K tomuto tvrzení přispívá i fakt, že SapB je produkován pouze na tzv. bohatých půdách (Capstick *et al.*, 2007), k nimž patří i námi používaný mR3 agar. To je také asi důvodem, proč nebyla detekována snížená tvorba vzdušného mycélia u  $\Delta wdpB$  také třeba na MS agaru, na kterém se SapB neprodukuje (data neuvedena).

K snížené tvorbě vzdušného mycélia by mohly také určitou měrou přispět chapliny, jejichž exprese je u mutanta  $\Delta wdpB$  snížena. Jsou produkovány jak na bohatých, tak chudých médiích (Claessen *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2004; Elliot *et al.*, 2003). Podobně jako SapB jsou některé z nich, ChpE a ChpH, sekretovány do média před formováním vzdušného mycélia (Claessen *et al.*, 2003).

## 5.5 Protein WdpC je exprimován především na začátku sporulace, protein WdpB se nepodařilo v *S. coelicolor* detekovat

Jelikož se u obou studovaných genů podařilo zdárně připravit disruptční mutanty, lze konstatovat, že ani jeden z genů *wdpB* či *wdpC* není esenciální. Gen *wdpB* se navíc nachází na jednom z ramen chromozomu, která kódují v podstatě výhradně geny nutné pro adaptivní odpověď mikroorganismu. Dá se předpokládat, že většina adaptivních genů není v laboratorních kultivačních podmínkách buňkou vůbec využívána, a jejich funkce zůstává pak často neodhalena. V rámci této dizertační práce jsme ovšem zjistili, že gen *wdpB* je během životního cyklu exprimován konstitutivně. Pokusy o detekci proteinu WdpB polyklonální protilátkou byly však neúspěšné i přesto, že bylo pro identifikaci použito velké množství proteinového lyzátu a samotná imunologická detekce polyklonální protilátkou byla provedena za podmínek, kdy již docházelo k vizualizaci i nespecificky reagujících proteinů. Specifita a citlivost polyklonálních protilátek byla samozřejmě předem testována detekcí purifikovaného proteinu WdpB izolovaného z expresního kmene *E. coli* CAG629 s plazmidem pMALWDBg. Důvodem neúspěchu detekce proteinu WdpB v celkových proteinových lyzátech by mohla být příliš nízká koncentrace této bílkoviny v buňkách, která je pod detekčním limitem používaných metod, nebo jeho nestabilita projevující se při izolačních procesech.

Gen *wdpC* se na rozdíl od genu *wdpB* nachází v tzv. centrálním jádře chromozomu, které obsahuje hlavně geny zajišťující základní životní funkce buňky. Přípravou mutantního kmene  $\Delta wdpC$  bylo prokázáno, že gen *wdpC* není esenciální. Je exprimován konstitutivně během životního cyklu, ale hladina jeho proteinového produktu v buňkách se mění v závislosti na stádiu buněčného cyklu. Protein WdpC se začíná produkovat na samotném začátku diferenciaci vzdušného mycélia, maximální hladiny dosahuje na počátku sporulace a v pozdních fázích sporulace postupně vymizí. Je třeba si uvědomit, že stanovení konstitutivní exprese testovaných genů *wdpB* a *wdpC* bylo provedeno metodou RT-PCR, která neumožňuje kvantifikaci PCR produktů. Touto metodou tedy nelze určit, zdali je hladina transkriptu během životního cyklu skutečně konstantní či se v některých vývojových fázích liší a koresponduje s detekovanou měnící se hladinou proteinu WdpC během životního cyklu.

## 5.6 Vliv nadprodukce genu *wdpB*, resp. *wdpC* na diferenciaci *S. coelicolor*

### 5.6.1 Nadprodukce genu *wdpB* nemá vliv na diferenciaci

U kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpB* v porovnání s divokým kmenem nebyl zaznamenán žádný rozdíl ve fenotypovém projevu. Dokonce ani na úrovni genové exprese nedochází k indukci, resp. represi testovaných genů, vyjma samotného genu *wdpB*. Jako testované geny byly zvoleny ty geny, jejichž exprese byla u disruptčního mutantu  $\Delta wdpB$  významně změněna. Zdá se, že protein *wdpB* by mohl fungovat nejen jako autorepresor, ale také jako represor sousedního genu SCO5954. Gen SCO5954 by pak mohl fungovat jako represor řady dalších genů, jejichž exprese je závislá na WdpB – např. lokus *ram*, chapliny, rodliny a řada sekundárních metabolitů (viz kap. 5.2.1). Druhým možným vysvětlením může být rovněž přítomnost interakčního partnera v příliš nízké koncentraci. Ten se váže na WD-40 domény proteinu *wdpB* a v této podobě umožňuje vytvořenému proteinovému komplexu plnit přímou či nepřímou regulační funkci, která by mohla ovlivnit expresi výše zmíněných testovaných genů.

### 5.6.1 Kmen s vyšším počtem kopií genu *wdpC* vykazuje opačný fenotyp k mutantnímu kmeni $\Delta wdpC$

U kmene se zvýšeným počtem kopií genu *wdpC* bylo jak na agarové plotně, tak spektrofotometrickým stanovením zjištěno, že v porovnání s divokým kmenem dochází k nadprodukci aktinorodinu. Kromě samotného genu *wdpC* dochází navíc na úrovni genové exprese k indukci genů SCO2245 a *ramS* a k represi genů SCO2217, SCO4214, SCO4173–5. Na tomto místě je potřeba zmínit skutečnost, že mnohokopiový plazmid použitý v tomto experimentu obsahuje kromě celého genu *wdpC* také geny SCO2245, SCO2242, SCO2243. To znamená, že zvýšená exprese genu SCO2245 u kmene se zvýšeným počtem kopií genu *wdpC* (přesněji řečeno u kmene se zvýšeným počtem kopií genového lokusu SCO2242–5) není pravděpodobně výsledkem jeho indukce způsobené proteinem WdpC, ale výsledkem zvýšené genové dávky genu SCO2245 tohoto konstruktů.

Dá se říci, že změna genové exprese testovaných genů (kromě genů *cdaPS2* a *actI-ORF1*) u kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpC* vykazuje podle očekávání opačný



trend než u mutantu  $\Delta wdpC$ . Důvodem, proč byla nadprodukce Act stanovena pouze fenotypovými experimenty a nebyla detekována zvýšená exprese genu *actI-ORF1* z genového shluku *act* u kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpC*, může být pro tento účel nevhodně zvolená doba izolace RNA. Mycélium kmene se zvýšeným počtem kopií genu *wdpC* určené pro izolaci RNA bylo sklizeno v 64. hod kultivace, tedy ve stejnou dobu jako mycélium mutantu  $\Delta wdpC$  určené na globální analýzu transkriptomu, což umožnilo vzájemné porovnání experimentů. Ke zvýšené produkci Act u kmene s vyšším počtem kopií genu *wdpC* na chromozom však v porovnání s divokým kmenem dochází později, nepatrný rozdíl lze pozorovat až v 72. hod kultivace. Pro ověření předpokládané zvýšené hladiny genů genového shluku *act* je třeba provést expresní analýzu v pozdějších fázích růstu *S. coelicolor*.

Zdá se, že tento experiment částečně potvrzuje vliv disrupce genu *wdpC* na buněčnou fyziologii jak na fenotypové úrovni, tak na úrovni exprese mRNA.

Z dosud získaných výsledků se jeví, že produkty obou studovaných genů WdpB a WdpC mají pleiotropní účinek na produkci sekundárních metabolitů a zároveň hrají významnou roli v buněčné diferenciaci, a to jak při tvorbě vzdušného mycélia, tak při sporulaci.

## 6. ZÁVĚR

### 6.1 Úloha WdpB v diferenciaci *S. coelicolor*

- U mutanta  $\Delta wdpB$  dochází ke snížení produkce undecylprodigiosinu.
- Mutant  $\Delta wdpB$  vykazuje výraznou redukci tvorby vzdušného mycélia, abnormální větvení vzdušných vláken a defekt ve sporulaci (tj. předčasná lyze vláken a nepravidelná či opožděná tvorba přepážek).
- Testováním extracelulární komplementace bylo zjištěno, že u mutanta *wdpB* dochází k částečnému obnovení vzdušného mycélia při kultivaci v sousedství divokého typu.
- Protein WdpB aktivuje přímo či nepřímo expresi celé řady genů, z nichž některé kódují proteiny nezbytné pro formování a následnou diferenciaci vzdušného mycélia (genový shluk *ram*, *chaplíny*, *rodliny* a gen *nepA*), pro sporulaci (geny *whiH*, *whiI* a *rsfA*) a pro biosyntézu sekundárních metabolitů (CDA, coelichelin, karotenoidy, geosmin a metylisoborneol).
- Protein WdpB působí jako autorepresor a – ať už přímo či nepřímo – reprimuje expresi sousedního genu SCO5954 kódující potenciální chitinázu.
- Gen *wdpB* (SCO5953) je exprimován konstitutivně během životního cyklu *S. coelicolor* a je součástí operonu SCO5951–4.
- Zvýšený počet kopií genu *wdpB* nemá vliv na fenotyp *S. coelicolor* a ani na expresi vybraných genů, které byly významně ovlivněny u mutanta  $\Delta wdpB$ .
- Přítomnost proteinu WdpB se v buňkách *S. coelicolor* nepodařilo během životního cyklu detekovat.

### 6.2 Úloha WdpC v diferenciaci *S. coelicolor*

- Mutant  $\Delta wdpC$  se projevuje sníženou produkcí undecylprodigiosinu a opožděnou produkcí aktinorodinu.
- U mutanta  $\Delta wdpC$  dochází k slabé redukce tvorby vzdušného mycelia, k rozsáhlé předčasné lyzi vláken a k opožděné sporulaci projevující se tvorbou rovných vláken bez spirálovitého stáčení.

- Mutant  $\Delta wdpC$  vykazuje sníženou exprese sporulačního genů *whiE-ORFIII* a několika genových shluků pro syntézu sekundárních metabolitů (genový shluk *act*, *cda*, *cpk*).
- Protein WdpC působí jako autorepresor a – ať už přímo či nepřímo – reprimuje expresi sousedního genu SCO2245 a genů SCO2217, SCO4214 a operonu SCO4173–5.
- Gen *wdpC* (SCO2244) je exprimován konstitutivně během životního cyklu *S. coelicolor* a je součástí operonu SCO2244–7.
- Zvýšený počet kopií genu *wdpC* způsobuje nadprodukcí Act.
- Mutantní kmen s vyšším počtem kopií genu *wdpC* vykazuje opačný trend v relativní genové expresi vybraných genů než disruptivní mutant *wdpC*. Toto zjištění potvrzuje pozorovaný vliv disrupce genu *wdpC* na fyziologii buňky.
- Hladina proteinu WdpC se mění v závislosti na stádiu buněčného cyklu *S. coelicolor*. Protein WdpC se začíná produkovat na začátku tvorby vzdušného mycélia, nejvyšší hladiny dosahuje na počátku sporulace a v pozdních fázích sporulace postupně vymizí.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamidis,T., and Champness,W. (1992) Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *J Bacteriol* **174**: 4622-4628.
- Adamidis,T., Riggle,P., and Champness,W. (1990) Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J Bacteriol* **172**: 2962-2969.
- Adrain,C., Slee,E.A., Harte,M.T., and Martin,S.J. (1999) Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* **274**: 20855-20860.
- Ainsa,J.A., Bird,N., Ryding,N.J., Findlay,K.C., and Chater,K.F. (2010) The complex *whiJ* locus mediates environmentally sensitive repression of development of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**: 225-236.
- Ainsa,J.A., Parry,H.D., and Chater,K.F. (1999) A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **34**: 607-619.
- Ainsa,J.A., Ryding,N.J., Hartley,N., Findlay,K.C., Bruton,C.J., and Chater,K.F. (2000) WhiA, a protein of unknown function conserved among gram-positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **182**: 5470-5478.
- Akanuma,G., Ueki,M., Ishizuka,M., Ohnishi,Y., and Horinouchi,S. (2011) Control of aerial mycelium formation by the BldK oligopeptide ABC transporter in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol Lett* **315**: 54-62.
- Allan,E.J., and Prosser,J.I. (1985) A Kinetic-Study of the Colony Growth of *Streptomyces-Coelicolor* A3(2) and J802 on Solid Medium. *Journal of General Microbiology* **131**: 2521-2532.
- Altena,K., Guder,A., Cramer,C., and Bierbaum,G. (2000) Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2565-2571.
- Arias,P., Fernandez-Moreno,M.A., and Malpartida,F. (1999) Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J Bacteriol* **181**: 6958-6968.
- Asakawa,H., Kitamura,K., and Shimoda,C. (2001) A novel Cdc20-related WD-repeat protein, Fzr1, is required for spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* **265**: 424-435.
- Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.O., Seidmann,J. S., Smith,J.A., and Struhl,K. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Balasubramanian,B., Lowry,C.V., and Zitomer,R.S. (1993) The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol Cell Biol* **13**: 6071-6078.
- Bao,K., and Cohen,S.N. (2001) Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev* **15**: 1518-1527.
- Bassi,M.T., Ramesar,R.S., Caciotti,B., Winship,I.M., De,G.A., Riboni,M. *et al.* (1999) X-linked late-onset sensorineural deafness caused by a deletion involving *OAI* and a novel gene containing WD-40 repeats. *Am J Hum Genet* **64**: 1604-1616.
- Bentley,S.D., Chater,K.F., Cerdeno-Tarraga,A.M., Challis,G.L., Thomson,N.R., James,K.D. *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Berlyn,M.K. (1998) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 814-984.
- Bibb,M. (1996) 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142** ( Pt 6): 1335-1344.
- Bibb,M.J., and Buttner,M.J. (2003) The *Streptomyces coelicolor* developmental transcription factor sigma BldN is synthesized as a proprotein. *J Bacteriol* **185**: 2338-2345.
- Bibb,M.J., Freeman,R.F., and Hopwood,D.A. (1977) Physical and Genetic Characterization of A 2Nd Sex Factor, Scp2, for *Streptomyces-Coelicolor* A3(2). *Molecular & General Genetics* **154**: 155-166.

- Bibb,M.J., Molle,V., and Buttner,M.J. (2000) sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **182**: 4606-4616.
- Bibb,M.J., Ward,J.M., Kieser,T., Cohen,S.N., and Hopwood,D.A. (1981) Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet* **184**: 230-240.
- Bignell,D.R., Lau,L.H., Colvin,K.R., and Leskiw,B.K. (2003) The putative anti-anti-sigma factor BldG is post-translationally modified by phosphorylation in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett* **225**: 93-99.
- Bignell,D.R., Warawa,J.L., Strap,J.L., Chater,K.F., and Leskiw,B.K. (2000) Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation. *Microbiology* **146 ( Pt 9)**: 2161-2173.
- Birch,A., Hausler,A., Vogtli,M., Krek,W., and Hutter,R. (1989) Extremely large chromosomal deletions are intimately involved in genetic instability and genomic rearrangements in *Streptomyces glaucescens*. *Mol Gen Genet* **217**: 447-458.
- Birko,Z., Bialek,S., Buzas,K., Szajli,E., Traag,B.A., Medzihradzky,K.F. *et al.* (2007) The secreted signaling protein factor C triggers the A-factor response regulon in *Streptomyces griseus*: overlapping signaling routes. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1248-1256.
- Birko,Z., Sumegi,A., Vinnai,A., van,W.G., Szeszak,F., Vitalis,S. *et al.* (1999) Characterization of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in morphological differentiation of *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145 ( Pt 9)**: 2245-2253.
- Biro,S., Bekesi,I., Vitalis,S., and Szabo,G. (1980) A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Purification and properties. *Eur J Biochem* **103**: 359-363.
- Biro,S., Birko,Z., and van Wezel,G.P. (2000) Transcriptional and functional analysis of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in cytodifferentiation of *Streptomyces griseus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**: 277-285.
- Bjorn,S.P., Soltyk,A., Beggs,J.D., and Friesen,J.D. (1989) PRP4 (RNA4) from *Saccharomyces cerevisiae*: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* **9**: 3698-3709.
- Brasch,M.A., and Cohen,S.N. (1993) Excisive recombination of the SLP1 element in *Streptomyces lividans* is mediated by Int and enhanced by Xis. *J Bacteriol* **175**: 3075-3082.
- Brian,P., Riggle,P.J., Santos,R.A., and Champness,W.C. (1996) Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J Bacteriol* **178**: 3221-3231.
- Capstick,D.S., Willey,J.M., Buttner,M.J., and Elliot,M.A. (2007) SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **64**: 602-613.
- Castets,F., Bartoli,M., Barnier,J.V., Baillat,G., Salin,P., Moqrich,A. *et al.* (1996) A novel calmodulin-binding protein, belonging to the WD-repeat family, is localized in dendrites of a subset of CNS neurons. *J Cell Biol* **134**: 1051-1062.
- Castets,F., Rakitina,T., Gaillard,S., Moqrich,A., Mattei,M.G., and Monneron,A. (2000) Zinedin, SG2NA, and striatin are calmodulin-binding, WD repeat proteins principally expressed in the brain. *J Biol Chem* **275**: 19970-19977.
- Chakraborty,R., and Bibb,M. (1997) The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol* **179**: 5854-5861.
- Challis,G.L., and Hopwood,D.A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 2**: 14555-14561.
- Champness,W.C. (1988) New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J Bacteriol* **170**: 1168-1174.
- Chang,S.A., Bralley,P., and Jones,G.H. (2005) The *absB* gene encodes a double strand-specific endoribonuclease that cleaves the read-through transcript of the rpsO-pnp operon in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* **280**: 33213-33219.
- Chater,K.F. (1972) A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* **72**: 9-28.

- Chater,K.F. (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* **47**: 685-713.
- Chater,K.F. (1998) Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* **144**: 1465-1478.
- Chater,K.F. (2001) Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol* **4**: 667-673.
- Chater,K.F. (2006) Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 761-768.
- Chater,K.F., Biro,S., Lee,K.J., Palmer,T., and Schrempf,H. (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 171-198.
- Chater,K.F., Bruton,C.J., Plaskitt,K.A., Buttner,M.J., Mendez,C., and Helmann,J.D. (1989) The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility sigma factor of *B. subtilis*. *Cell* **59**: 133-143.
- Chater,K.F., and Hopwood,D.A. (1993) *Streptomyces*. *Bacillus Subtilis* and Other Gram- Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Abraham L Sonenshein, James A Hoch a Richard Losick (ed.). *American Society for Microbiology*, Washington: 83-100.
- Chater,K.F., and Chandra,G. (2006) The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 651-672.
- Chothia,C., Hubbard,T., Brenner,S., Barns,H., and Murzin,A. (1997) Protein folds in the all-beta and all-alpha classes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 597-627.
- Chung,C.Y., Reddy,T.B., Zhou,K., and Firtel,R.A. (1998) A novel, putative MEK kinase controls developmental timing and spatial patterning in *Dictyostelium* and is regulated by ubiquitin-mediated protein degradation. *Genes Dev* **12**: 3564-3578.
- Claessen,D., de,J.W., Dijkhuizen,L., and Wosten,H.A. (2006) Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* **14**: 313-319.
- Claessen,D., Rink,R., de,J.W., Siebring,J., de,V.P., Boersma,F.G. *et al.* (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev* **17**: 1714-1726.
- Claessen,D., Stokroos,I., Deelstra,H.J., Penninga,N.A., Bormann,C., Salas,J.A. *et al.* (2004) The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol Microbiol* **53**: 433-443.
- Claessen,D., Wosten,H.A., van,K.G., Faber,O.G., Alves,A.M., Meijer,W.G., and Dijkhuizen,L. (2002) Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. *Mol Microbiol* **44**: 1483-1492.
- Clancy,C.E., Mendoza,M.G., Naismith,T.V., Kolman,M.F., Egelhoff,T.T. (1997) Identification of a protein kinase from *Dictyostelium* with homology to the novel catalytic domain of myosin heavy chain kinase A. *J Biol Chem* **272**: 11812-5.
- Conrad,C., and Rauhut,R. (2002) Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 116-129.
- Corre,C., Song,L., O'Rourke,S., Chater,K.F., and Challis,G.L. (2008) 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 17510-17515.
- Dalton,K.A., Thibessard,A., Hunter,J.I., and Kelemen,G.H. (2007) A novel compartment, the 'subapical stem' of the aerial hyphae, is the location of a *sigN*-dependent, developmentally distinct transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **64**: 719-737.
- Davie,J.K., Edmondson,D.G., Coco,C.B., and Dent,S.Y. (2003) Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J Biol Chem* **278**: 50158-50162.
- de Jong,W., Manteca,A., Sanchez,J., Bucca,G., Smith,C.P., Dijkhuizen,L. *et al.* (2009) NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **71**: 1591-1603.

- de Jong, W., Wosten, H.A., Dijkhuizen, L., and Claessen, D. (2009b) Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* **73**: 1128-1140.
- Del Sol, R., Pitman, A., Herron, P., and Dyson, P. (2003) The product of a developmental gene, *crgA*, that coordinates reproductive growth in *Streptomyces* belongs to a novel family of small actinomycete-specific proteins. *J Bacteriol* **185**: 6678-6685.
- den Hengst, C.D., and Buttner, M.J. (2008) Redox control in actinobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1201-1216.
- Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A., and Quail, P.H. (1992) *COP1*, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell* **71**: 791-801.
- Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J. *et al.* (2004) Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **186**: 1893-1897.
- Di Berardo, C., Capstick, D.S., Bibb, M.J., Findlay, K.C., Buttner, M.J., and Elliot, M.A. (2008) Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **190**: 5879-5889.
- Drider, D., and Condon, C. (2004) The continuing story of endoribonuclease III. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**: 195-200.
- Dubrovskaya, V., Lavigne, A.C., Davidson, I., Acker, J., Staub, A., and Tora, L. (1996) Distinct domains of hTAFIII100 are required for functional interaction with transcription factor TFIIF beta (RAP30) and incorporation into the TFIID complex. *EMBO J* **15**: 3702-3712.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M., and Roth, S.Y. (1996) Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* **10**: 1247-1259.
- Elepfandt, A., Eistetter, I., Fleig, A., Gunther, E., Hainich, M., Hepperle, S., and Traub, B. (2000) Hearing threshold and frequency discrimination in the purely aquatic frog *Xenopus laevis* (Pipidae): measurement by means of conditioning. *J Exp Biol* **203**: 3621-3629.
- Elliot, M., Damji, F., Passantino, R., Chater, K., and Leskiw, B. (1998) The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *J Bacteriol* **180**: 1549-1555.
- Elliot, M.A., Bibb, M.J., Buttner, M.J., and Leskiw, B.K. (2001) BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **40**: 257-269.
- Elliot, M.A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M.J., Cohen, S.N., Kao, C.M., and Buttner, M.J. (2003) The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* **17**: 1727-1740.
- Elliot, M.A., and Leskiw, B.K. (1999) The BldD protein from *Streptomyces coelicolor* is a DNA-binding protein. *J Bacteriol* **181**: 6832-6835.
- Elliot, M.A., and Talbot, N.J. (2004) Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Curr Opin Microbiol* **7**: 594-601.
- Ensign, J.C. (1978) Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu Rev Microbiol* **32**: 185-219.
- Fernandez-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A., and Malpartida, F. (1991) The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* **66**: 769-780.
- Fernandez-Moreno, M.A., Martin-Triana, A.J., Martinez, E., Niemi, J., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Malpartida, F. (1992) *abaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **174**: 2958-2967.
- Flärth, K., and Buttner, M.J. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**: 36-49.
- Flärth, K., Findlay, K.C., and Chater, K.F. (1999) Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145** ( Pt 9): 2229-2243.

- Flärdh,K., Leibovitz,E., Buttner,M.J., and Chater,K.F. (2000) Generation of a non-sporulating strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the manipulation of a developmentally controlled *ftsZ* promoter. *Mol Microbiol* **38**: 737-749.
- Fong,H.K., Hurley,J.B., Hopkins,R.S., Miake-Lye,R., Johnson,M.S., Doolittle,R.F., and Simon,M.I. (1986) Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2162-2166.
- Futey,L.M., Medley,Q.G., Cote,G.P., and Egelhoff,T.T. (1995) Structural analysis of myosin heavy chain kinase A from *Dictyostelium*. Evidence for a highly divergent protein kinase domain, an amino-terminal coiled-coil domain, and a domain homologous to the beta-subunit of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **270**: 523-529.
- Garcia,M. (1995) A membrane-like structure envelopes substrate mycelium during colony development in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **131**: 107-111.
- Garcia-Higuera,I., Fenoglio,J., Li,Y., Lewis,C., Panchenko,M.P., Reiner,O. *et al.* (1996) Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* **35**: 13985-13994.
- Garcia-Higuera,I., Gaitatzes,C., Smith,T.F., and Neer,E.J. (1998) Folding a WD repeat propeller. Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein beta subunit and Sec13. *J Biol Chem* **273**: 9041-9049.
- Gehring,A.M., Yoo,N.J., and Losick,R. (2001) RNA polymerase sigma factor that blocks morphological differentiation by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **183**: 5991-5996.
- Gerich,B., Orci,L., Tschochner,H., Lottspeich,F., Ravazzola,M., Amherdt,M. *et al.* (1995) Non-clathrin-coat protein alpha is a conserved subunit of coatamer and in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3229-3233.
- GLAUERT,A.M., and Hopwood,D.A. (1961) The fine structure of *Streptomyces violaceoruber* (*S. coelicolor*). III. The walls of the mycelium and spores. *J Biophys Biochem Cytol* **10**: 505-516.
- Gordon,N.D., Ottaviano,G.L., Connell,S.E., Tobkin,G.V., Son,C.H., Shterental,S., and Gehring,A.M. (2008) Secreted protein response to sigmaU activity in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **190**: 894-904.
- Gottelt,M., Kol,S., Gomez-Escribano,J.P., Bibb,M., and Takano,E. (2010) Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **156**: 2343-2353.
- Granozzi,C., Billetta,R., Passantino,R., Sollazzo,M., and Puglia,A.M. (1990) A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **136**: 713-716.
- Gravenbeek,M.L., and Jones,G.H. (2008) The endonuclease activity of RNase III is required for the regulation of antibiotic production by *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **154**: 3547-3555.
- Green,S.R., and Johnson,A.D. (2005) Genome-wide analysis of the functions of a conserved surface on the corepressor Tup1. *Mol Biol Cell* **16**: 2605-2613.
- Guijarro,J., Santamaria,R., Schauer,A., and Losick,R. (1988) Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. *J Bacteriol* **170**: 1895-1901.
- Guo,M., Feng,H., Zhang,J., Wang,W., Wang,Y., Li,Y. *et al.* (2009) Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system. *Genome Res* **19**: 1301-1308.
- Handschug,K., Sperling,S., Yoon,S.J., Hennig,S., Clark,A.J., and Huebner,A. (2001) Triple A syndrome is caused by mutations in AAAS, a new WD-repeat protein gene. *Hum Mol Genet* **10**: 283-290.
- Harboe,N., and Ingild,A. (1973) Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. *Scand J Immunol Suppl* **1**: 161-164.
- Hausler,A., Birch,A., Krek,W., Piret,J., and Hutter,R. (1989) Heterogeneous genomic amplification in *Streptomyces glaucescens*: structure, location and junction sequence analysis. *Mol Gen Genet* **217**: 437-446.
- Hecker,M., Pane-Farre,J., and Volker,U. (2007) SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**: 215-236.



- Henning,K.A., Li,L., Iyer,N., McDaniel,L.D., Reagan,M.S., Legerski,R. *et al.* (1995) The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* **82**: 555-564.
- Hesketh,A., and Ochi,K. (1997) A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *J Antibiot (Tokyo)* **50**: 532-535.
- Hesketh,A., Sun,J., and Bibb,M. (2001) Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits *actII-ORF4* transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol Microbiol* **39**: 136-144.
- Hicks,J., Lockington,R.A., Strauss,J., Dieringer,D., Kubicek,C.P., Kelly,J., and Keller,N. (2001) RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol Microbiol* **39**: 1482-1493.
- Hisbergues,M., Gaitatzes,C.G., Joset,F., Bedu,S., and Smith,T.F. (2001) A noncanonical WD-repeat protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803: structural and functional study. *Protein Sci* **10**: 293-300.
- Hobbs,G., Frazer,C.M., Gardner,D.C.J., Cullum,J.A., Oliver,S.G. (1989) Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**: 272-277.
- Holt,T.G., Chang,C., Laurent-Winter,C., Murakami,T., Garrels,J.I., Davies,J.E., and Thompson,C.J. (1992) Global changes in gene expression related to antibiotic synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Mol Microbiol* **6**: 969-980.
- Hopwood,D.A., Chater,K.F., and Bibb,M.J. (1995) Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete. *Biotechnology* **28**: 65-102.
- Horinouchi,S. (2003) AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**: 462-467.
- Horinouchi,S., and Beppu,T. (1994) A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol* **12**: 859-864.
- Horinouchi,S., Ohnishi,Y., and Kang,D.K. (2001) The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**: 177-182.
- Horinouchi,S., Suzuki,H., Nishiyama,M., and Beppu,T. (1989) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. *J Bacteriol* **171**: 1206-1210.
- Hsiao,N.H., Nakayama,S., Merlo,M.E., de,V.M., Bunet,R., Kitani,S. *et al.* (2009) Analysis of two additional signaling molecules in *Streptomyces coelicolor* and the development of a butyrolactone-specific reporter system. *Chem Biol* **16**: 951-960.
- Hsiao,N.H., Soding,J., Linke,D., Lange,C., Hertweck,C., Wohlleben,W., and Takano,E. (2007) ScbA from *Streptomyces coelicolor* A3(2) has homology to fatty acid synthases and is able to synthesize gamma-butyrolactones. *Microbiology* **153**: 1394-1404.
- Huang,J., Shi,J., Molle,V., Sohlberg,B., Weaver,D., Bibb,M.J. *et al.* (2005) Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **58**: 1276-1287.
- Huang,M., Zhou,Z., and Elledge,S.J. (1998) The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* **94**: 595-605.
- Hudson,M.E., and Nodwell,J.R. (2004) Dimerization of the RamC morphogenetic protein of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **186**: 1330-1336.
- Hudson,M.E., Zhang,D., and Nodwell,J.R. (2002) Membrane association and kinase-like motifs of the RamC protein of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **184**: 4920-4924.
- Hunt,A.C., Servin-Gonzalez,L., Kelemen,G.H., and Buttner,M.J. (2005) The *bldC* developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family. *J Bacteriol* **187**: 716-728.

- Hutchings, M.I., Hoskisson, P.A., Chandra, G., and Buttner, M.J. (2004) Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **150**: 2795-2806.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T. *et al.* (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**: 526-531.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Beppu, T. (1992) A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* **174**: 7585-7594.
- Jakimowicz, P., Cheesman, M.R., Bishai, W.R., Chater, K.F., Thomson, A.J., and Buttner, M.J. (2005) Evidence that the *Streptomyces* developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a [4Fe-4S] cluster. *J Biol Chem* **280**: 8309-8315.
- Janda, L., Tichy, P., Spizek, J., and Petricek, M. (1996) A deduced *Thermomonospora curvata* protein containing serine/threonine protein kinase and WD-repeat domains. *J Bacteriol* **178**: 1487-1489.
- Jiang, H., and Kendrick, K.E. (2000) Characterization of *ssfR* and *ssgA*, two genes involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **182**: 5521-5529.
- Jiang, J., He, X., and Cane, D.E. (2007) Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nat Chem Biol* **3**: 711-715.
- Johnson, A.D., and Herskowitz, I. (1985) A repressor (MAT alpha 2 Product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. *Cell* **42**: 237-247.
- Joshi, B., Janda, L., Stoytcheva, Z., and Tichy, P. (2000) PkwA, a WD-repeat protein, is expressed in spore-derived mycelium of *Thermomonospora curvata* and phosphorylation of its WD domain could act as a molecular switch. *Microbiology* **146 Pt 12**: 3259-3267.
- Jung, M., Muehe, J.M., Lukowsky, A., Jung, K., and Loening, S.A. (2001) Dimethyl sulfoxide as additive in ready-to-use reaction mixtures for real-time polymerase chain reaction analysis with SYBR Green I dye. *Anal Biochem* **289**: 292-295.
- Kang, S.G., Jin, W., Bibb, M., and Lee, K.J. (1998) Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and *relA* mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* **168**: 221-226.
- Kaprálek, F. (1999) Mikrobiologické praktikum. Univerzita Karlova v Praze – nakladatelství Karolínium.
- Kato, J.Y., Funa, N., Watanabe, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2007) Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2378-2383.
- Kato, J.Y., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2005) Autorepression of AdpA of the AraC/XylS family, a key transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J Mol Biol* **350**: 12-26.
- Kawamoto, S., Watanabe, M., Saito, N., Hesketh, A., Vachalova, K., Matsubara, K., and Ochi, K. (2001) Molecular and functional analyses of the gene (*eshA*) encoding the 52-kilodalton protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) required for antibiotic production. *J Bacteriol* **183**: 6009-6016.
- Keijsers, B.J., Noens, E.E., Kraal, B., Koerten, H.K., and van Wezel, G.P. (2003) The *Streptomyces coelicolor* *ssgB* gene is required for early stages of sporulation. *FEMS Microbiol Lett* **225**: 59-67.
- Keijsers, B.J., van Wezel, G.P., Canters, G.W., and Vijgenboom, E. (2002) Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* *ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon. *J Bacteriol* **184**: 4420-4429.
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M., and Johnson, A.D. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* **68**: 709-719.
- Kelemen, G.H., Brian, P., Flärdh, K., Chamberlin, L., Chater, K.F., and Buttner, M.J. (1998) Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **180**: 2515-2521.

- Kelemen,G.H., Brown,G.L., Kormanec,J., Potuckova,L., Chater,K.F., and Buttner,M.J. (1996) The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **21**: 593-603.
- Kelemen,G.H., and Buttner,M.J. (1998) Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 656-662.
- Kelemen,G.H., Viollier,P.H., Tenor,J., Marri,L., Buttner,M.J., and Thompson,C.J. (2001) A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **40**: 804-814.
- Khokhlov,A.S., Tovarova,I.I., Borisova,L.N., Pliner,S.A., Shevchenko,L.N., Kornitskaia,E.I. *et al.* (1967) [The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **177**: 232-235.
- Kieser,T., Bibb,M.J., Buttner,M.J., Chater,K.F., Hopwood,D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich
- Kim,D.W., Chater,K., Lee,K.J., and Hesketh,A. (2005a) Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **187**: 2957-2966.
- Kim,E.S., Song,J.Y., Kim,D.W., Chater,K.F., and Lee,K.J. (2008) A possible extended family of regulators of sigma factor activity in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **190**: 7559-7566.
- Kim,I.K., Lee,C.J., Kim,M.K., Kim,J.M., Kim,J.H., Yim,H.S. *et al.* (2006) Crystal structure of the DNA-binding domain of BldD, a central regulator of aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **60**: 1179-1193.
- Kim,I.S., and Lee,K.J. (1995) Kinetic study on the production and degradation of leupeptin in *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *J Biotechnol* **42**: 35-44.
- Kim,S.J., Swanson,M.J., Qiu,H., Govind,C.K., and Hinnebusch,A.G. (2005b) Activator Gcn4p and Cyc8p/Tup1p are interdependent for promoter occupancy at ARG1 in vivo. *Mol Cell Biol* **25**: 11171-11183.
- Kinashi,H., and Shimaji-Murayama,M. (1991) Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **173**: 1523-1529.
- Kirby,R. (2005) *Actinomycetes and Lignin Degradation*. *Adv Appl Microbiol* **58C**: 125-168.
- Kirby,R., and Hopwood,D.A. (1977) Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **98**: 239-252.
- Kiss,Z., Ward,A.C., Birko,Z., Chater,K.F., and Biro,S. (2008) *Streptomyces griseus* 45H, a producer of the extracellular autoregulator protein factor C, is a member of the species *Streptomyces albidoflavus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1029-1031.
- Kodani,S., Hudson,M.E., Durrant,M.C., Buttner,M.J., Nodwell,J.R., and Willey,J.M. (2004) The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11448-11453.
- Kodani,S., Lodato,M.A., Durrant,M.C., Picart,F., and Willey,J.M. (2005) SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the *streptomycetes*. *Mol Microbiol* **58**: 1368-1380.
- Komachi,K., Redd,M.J., and Johnson,A.D. (1994) The WD repeats of Tup1 interact with the homeo domain protein alpha 2. *Genes Dev* **8**: 2857-2867.
- Kretschmer,S. (1982) Dependence of the mycelial growth pattern on the individually regulated cell cycle in *Streptomyces granaticolor*. *Z Allg Mikrobiol* **22**: 335-347.
- Kwak,J., McCue,L.A., Trczianka,K., and Kendrick,K.E. (2001) Identification and characterization of a developmentally regulated protein, EshA, required for sporogenic hyphal branches in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **183**: 3004-3015.
- Lafon,A., Seo,J.A., Han,K.H., Yu,J.H., and d'Enfert,C. (2005) The heterotrimeric G-protein GanB(alpha)-SfaD(beta)-GpgA(gamma) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**: 71-80.

- Lambright,D.G., Sondek,J., Bohm,A., Skiba,N.P., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**: 311-319.
- Leblond,P., Demuyter,P., Simonet,J.M., and Decaris,B. (1991) Genetic Instability and Associated Genome Plasticity in *Streptomyces-Ambofaciens* - Pulsed-Field Gel-Electrophoresis Evidence for Large Dna Alterations in A Limited Genomic Region. *Journal of Bacteriology* **173**: 4229-4233.
- Lee,C.J., Won,H.S., Kim,J.M., Lee,B.J., and Kang,S.O. (2007) Molecular domain organization of BldD, an essential transcriptional regulator for developmental process of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Proteins* **68**: 344-352.
- Lee,P.C., Umeyama,T., and Horinouchi,S. (2002) *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **43**: 1413-1430.
- Leskiw,B.K., Lawlor,E.J., Fernandez-Abalos,J.M., and Chater,K.F. (1991) TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces mutants*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2461-2465.
- Leskiw,B.K., Mah,R., Lawlor,E.J., and Chater,K.F. (1993) Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **175**: 1995-2005.
- Li,D., and Roberts,R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 2085-2097.
- Li,Q., and Suprenant,K.A. (1994) Molecular characterization of the 77-kDa echinoderm microtubule-associated protein. Homology to the beta-transducin family. *J Biol Chem* **269**: 31777-31784.
- Li,W., Wu,J., Tao,W., Zhao,C., Wang,Y., He,X. *et al.* (2007) A genetic and bioinformatic analysis of *Streptomyces coelicolor* genes containing TTA codons, possible targets for regulation by a developmentally significant tRNA. *FEMS Microbiol Lett* **266**: 20-28.
- Lo,N.C., Chong,C.S., Smith,A.C., Dobyns,W.B., Carrozzo,R., and Ledbetter,D.H. (1997) Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* **6**: 157-164.
- Ma,H., and Kendall,K. (1994) Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **176**: 3800-3811.
- Malave,T.M., and Dent,S.Y. (2006) Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem Cell Biol* **84**: 437-443.
- Manteca,A., Mader,U., Connolly,B.A., and Sanchez,J. (2006) A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. *Proteomics* **6**: 6008-6022.
- Martinez-Costa,O.H., Arias,P., Romero,N.M., Parro,V., Mellado,R.P., and Malpartida,F. (1996) A *relA/spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes. *J Biol Chem* **271**: 10627-10634.
- Matsumoto,A., Hong,S.K., Ishizuka,H., Horinouchi,S., and Beppu,T. (1994) Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**: 47-56.
- Matsumoto,A., Ishizuka,H., Beppu,T., and Horinouchi,S. (1995) Involvement of a Small ORF Downstream of the *afsR* Gene in the Regulation of Secondary Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Actinomycetologica* **9**: No. 1 pp.37-43.
- McCann,P.A., and Pogell,B.M. (1979) Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *J Antibiot (Tokyo)* **32**: 673-678.
- McCarthy,A.J., and Williams,S.T. (1992) *Actinomycetes* as agents of biodegradation in the environment--a review. *Gene* **115**: 189-192.
- McCormick,J.R., and Losick,R. (1996) Cell division gene *ftsQ* is required for efficient sporulation but not growth and viability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **178**: 5295-5301.
- McCormick,J.R., Su,E.P., Driks,A., and Losick,R. (1994) Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol Microbiol* **14**: 243-254.

- McKenzie, N.L., and Nodwell, J.R. (2007) Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol* **189**: 5284-5292.
- Mennella, T.A., Klinkenberg, L.G., and Zitomer, R.S. (2003) Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot Cell* **2**: 1288-1303.
- Mikulik, K., Paleckova, P., Felsberg, J., Bobek, J., Zidkova, J., and Halada, P. (2008) *SsrA* genes of streptomycetes and association of proteins to the tmRNA during development and cellular differentiation. *Proteomics* **8**: 1429-1441.
- Molle, V., and Buttner, M.J. (2000) Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Mol Microbiol* **36**: 1265-1278.
- Molle, V., Palframan, W.J., Findlay, K.C., and Buttner, M.J. (2000) WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **182**: 1286-1295.
- Muth, G., Nusbaumer, B., Wohlleben, W. and Puhler, A. (1989) A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *Mol Gen Genet* **219**: 341-348.
- Narva, K.E., and Feitelson, J.S. (1990) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **172**: 326-333.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., and Smith, T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**: 297-300.
- Neer, E.J., and Smith, T.F. (1996) G protein heterodimers: new structures propel new questions. *Cell* **84**: 175-178.
- Nehlin, J.O., Carlberg, M., and Ronne, H. (1991) Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J* **10**: 3373-3377.
- Nguyen, K.T., Tenor, J., Stettler, H., Nguyen, L.T., Nguyen, L.D., and Thompson, C.J. (2003) Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene. *J Bacteriol* **185**: 7291-7296.
- Nguyen, K.T., Willey, J.M., Nguyen, L.D., Nguyen, L.T., Viollier, P.H., and Thompson, C.J. (2002) A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **46**: 1223-1238.
- Nodwell, J.R., and Losick, R. (1998) Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **180**: 1334-1337.
- Nodwell, J.R., McGovern, K., and Losick, R. (1996) An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **22**: 881-893.
- Nodwell, J.R., Yang, M., Kuo, D., and Losick, R. (1999) Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **151**: 569-584.
- Noens, E.E., Mersinias, V., Traag, B.A., Smith, C.P., Koerten, H.K., and van Wezel, G.P. (2005) SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **58**: 929-944.
- O'Connor, T.J., Kanellis, P., and Nodwell, J.R. (2002) The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Mol Microbiol* **45**: 45-57.
- O'Connor, T.J., and Nodwell, J.R. (2005) Pivotal roles for the receiver domain in the mechanism of action of the response regulator RamR of *Streptomyces coelicolor*. *J Mol Biol* **351**: 1030-1047.
- Ochi, K. (1986) A decrease in GTP content is associated with aerial mycelium formation in *Streptomyces* MA406-A-1. *J Gen Microbiol* **132**: 299-305.
- Ochi, K. (1987) Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *J Bacteriol* **169**: 3608-3616.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H. *et al.* (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* **190**: 4050-4060.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H., and Horinouchi, S. (1999) The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol* **34**: 102-111.

- Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J.Y., Tomono, A., and Horinouchi, S. (2005) AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 431-439.
- Okamoto, S., Itoh, M., and Ochi, K. (1997) Molecular cloning and characterization of the obg gene of *Streptomyces griseus* in relation to the onset of morphological differentiation. *J Bacteriol* **179**: 170-179.
- Omer, C.A., and Cohen, S.N. (1984) Plasmid formation in *Streptomyces*: excision and integration of the SLP1 replicon at a specific chromosomal site. *Mol Gen Genet* **196**: 429-438.
- Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T., and Horinouchi, S. (1995) Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **177**: 6083-6092.
- Onaka, H., Nakagawa, T., and Horinouchi, S. (1998) Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. *Mol Microbiol* **28**: 743-753.
- Papamichos-Chronakis, M., Petrakis, T., Ktistaki, E., Topalidou, I., and Tzamaras, D. (2002) Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at *GALI*. *Mol Cell* **9**: 1297-1305.
- Parashar, A., Colvin, K.R., Bignell, D.R., and Leski, B.K. (2009) BldG and SCO3548 interact antagonistically to control key developmental processes in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **191**: 2541-2550.
- Pawlik, K., Kotowska, M., Chater, K.F., Kuczek, K., and Takano, E. (2007) A cryptic type I polyketide synthase (*cpk*) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol* **187**: 87-99.
- Pawlik, K., Kotowska, M., and Kolesinski, P. (2010) *Streptomyces coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk. *J Mol Microbiol Biotechnol* **19**: 147-151.
- Petricek, M., Petrickova, K., Havlicek, L., and Felsberg, J. (2006) Occurrence of two 5-aminolevulinat biosynthetic pathways in *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* is linked with the production of asukamycin. *J Bacteriol* **188**: 5113-5123.
- Petrickova, K., Hasek, J., Benada, O., and Petricek, M. (2006) The WD-40 repeat protein PkwA of *Thermomonospora curvata* is associated with rapid growth and is localized in the tips of growing hyphae. *FEMS Microbiol Lett* **258**: 187-193.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* **14**: 655-665.
- Pogell, B.M. (1998) The pamamycins: developmental autoregulators and antibiotics from *Streptomyces alboniger*. A review and update. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* **44**: 461-463.
- Pope, M.K., Green, B., and Westpheling, J. (1998) The *bldB* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **180**: 1556-1562.
- Pope, M.K., Green, B.D., and Westpheling, J. (1996) The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol Microbiol* **19**: 747-756.
- Potuckova, L., Kelemen, G.H., Findlay, K.C., Lonetto, M.A., Buttner, M.J., and Kormanec, J. (1995) A new RNA polymerase sigma factor, sigma F, is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp. *Mol Microbiol* **17**: 37-48.
- Price, B., Adamidis, T., Kong, R., and Champness, W. (1999) A *Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory gene, *absB*, encodes an RNase III homolog. *J Bacteriol* **181**: 6142-6151.
- Proft, M., and Struhl, K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307-1317.
- Puglia, A.M., Vohradsky, J., and Thompson, C.J. (1995) Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **17**: 737-746.
- Rajkarnikar, A., Kwon, H.J., Ryu, Y.W., and Suh, J.W. (2006) Catalytic domain of AfsKav modulates both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces avermitilis* ATCC 31272. *Curr Microbiol* **53**: 204-208.

- Recio,E., Colinas,A., Rumbero,A., Aparicio,J.F., and Martin,J.F. (2004) PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarinin production in *Streptomyces natalensis*. *J Biol Chem* **279**: 41586-41593.
- Richter,M., Willey,J.M., Süßmuth,R., Jung,G., and Fiedler,H.P. (1998) Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae*. *FEMS Microbiol* **163**: 165-171..
- Rosen,S., Yu,J.H., and Adams,T.H. (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J* **18**: 5592-5600.
- Ryding,N.J., Anderson,T.B., and Champness,W.C. (2002) Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol* **184**: 794-805.
- Ryding,N.J., Bibb,M.J., Molle,V., Findlay,K.C., Chater,K.F., and Buttner,M.J. (1999) New sporulation loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **181**: 5419-5425.
- Ryding,N.J., Kelemen,G.H., Whatling,C.A., Flärdh,K., Buttner,M.J., and Chater,K.F. (1998) A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **29**: 343-357.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor NY.
- San Paolo,S., Huang,J., Cohen,S.N., and Thompson,C.J. (2006) rag genes: novel components of the RamR regulon that trigger morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **61**: 1167-1186.
- Sawai,R., Suzuki,A., Takano,Y., Lee,P.C., and Horinouchi,S. (2004) Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **334**: 53-61.
- Swedock,J., McCormick,J.R., Angert,E.R., Nodwell,J.R., and Losick,R. (1997) Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **25**: 847-858.
- Seo,J.A., Han,K.H., and Yu,J.H. (2005) Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**: 81-89.
- Sevcikova,B., Rezuchova,B., Homerova,D., and Kormanec,J. (2010) The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor sigma(H) in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **192**: 5674-5681.
- Sheeler,N.L., MacMillan,S.V., and Nodwell,J.R. (2005) Biochemical activities of the *absA* two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **187**: 687-696.
- Shu,D., Chen,L., Wang,W., Yu,Z., Ren,C., Zhang,W. *et al.* (2009) *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 1149-1160.
- Singh,A., Crossman,D.K., Mai,D., Guidry,L., Voskuil,M.I., Renfrow,M.B., and Steyn,A.J. (2009) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog* **5**: e1000545.
- Smith,R.L., and Johnson,A.D. (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **25**: 325-330.
- Smith,T.F., Gaitatzes,C., Saxena,K., and Neer,E.J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* **24**: 181-185.
- Soliveri,J., Brown,K.L., Buttner,M.J., and Chater,K.F. (1992) Two promoters for the *whiB* sporulation gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and their activities in relation to development. *J Bacteriol* **174**: 6215-6220.
- Soliveri,J.A., Gomez,J., Bishai,W.R., and Chater,K.F. (2000) Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology* **146** (Pt 2): 333-343.
- Sondek,J., Bohm,A., Lambright,D.G., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* **379**: 369-374.

- Song, J.Y., Jeong, H., Yu, D.S., Fischbach, M.A., Park, H.S., Kim, J.J. *et al.* (2010) Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *J Bacteriol* **192**: 6317-6318.
- Sprague, E.R., Redd, M.J., Johnson, A.D., and Wolberger, C. (2000) Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J* **19**: 3016-3027.
- Sprusansky, O., Zhou, L., Jordan, S., White, J., and Westpheling, J. (2003) Identification of three new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **185**: 6147-6157.
- Steyn, A.J., Collins, D.M., Hondalus, M.K., Jacobs, W.R., Jr., Kawakami, R.P., and Bloom, B.R. (2002) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3147-3152.
- Stoytcheva, Z., Joshi, B., Spizek, J., and Tichy, P. (2000) WD-repeat protein encoding genes among prokaryotes of the *Streptomyces* genus. *Folia Microbiol (Praha)* **45**: 407-413.
- Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., and Thompson, C.J. (1998) Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**: 33-46.
- Szabo, G., Valyi-Nagy, T. and Vitalit, S. (1962) A new factor regulating life cycle of *Streptomyces griseus*. Genetics of Microorganisms, Proceedings of a Symposium on Heredity and Variability of Microorganisms (Timakova VD, ed), pp. 282-292. State Publishing House on Medical Literature, Moscow.
- Szeszak, F., Vitalis, S., Toth, F., Valu, G., Fachel, J., and Szabo, G. (1990) Detection and determination of factor C--a regulatory protein--in *Streptomyces* strains by antiserum and monoclonal antibody. *Arch Microbiol* **154**: 82-84.
- Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y., and Bibb, M.J. (2001) A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **41**: 1015-1028.
- Takano, E., Gramajo, H.C., Strauch, E., Andres, N., White, J., and Bibb, M.J. (1992) Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **6**: 2797-2804.
- Takano, E., Kinoshita, H., Mersinias, V., Bucca, G., Hotchkiss, G., Nihira, T. *et al.* (2005a) A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **56**: 465-479.
- Takano, E., Tao, M., Long, F., Bibb, M.J., Wang, L., Li, W. *et al.* (2003) A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **50**: 475-486.
- Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T., and Ueda, K. (2005b) Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J Bacteriol* **187**: 1825-1832.
- Talbot, N.J. (2003) Aerial morphogenesis: enter the chaplins. *Curr Biol* **13**: R696-R698.
- Tan, H., Tian, Y., Yang, H., Liu, G., and Nie, L. (2002) A novel *Streptomyces* gene, *samR*, with different effects on differentiation of *Streptomyces ansochromogenes* and *Streptomyces coelicolor*. *Arch Microbiol* **177**: 274-278.
- Tan, H., Yang, H., Tian, Y., Wu, W., Whatling, C.A., Chamberlin, L.C. *et al.* (1998) The *Streptomyces coelicolor* sporulation-specific sigma WhiG form of RNA polymerase transcribes a gene encoding a ProX-like protein that is dispensable for sporulation. *Gene* **212**: 137-146.
- Thompson, C.J., Fink, D., and Nguyen, L.D. (2002) Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol* **3**: REVIEWS1020.
- Thompson, C.J., Ward, J.M., and Hopwood, D.A. (1980) DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature* **286**: 525-527.
- Tian, Y., Fowler, K., Findlay, K., Tan, H., and Chater, K.F. (2007) An unusual response regulator influences sporulation at early and late stages in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **189**: 2873-2885.
- Tillotson, R.D., Wosten, H.A., Richter, M., and Willey, J.M. (1998) A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Mol Microbiol* **30**: 595-602.



- Traag,B.A., Kelemen,G.H., and van Wezel,G.P. (2004) Transcription of the sporulation gene *ssgA* is activated by the IclR-type regulator SsgR in a *whi*-independent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **53**: 985-1000.
- Ueda,K., Miyake,K., Horinouchi,S., and Beppu,T. (1993) A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. *J Bacteriol* **175**: 2006-2016.
- Umeyama,T., and Horinouchi,S. (2001) Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *J Bacteriol* **183**: 5506-5512.
- Umeyama,T., Lee,P.C., and Horinouchi,S. (2002) Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 419-425.
- Umeyama,T., Lee,P.C., Ueda,K., and Horinouchi,S. (1999) An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145** ( Pt 9): 2281-2292.
- van Wezel,G.P., van der,M.J., Kawamoto,S., Luiten,R.G., Koerten,H.K., and Kraal,B. (2000) *ssgA* is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating septum formation. *J Bacteriol* **182**: 5653-5662.
- van der Voorn, and Ploegh,H.L. (1992) The WD-40 repeat. *FEBS Lett* **307**: 131-134.
- Verlhac,M.H., Chen,R.H., Hanachi,P., Hershey,J.W., Derynck,R (1997) Identification of partners of TIF34, a component of the yeast eIF3 complex, required for cell proliferation and translation initiation. *EMBO J.* 16(22): 6812-22
- Verreault,A., Kaufman,P.D., Kobayashi,R., and Stillman,B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**: 95-104.
- Viollier,P.H., Minas,W., Dale,G.E., Folcher,M., and Thompson,C.J. (2001) Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* **183**: 3184-3192.
- Vohradsky,J., Li,X.M., Dale,G., Folcher,M., Nguyen,L., Viollier,P.H., and Thompson,C.J. (2000) Developmental control of stress stimulons in *Streptomyces coelicolor* revealed by statistical analyses of global gene expression patterns. *J Bacteriol* **182**: 4979-4986.
- Volff,J.N., and Altenbuchner,J. (1998) Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol Microbiol* **27**: 239-246.
- Vukelic,B., Ritonja,A., Renko,M., Pokorny,M., and Vitale,L. (1992) Extracellular alpha-amylase from *Streptomyces rimosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 202-204.
- Wall,M.A., Coleman,D.E., Lee,E., Iniguez-Lluhi,J.A., Posner,B.A., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**: 1047-1058.
- Wang,C.M., and Cane,D.E. (2008) Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor*. *J Am Chem Soc* **130**: 8908-8909.
- Wang,X.J., Yan,Y.J., Zhang,B., An,J., Wang,J.J., Tian,J. *et al.* (2010) Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *J Bacteriol* **192**: 4526-4527.
- Ward,J.M., Janssen,G.R., Kieser,T., Bibb,M.J., Buttner,M.J., and Bibb,M.J. (1986) Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol Gen Genet* **203**: 468-478.
- White,J., and Bibb,M. (1997) *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *J Bacteriol* **179**: 627-633.
- Widdick,D.A., Dodd,H.M., Barraille,P., White,J., Stein,T.H., Chater,K.F. *et al.* (2003) Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus* DSM 40005. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4316-4321.
- Wildermuth,H., Wehrli,E., and Horne,R.W. (1971) The surface structure of spores and aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J Ultrastruct Res* **35**: 168-180.

- Wiley,J., Santamaria,R., Guijarro,J., Geistlich,M., and Losick,R. (1991) Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell* **65**: 641-650.
- Wiley,J., Schwedock,J., and Losick,R. (1993) Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* **7**: 895-903.
- Williams,F.E., Varanasi,U., and Trumbly,R.J. (1991) The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol Cell Biol* **11**: 3307-3316.
- Wosten,H.A. (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* **55**: 625-646.
- Wosten,H.A., and Wiley,J.M. (2000) Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology* **146** ( Pt 4): 767-773.
- Wright,L.F., and Hopwood,D.A. (1976) Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **95**: 96-106.
- Xu,G., Wang,J., Wang,L., Tian,X., Yang,H., Fan,K. *et al.* (2010a) "Pseudo" gamma-butyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *J Biol Chem* **285**: 27440-27448.
- Xu,H., Chater,K.F., Deng,Z., and Tao,M. (2008a) A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in *streptomyces*. *J Bacteriol* **190**: 4971-4978.
- Xu,W., Huang,J., and Cohen,S.N. (2008b) Autoregulation of AbsB (RNase III) expression in *Streptomyces coelicolor* by endoribonucleolytic cleavage of *absB* operon transcripts. *J Bacteriol* **190**: 5526-5530.
- Xu,W., Huang,J., Lin,R., Shi,J., and Cohen,S.N. (2010b) Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor. *Mol Microbiol* **75**: 781-791.
- Yamanaka,K., Oikawa,H., Ogawa,H.O., Hosono,K., Shinmachi,F., Takano,H. *et al.* (2005) Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* **151**: 2899-2905.
- Yamashiro,C.T., Ebole,D.J., Lee,B.U., Brown,R.E., Bourland,C., Madi,L., and Yanofsky,C. (1996) Characterization of *rco-1* of *Neurospora crassa*, a pleiotropic gene affecting growth and development that encodes a homolog of Tup1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 6218-6228.
- Yamazaki,H., Takano,Y., Ohnishi,Y., and Horinouchi,S. (2003) *anfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol* **50**: 1173-1187.
- Yu,L., Gaitatzes,C., Neer,E., and Smith,T.F. (2000) Thirty-plus functional families from a single motif. *Protein Sci* **9**: 2470-2476.
- Zhao,B., Lin,X., Lei,L., Lamb,D.C., Kelly,S.L., Waterman,M.R., and Cane,D.E. (2008) Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic albaflavenone in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem* **283**: 8183-8189.