

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

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Doktorská disertační práce**

**Účast alternativních sigma faktorů RNA  
polymerasy při regulaci exprese genů  
*Corynebacterium glutamicum***

**Radoslav Šilar**

**MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, v. v. i.**

**Školitel: RNDr. Jan Nešvera, CSc.**

**Praha 2016**

**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, 13.06. 2016

Podpis

Děkuji svému školiteli RNDr. Honzovi Nešverovi, CSc. za jeho všestrannou pomoc, trpělivost, velkou obětavost a ochotu mi pomoci nejen při sepisování této práce, ale během celého studia.

Děkuji kolegům Ing. Mirkovi Pátkovi, CSc.; Mgr. Jirkovi Holátkovi, PhD; Ing. Jurovi Szökölovi, PhD; Ing. Lence Rucké, PhD; RNDr. Pavle Kadeřábkové a v neposlední řadě Daně Lukavské za jejich ochotu vždy pomoci a utvoření skvělého pracovního prostředí, ve kterém byla radost pracovat.

Dále děkuji Tobimu Buschemu, PhD; prof. Dr. Jörnovi Kalinowskému všem kolegům za odborné vedení a podnětnou spolupráci a cenné rady během pracovním pobytu na Univerzitě v Bielefeldu.

Děkuji prof. Dr. Hughovi Morganovi a jeho kolektivu za nejen odbornou podporu A nezapomenutelné zážitky během mého pobytu na Univerzitě Waikato v Hamiltonu na Novém Zélandu.

Děkuji všem kolegům z laboratoře 123, MBÚ AV ČR a lidem ze třetího patra za vytvoření přátelského (nejen) pracovního prostředí, za pomoc i rady.

Poděkovat bych chtěl partnerce Evče a svým dětem Barunce a Vítkovi za jejich podporu a trpělivost při sepisování této práce, stejně svým rodičům Olince a Kájovi, celé rodině a rodinným známým za všestrannou podporu a pomoc během celého doktorského studia.

## Obsah

<b>Abstrakt .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Cíle práce .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>4</b>
2.1. Iniciační transkripce u bakterií .....	4
2.2. Regulace iniciační transkripce .....	5
2.2. Sigma faktory RNA polymerasy a jejich role při iniciaci transkripce .....	7
2.2.1. Sigma faktory z rodiny $\sigma^{70}$ .....	7
2.2.2. Sigma faktory z rodiny $\sigma^{54}$ .....	8
2.3. Sigma faktory u korynebakterií .....	9
2.3.1. Sigma faktory u <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	9
2.3.1.1. Primární sigma faktor $\sigma^A$ .....	9
2.3.1.2. Sigma faktor $\sigma^B$ .....	10
2.3.1.3. Sigma faktory $\sigma^C$ a $\sigma^D$ .....	11
2.3.1.4. Sigma faktor $\sigma^E$ .....	12
2.3.1.5. Sigma faktor $\sigma^H$ .....	13
2.3.1.6. Sigma faktor $\sigma^M$ .....	16
2.4. Regulace transkripce genů za stresových podmínek u <i>C. glutamicum</i> .....	18
2.4.1. SOS buněčná odpověď .....	18
2.4.2. Regulace transkripce při odpovědi na oxidativní stres .....	19
2.4.3. Regulace transkripce při odpovědi na tepelný šok u <i>C. glutamicum</i> .....	20
2.5. Nové metody pro studium transkripce .....	21
2.5.1. <i>In-vitro</i> transkripční systém a jeho význam pro studium exprese genů .....	21
2.5.2. Mapování transkriptomu na genomové úrovni .....	22
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>24</b>
3.1. Materiál .....	24
3.1.1. Bakteriální kmeny .....	24
3.1.2. Plazmidy .....	25
3.1.3. Oligonukleotidy (primery) pro PCR .....	33
3.1.4. Kultivační půdy.....	36
3.1.5. Komerční soupravy.....	37

---

3.1.6. Použitý software .....	38
3.1.7. Přístroje .....	38
3.2. Metody .....	39
3.2.1. Kultivace <i>E. coli</i> a <i>C. glutamicum</i> .....	39
3.2.2. Izolace nukleových kyselin .....	39
3.2.2.1. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> .....	39
3.2.2.2. Miniizolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> .....	40
3.2.2.3. Izolace plazmidové DNA z <i>C. glutamicum</i> .....	41
3.2.3. Transformace .....	42
3.2.3.1. Transformace <i>E. coli</i> .....	42
3.2.3.2. Transformace <i>C. glutamicum</i> elektroporací .....	43
3.2.4. Dlouhodobé uchovávání buněk v glycerolu při -70 °C .....	44
3.2.5. Manipulace s DNA .....	45
3.2.5.1. Extrakce fenolem .....	45
3.2.5.2. Srážení DNA etanolem .....	45
3.2.5.3. Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu .....	46
3.2.5.4. Elektroforetická analýza SDS-PAGE .....	46
3.2.5.5. Izolace plazmidové DNA a jejích fragmentů z agarosového gelu .....	47
3.2.5.6. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami .....	48
3.2.5.7. Ligace fragmentů plazmidové DNA .....	48
3.2.5.8. Polymerásová řetězová reakce (PCR) .....	49
3.2.5.9. Klonování promotorových oblastí do vektoru pRLG770 pomocí hotových oligo fragmentů .....	50
3.2.6. Stanovení specifické aktivity - chloramfenikolacetyltransferasa (CAT) .....	51
3.2.7. Stanovení fluorescence zeleného proteinu (GFP) .....	53
3.2.8 DNA Microarray hybridization .....	55
3.2.9 Určování transkripčních počátků .....	55
3.2.9.1 <i>Primer-extension</i> .....	55
3.2.9.2 5' RACE .....	57
3.2.10. <i>In-vitro</i> transkripční systém .....	58
3.2.10.1. Konstrukce kmene <i>C. glutamicum rpoC-His8</i> a izolace jádra RNA polymerasy .....	59
3.2.10.2. Purifikace jádra RNA polymerasy .....	60
3.2.10.3. Klonování a izolace proteinů sigma faktorů .....	60
3.2.10.4. Transkripční reakce <i>in-vitro</i> .....	61

<b>4. Výsledky .....</b>	<b>63</b>
4.1. Charakteristika kmenů <i>C. glutamicum</i> s delecemi genů kódujících sigma faktory - růst v tekuté půdě .....	63
4.2. Analýza operonu <i>sigH-rshA</i> .....	66
4.2.1. Klonování promotorových oblastí genů <i>sigH</i> a <i>rshA</i> .....	66
4.2.2. Měření aktivity promotorové oblasti genu <i>sigH</i> .....	67
4.2.3. Měření aktivity promotoru genu <i>rshA</i> .....	70
4.2.4. Určení transkripčních startů genu <i>sigH</i> .....	72
4.2.5 Analýza promotorů P1P2P3 <i>sigH</i> a P4 <i>sigH</i> .....	74
4.2.6. Určení transkripčních startů genu <i>rshA</i> .....	77
4.3. DNA Microarray analýza kmene <i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>rshA</i> .....	78
4.4. Analýza promotorů rozeznávaných alternativním sigma faktorem SigH .....	82
4.4.1 Klonování a stanovení aktivit promotorů genu <i>dnaJ2</i> ( <i>cg2515</i> ) .....	82
4.4.2 Určení transkripčních startů genu <i>dnaJ2</i> .....	85
4.4.3 Klonování a stanovení aktivit promotorů genů <i>uvrA</i> ( <i>cg1560</i> ) a <i>uvrD</i> ( <i>cg1555</i> ).....	86
4.4.4 Určení transkripčních startů genů <i>uvrA</i> a <i>uvrD</i> .....	87
4.4.5 Klonování a stanovení aktivity promotoru genu <i>sigM</i> .....	89
4.4.6 Klonování a stanovení aktivit promotorů genů <i>cg2661</i> (DDI) a <i>cg3405</i> (ZDO).....	90
4.5. Analýza promotorů rozeznávaných dvěma sigma faktory .....	92
4.5.1 Měření aktivity promotoru P1 <i>clgR</i> .....	93
4.5.2 Měření aktivity promotoru P2 <i>dnaK</i> .....	94
4.5.3 Měření aktivity promotoru P2 <i>dnaJ2</i> .....	94
4.6. <i>In-vitro</i> transkripční analýza vybraných promotorů.....	94
4.6.1 <i>In-vitro</i> transkripční analýza promotoru P <i>per</i> .....	95
4.6.2 <i>In-vitro</i> transkripční analýza promotoru P4 <i>sigH</i> .....	95
4.6.3 <i>In-vitro</i> transkripční analýza promotorů genu <i>dnaJ2</i> .....	96
4.6.4 <i>In-vitro</i> transkripční analýza promotoru P2 <i>dnaK</i> .....	98
4.6.5 <i>In-vitro</i> transkripční analýza promotoru P1 <i>clgR</i> .....	98
4.6.6 <i>In-vitro</i> transkripční analýza promotorů <i>PtrxB</i> a <i>PtrxB1</i> .....	99
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>101</b>
5.1. Identifikace SigH-dependentních genů .....	102
5.2. Analýza promotorů operonu <i>sigH-rshA</i> .....	103

5.3. Analýza promotorů SigH-dependentních genů .....	107
5.4 Analýza promotorů rozeznávaných dvěma sigma faktory .....	111
<b>6. Závěr.....</b>	<b>113</b>
<b>7. Seznam použité literatury.....</b>	<b>115</b>



## Seznam použitých zkratek

×g	násobky tíhového zrychlení
A260, A280	absorbance při vlnové délce 260 (280) nm
AmpR/AmR	rezistence k ampicilinu
ATP	adenosintrifosfát
AU	arbitrární jednotky ( <i>arbitral units</i> )
bp, bps	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
<i>C. g.</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CAT	chloramfenikolacetyltransferasa
cDNA	komplementární DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CoA	koenzym A
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNasa	deoxyribonukleasa
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
ECF sigma faktor	extracytoplazmatický sigma faktor
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
EtOH	etanol
Gfp	zelený fluoreskující protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GTP	guanosintrifosfát
kb	tisíc párů bází
kD	kilodalton
KmR	rezistence ke kanamycinu
Mb	milion párů bází
mRNA	mediátorová kyselina ribonukleová
NAD <sup>+</sup> , NADH	(oxidovaný, redukovaný) nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
nt	nukleotid
OD <sub>600</sub>	optická densita při vlnové délce 600 nm
PCR	polymerasová řetězová reakce
PEX	primer-extension
ppGpp	guanosin 3',5' - bispyrofosfát
RNA	kyselina ribonukleová
RNAP	RNA polymerasa

RNasa	ribonukleasa
SDS	dodecylsulfát sodný
TSP	pozice transkripčního startu
wt	divoký kmen ( <i>wild type</i> )
$\sigma$	sigma faktor

## Abstrakt

Regulace transkripce sigma faktory RNA polymerasy s extracytoplazmatickou funkcí (ECF) představuje velmi účinný nástroj pro adaptaci buňky na stresové podmínky vyvolané změnami ve vnějším prostředí. Gram-pozitivní, aerobní bakterie *Corynebacterium glutamicum* je významným producentem aminokyselin. V genomu *C. glutamicum* se nachází 7 genů kódujících sigma faktory: primární sigma faktor SigA, sigma faktor SigB označovaný jako *primary-like* sigma faktor a 5 ECF sigma faktorů (SigC, SigD, SigE, SigH a SigM). Gen *sigH*, kódující sigma faktor SigH se nachází v těsné blízkosti genu *rshA* kódujícího jeho anti-sigma faktor. Anti-sigma faktory se reverzibilně vážou k příslušným sigma faktorům, čímž blokují jejich aktivitu. Za stresových podmínek je vazba mezi oběma proteiny rozrušena a uvolněný sigma faktor se může vázat k jádru RNA polymerasy a aktivovat iniciaci transkripce.

V práci byla studována především regulace exprese genů kódujících nejvýznamnější ECF sigma faktor SigH a jeho anti-sigma faktor RshA a geny patřící k jeho regulonu.

Transkripční analýzou operonu *sigH-rshA* byly identifikovány čtyři vegetativní promotory genu *sigH* a jeden SigH-dependntní promotor genu *rshA*.

Účast komplexu SigH-RshA na regulaci exprese genů byla zkoumána s použitím delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta rshA$ . Metodou DNA Microarray byly porovnány transkripční profily delečního kmene a divokého kmene *C. glutamicum*. Bylo zjištěno, že celkem 83 genů u delečního kmene, neprodukujícího anti-sigma faktor RshA, vykazalo zvýšenou míru transkripce v porovnání s divokým kmenem, a je tedy možné je považovat za SigH-dependntní. Některé z těchto genů byly již dříve identifikovány jako SigH-dependntní s použitím delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH$ . Tyto geny se účastní buněčné odpovědi na disulfidový stres, tepelný šok, buněčné SOS odpovědi při poškození DNA nebo jsou součástí buněčného proteasomu.

Byly stanoveny promotorové aktivity vybraných nově identifikovaných SigH-dependntních genů (*dnaJ2*, *uvrA* a *uvrD*), identifikovány jejich transkripční počátky a následně odvozeny promotorové motivy -10 a -35.

Použitím *in-vitro* transkripčního systému bylo zjištěno, že typický vegetativní promotor *P<sub>per</sub>* interaguje jak s primárním sigma faktorem SigA, tak se sigma faktorem SigB. U SigH-dependntních promotorů genů *clgR*, *dnaK* a *dnaJ2* pak bylo zjištěno, že jsou specificky rozeznávány i ECF sigma faktorem SigE. Bylo tak poprvé u *C. glutamicum* prokázáno, že jeden promotor může být současně rozeznáván více než jedním sigma faktorem.

## Abstract

Regulation of transcription by extracytoplasmic-function (ECF) sigma factors of RNA polymerase is an efficient way of cell adaptation to diverse environmental stresses. Amino acid-producing gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* codes for seven sigma factors: the primary sigma factor SigA, the primary-like sigma factor SigB and five ECF stress-responsive sigma factors (SigC, SigD, SigE, SigH and SigM). The *sigH* gene encoding SigH sigma factor is located in a gene cluster together with the *rshA* gene, encoding the anti-sigma factor of SigH. Anti-sigma factors bind to their cognate sigma factors and inhibit their transcriptional activity. Under the stress conditions the binding is released allowing the sigma factors to bind to the RNAP core enzyme.

In this thesis, regulation of expression of genes encoding the most important ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA as well as genes belonging to the SigH-regulon were mainly studied.

The transcriptional analysis of the *sigH-rshA* operon revealed four housekeeping promoters of the *sigH* gene and one SigH-dependent promoter of the *rshA* gene.

For testing the role of the complex SigH-RshA in gene expression, the *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  strain was used for genome-wide transcription profiling with DNA Microarrays technique under the normal growth conditions. In total 83 genes (including those previously detected using  $\Delta sigH$  mutant strains) demonstrated increased transcript levels in the deletion mutant defective in RshA anti-sigma factor when compared to *C. glutamicum* wild-type strain and they can be thus considered as SigH-dependent. These genes encode proteins related to disulphide stress response, heat stress proteins, components of the SOS-response to DNA damage and proteasome components.

The promoter activities of some newly identified SigH-dependent genes *dnaJ2*, *uvrA* and *uvrD* were estimated, their transcription start points were determined and the -10 and -35 hexamers of the respective promoters were proposed.

Using *in-vitro* transcription system it was found that the typical housekeeping promoter *Pper* interacts with the alternative sigma factor SigB in addition to the primary sigma factor SigA. Some promoters of SigH-dependent promoters of genes involved in stress responses (*clgR*, *dnaK* and *dnaJ2*) were found to be recognized also ECF sigma factor SigE. For the first time it was demonstrated that in *C. glutamicum* one promoter can be recognized by more than one sigma factor.

## 1.1 Úvod

*Corynebacterium glutamicum* je nepatogenní, aerobní bakterie, která byla objevena koncem 50. let minulého století jako mikroorganismus s přirozenou produkcí kyseliny L-glutamové a dodnes se využívá zejména při průmyslové výrobě aminokyselin (Gopinath *et al.*, 2012; Hermann, 2003; Leuchtenberger *et al.*, 2005) a ostatních látek využívaných v biotechnologickém průmyslu, např. vitamínů (Huser *et al.*, 2005), oligonukleotidů (Vertes *et al.*, 2012), organických kyselin (Wieschalka *et al.*, 2012), vyšších alkoholů (Blombach & Eikmanns, 2011) a polymerů (Song *et al.*, 2012). *C. glutamicum* rovněž slouží jako modelový organismus pro ostatní koryneformní bakterie s technologickým případně lékařským významem (Brune *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2007; Moker *et al.*, 2004).

V posledních letech vzrostla znalost o genech kódujících proteiny, které se účastní buněčné odpovědi na nejrůznější typy stresů vyvolaných vnějším prostředím (Jung *et al.*, 2011; Larisch *et al.*, 2007; Muffler *et al.*, 2002; Oide *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016). Mezi nejstudovanější buněčný mechanismus stresové odpovědi nejen u mikroorganismů je reakce na tepelný šok (Yura & Nakahigashi, 1999). Mezi další stresové faktory aktivující buněčnou stresovou odpověď se řadí oxidativní, etanolový a disulfidový stres. Hlavním krokem buněčné odpovědi na stresové podmínky je iniciace transkripce genů, jejichž proteinové produkty zamezují nevratnému poškození buněk vlivem výše zmíněných faktorů. Pro samotnou iniciaci genové exprese jsou nezbytné sigma faktory RNA polymerasy. Tyto proteiny rozeznávají specifické promotorové oblasti daných genů. V genomu *C. glutamicum* se nachází sedm genů kódujících sigma faktory, z nichž pět se řadí mezi tzv. sigma faktory s extracytoplazmatickou funkcí (ECF sigma faktory), jejichž aktivita je regulována podněty z vnějšího prostředí.

ECF sigma faktor SigH je u *C. glutamicum* považován za hlavní sigma faktor regulující iniciaci transkripce za stresových podmínek. Aktivita homologního sigma faktoru SigH u *Mycobacterium tuberculosis* je řízena anti-sigma faktorem RshA (Song *et al.*, 2003). Komplex SigH-RshA udržuje sigma faktor SigH v neaktivní formě. V přítomnosti stresového faktoru dojde k uvolnění vazby mezi oběma proteiny a volný SigH se může účastnit regulace exprese genů v procesu buněčné reakce na stres vyvolaný vnějším prostředím. U *C. glutamicum* se v sousedství genu *sigH* nachází gen *rshA*. Předpokládá se tedy, že protein RshA funguje i u *C. glutamicum* jako anti-sigma faktor k sigma faktoru SigH.

Hlavními cíli této práce byla analýza operonu *sigH-rshA* a funkce sigma faktoru SigH a jeho anti-sigma faktoru RshA při expresi genů účastnících se buněčné odpovědi na nejrůznější stresové faktory u *C. glutamicum*, identifikace genů se SigH-dependentním promotorem a jejich transkripční analýza a konstrukce *in-vitro* transkripčního systému pro *C. glutamicum*.

## 1.2 Cíle práce

Tato disertační práce je zaměřena na studium účasti alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při regulaci exprese genů kódujících proteiny podílející se na buněčné odpovědi na stresové podmínky vyvolané vnějším prostředím u *Corynebacterium glutamicum*. Hlavním cílem práce bylo poznání funkce alternativního sigma faktoru SigH a regulace jeho syntézy. SigH je považován za hlavní sigma faktor regulující expresi genů stresové odpovědi *C. glutamicum*. Jeho aktivita je regulována předpokládaným anti-sigma faktorem RshA, jehož gen *rshA* sousedí s genem pro SigH.

Disertační práce měla tyto dílčí cíle:

- 1) Transkripční analýza operonu *sigH-rshA*
- 2) Identifikace genů se SigH-dependentním promotorem
- 3) Transkripční analýza genů se SigH-dependentním promotorem
- 4) Konstrukce *in-vitro* transkripčního systému a jeho využití pro analýzu vybraných promotorů

## 2. Literární přehled

### 2.1. Iniciační transkripce u bakterií

Iniciační transkripce je u bakterií nejdůležitější krok v regulaci exprese genů (Browning & Busby, 2004). V tomto procesu hraje hlavní roli DNA-dependentní RNA polymerasa (Ebright, 2000), zejména její sigma podjednotka (faktor) (Gross *et al.*, 1998; Lonetto *et al.*, 1992). RNA polymerasa (RNAP) je enzymový komplex složený z pěti podjednotek. Jádro enzymu se skládá ze dvou podjednotek  $\alpha$  a dále pak podjednotek  $\beta$ ,  $\beta'$  a  $\omega$ . Podjednotka  $\alpha$  je kódovaná genem *rpoA* a účastní se sestavování tetramerního komplexu ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) RNA polymerasy. Podjednotka  $\beta$ , kódována genem *rpoB*, obsahuje vazebné místo pro ribonukleotidtrifosfáty a podjednotka  $\beta'$ , přepisována z genu *rpoC*, nese vazebné místo pro templátovou molekulu DNA. Podjednotka  $\omega$  hraje důležitou roli při vazbě podjednotky  $\beta'$  do jádra RNA polymerasy (Mathew & Chatterji, 2006; Minakhin *et al.*, 2001) a současně funguje jako vazebné místo pro guanosintetrafosfát ((p)ppGpp) při buněčné stringentní odpovědi (Mathew & Chatterji, 2006).

Proces iniciační transkripce začíná navázáním sigma faktoru do katalytického jádra RNA polymerasy za vzniku komplexu RNAP holoenzymu (Murakami *et al.*, 2002a). Funkcí sigma faktoru je rozpoznání promotorových sekvencí a následné navázání RNA polymerasy na příslušný promotor (Shultzaberger *et al.*, 2007). Převážná většina bakteriálních druhů syntetizuje několik odlišných sigma faktorů, které rozpoznávají specifické sekvence v promotorových oblastech a mohou tak regulovat expresi různých genů nebo celých regulonů v závislosti na měnících se podmínkách (Feklistov & Darst, 2011).

Samotná transkripce začíná vazbou RNAP holoenzymu do promotorové oblasti DNA (Fassler & Gussin, 1996). Bakteriální promotor je složen ze dvou vysoce konservativních sekvencí, které jsou odvozeny od vzdálenosti od transkripčního počátku (TSP) (Wosten, 1998). První oblast je soustředěna kolem nukleotidu -35 a druhá se nachází v okolí nukleotidu -10 (Campbell *et al.*, 2002; Merrick, 1993). Promotory jednotlivých transkripčních jednotek bakteriálního chromosomu si jsou do jisté míry podobné, ale nikoliv totožné. Jejich podobnost v nukleotidových sekvencích zajišťuje afinitu k jedinému RNAP holoenzymu, zatímco rozdíly mezi nimi rozhodují o míře této afinity, tedy o síle promotoru. Silný bakteriální promotor se vyznačuje vysokou frekvencí iniciační transkripce na rozdíl od slabého promotoru. Promotor je tím silnější, čím více se sekvence kolem nukleotidu -35 blíží konservativním sekvencím. Proto také mutace, které oddalují sekvenci od konservativní sekvence, snižují jeho sílu (Rodrigue *et al.*, 2006).



Většina bakterií nese ve svém genomu geny kódující různé druhy sigma faktorů, které jsou klasifikovány do jednotlivých skupin. Zástupci jednotlivých skupin rozeznávají odlišné motivy v promotorových oblastech, a tedy mohou regulovat iniciaci transkripce různých genů za různých fyziologických podmínek (Gruber & Gross, 2003). Sigma faktory tedy působí jako globální regulátory transkripce, které mohou regulovat jak expresi jednotlivých genů, tak i celých regulonů či sigmulonů (geny, jejichž iniciace transkripce je regulována stejným sigma faktorem) v procesu buněčné odpovědi na stresové podmínky (Feklistov & Darst, 2011).

U všech bakterií je přítomen primární sigma faktor, který je zodpovědný za transkripci většiny genů, které jsou aktivní hlavně během exponenciální fáze růstu. Geny kódující primární sigma faktory jsou zpravidla esenciální a jejich mutace letální pro daný mikroorganismus. Bakterie však kódují i řadu alternativních sigma faktorů rozeznávajících promotory genů aktivovaných různými typy stresových podmínek (Paget, 2015). Alternativní sigma faktory jsou většinou neesenciální. Jejich významnou skupinou jsou tzv. sigma faktory s extracytoplasmatickou funkcí (ECF) (Helmann, 2002), které regulují transkripci genů v závislosti na vnějších podmínkách (Gruber & Gross, 2003).

Bakteriální sigma faktory jsou klasifikovány do dvou strukturně a funkčně odlišných rodin  $\sigma^{54}$  (Gruber & Gross, 2003) a  $\sigma^{70}$  (Buck *et al.*, 2000). Oba názvy pochází od velikosti sigma faktorů v kD identifikovaných u *Escherichia coli*. Sigma faktory z rodiny  $\sigma^{70}$  byly identifikovány u všech známých bakteriálních druhů, kdežto zástupci z rodiny  $\sigma^{54}$  jsou poměrně vzácní. Jejich funkce spočívá například v regulaci transkripce genů pro sporulaci u *Bacillus subtilis* (Wosten, 1998).

## 2.2. Regulace iniciace transkripce

Regulace iniciace transkripce patří k základním a velmi účinným buněčným mechanismům. Jedním ze základních mechanismů regulace exprese různých genů je rozeznávání jejich promotorů různými sigma faktory, které tak působí jako globální regulátory genové exprese. Významnými regulátory genové exprese jsou i anti-sigma faktory, které negativně regulují iniciaci transkripce pomocí interakce se specifickým ECF  $\sigma$ -faktorem. Vazba anti-sigma faktoru na příslušný  $\sigma$ -faktor za fyziologických podmínek, kdy jeho funkce není potřeba, vede ke vzniku komplexu, ve kterém je daný sigma faktor neaktivní. (Brown & Hughes, 1995). Tato vazba je reverzibilní a v případě stresových podmínek je rozvolněna, což vede k uvolnění sigma faktoru, který tak může iniciovat transkripci příslušných stresových genů. Tento mechanismus umožňuje buňce

pružně reagovat na změny vnějších podmínek, kdy alternativní  $\sigma$ -faktor je v buňce přítomen a nemusí být nově syntetizován (Feklistov & Darst, 2011).

Je známo též mnoho DNA-vazebných regulačních proteinů, které mají vliv na aktivitu promotorů. Například u *E. coli* je známo 40 proteinů, které dokážou aktivovat či zastavovat transkripci promotorů regulovaných faktorem  $\sigma^{70}$ . Tyto proteiny umožňují bakteriím regulovat expresi genů v závislosti na vnitřních či vnějších podnětech. Geny, které odpovídají na stejný podnět, často používají stejné regulační elementy a jsou proto součástí regulonu. Aktivátory těchto promotorů se obvykle vážou na DNA mezi pozicemi -30 nt až -80 nt od transkripčního počátku. Represor se primárně váže do místa, které se překrývá s vazebným místem pro RNA polymerasu (Rosen & Ron, 2002).

Proteiny podobné histonům (např. H-NS u *E. coli*) mohou také inhibovat iniciaci transkripce. Mohou se vázat na libovolné místo v DNA, ale přednostně do zkroucených míst. Rovněž inhibují transkripci mnoha genů ve stacionární fázi růstu (Carmona *et al.*, 1997).

Dalšími faktory ovlivňujícími transkripci jsou metylace DNA a guanosintetrafosfát (ppGpp) (Chatterji & Ojha, 2001). Metylace mohou ovlivnit vazbu RNAP holoenzymu nebo transkripčních regulátorů. Tímto mechanismem jsou regulovány některé operony kódující fimbrie u *E. coli* (Wosten, 1998). Guanosintetrafosfát je syntetizován pomocí enzymu RelA, který je aktivován při hladovění na některou z aminokyselin. Jeho vysoká koncentrace vyúsťuje v zastavení syntézy RNA a výrazně zpomaluje procesy spotřebovávající energii. Molekula ppGpp aktivuje několik promotorů jako třeba promotor genu *rpoS*, který kóduje hlavní alternativní sigma faktor *E. coli* působící při stresových podmínkách (Loewen & Hengge-Aronis, 1994). Promotory, které jsou negativně regulovány ppGpp, obsahují velké množství nukleotidů G+C mezi transkripčním počátkem a oblastí -10. Tato oblast se nazývá jako *stringent box* či diskriminátor. U *E. coli* obsahuje shodnou sekvenci GCGCCnCC (Rosen & Ron, 2002).

Mezi další významné regulátory transkripce patří malé molekuly RNA (sRNA). Ty lze charakterizovat jako krátké transkripty o délce mezi 50-400 nukleotidy, které jsou kódovány převážně v mezigenových oblastech, tedy mezi geny kódujícími proteiny. Následné studie ukázaly, že v bakteriích se vyskytuje několik funkčně odlišných typů malých molekul RNA, které jsou rozděleny do několika skupin. V první skupině se nacházejí sRNA, které se vážou na proteiny a tím regulují jejich aktivitu (Wassarman & Storz, 2000). Další skupinu tvoří sRNA fungující jako *antisense*, které se vážou na cílové molekuly mRNA, a tím blokují jejich translaci (Gottesman *et al.*, 2001). Tyto molekuly

RNA se dále rozděluje na cis-kódované sRNA, které jsou přepisovány ze stejného místa v opačném směru než cílová mRNA a jsou k ní tedy plně komplementární a na trans-kódované *antisense* RNA přepisované z jiného místa než její cílová RNA (Wagner *et al.*, 2002). U bakterií byly objeveny též sRNA s duální funkcí, které se částečně chovají jako nekódující RNA a zároveň část jejich sekvence kóduje protein. Příkladem RNA s duální funkcí je RNAIII o délce 514 nukleotidů, která byla objevena u patogenního druhu *Staphylococcus aureus*. Tato RNA je kódována v oblasti genu *agr* kódujícího globální regulátor, který je například zodpovědný za virulenci bakterie (Vanderpool *et al.*, 2011).

## 2.2. Sigma faktory RNA polymerasy a jejich role při iniciaci transkripce

### 2.2.1. Sigma faktory z rodiny $\sigma^{70}$

Srovnání sekvencí proteinů této rodiny u různých eubakterií vedlo k identifikaci čtyř konservovaných aminokyselinových oblastí, které jsou dále rozděleny na další podoblasti (Obr. 2.1). Oblast 1 (neboli N-terminální) je rozdělena na 2 podoblasti. Oblast 1.1 se nachází pouze u primárních  $\sigma$ -faktorů, které jsou odpovědné za vznik otevřeného komplexu. Oblast 1.2 pravděpodobně odpovídá za vytvoření otevřeného komplexu. Tato oblast je známa u všech  $\sigma$ -faktorů této rodiny (Wilson & Dombroski, 1997). Delece v této části má negativní vliv na utváření uzavřeného komplexu



**Obr. 2.1 - Znázornění konservativních oblastí a domén u sigma faktorů rodiny  $\sigma^{70}$ .**

NCR- nekonservovaná oblast

TG- dimer situovaný jednu bázi před hexamerem -10 ve směru transkripce

↓ - vertikální šipky znázorňují vazbu jednotlivých podjednotek sigma faktoru s motivy promotorových oblastí -10 respektive -35

↓ - Šipka představující počátek transkripce (+1) a jeho směr (Patek & Nesvera, 2011).

Oblast 2 můžeme rozdělit na 5 podoblastí. Oblast 2.1 je důležitá pro interakci s podjednotkami jádra RNAP. Oblast 2.2 nebyla doposud charakterizována. Oblast 2.3 narušuje vazby v DNA. Zvláště důležitá je oblast 2.4 s funkcí rozpoznání místa -10 na promotoru. Mutace v této oblasti mění vzájemné interakce s promotorem. Poslední část 2.5 je významná při kontaktu nukleotidů v promotorové oblasti -15 a -14 u *E. coli* nebo v oblasti -16 u *Bacillus subtilis*. Oblasti 3 a 4 jsou shodně rozděleny na 2 části. Oblast 3.1

obsahuje motiv helix-turn-helix a oblast 3.2 hraje zřejmě roli při vazbě na RNAP. Oblast 4.1 je důležitá jako transkripční aktivátor během iniciace transkripce a oblast 4.2 k rozpoznání -35 promotorové sekvence (Murakami *et al.*, 2002a; Murakami *et al.*, 2002b; Vassilyev *et al.*, 2002)

Sigma faktory z rodiny  $\sigma^{70}$  lze rozdělit do čtyř základních skupin podle jejich struktury a fyziologických funkcí (Lonetto *et al.*, 1992; Lonetto *et al.*, 1994). Do první skupiny se řadí sigma faktory obsahující všechny čtyři konvenční oblasti a jsou nezbytné pro růst bakterie. Do této skupiny se řadí primární sigma faktory, jejichž nepřítomnost v buňce je letální (Wosten, 1998).

Druhá skupina byla nalezena jen u některých skupin bakterií (*Proteobacteria*, *Cyanobacteria* a Gram-pozitivní bakterie s vysokým obsahem GC párů v genomu) (Kalinowski *et al.*, 2003). Skládá se ze sigma faktorů podobných primárním, které ale nejsou nezbytné k růstu v laboratorních podmínkách. Některé z nich se účastní transkripce genů důležitých pro stacionární fázi růstu a pro *general stress response*. Sigma faktory této skupiny mohou rozpoznávat stejné promotory jako primární sigma faktory a sloužit tak jako záložní sigma faktor. Funkce sigma faktorů této skupiny u bakterií s vysokým podílem GC párů není zatím příliš prozkoumána (Rodrigue *et al.*, 2006).

Třetí skupina faktorů neobsahuje konvenční oblast 1, ostatní oblasti 2, 3 a 4 jsou však již vzdáleně příbuzné první skupině. U některých bakterií se účastní procesů sporulace, syntézy bičíku či buněčné odpovědi na tepelný šok (Manganelli *et al.*, 2004).

Čtvrtá skupina je největší a nejrozmanitější (Gruber & Gross, 2003) a je tvořena extracytoplazmatickými sigma faktory (ECF), které obsahují pouze oblasti 2 a 4. Funkce většiny sigma faktorů této skupiny zůstává zatím neobjasněna. Mnoho z nich hraje důležitou roli při odpovědi na stres. Některé jsou důležité při procesu virulence (Raivio & Silhavy, 2001) (Bashyam & Hasnain, 2004).

### 2.2.2. Sigma faktory z rodiny $\sigma^{54}$

Sigma faktory patřící do rodiny  $\sigma^{54}$  byly objeveny u mnoha bakteriálních druhů (Gruber & Gross, 2003). Jejich role byla objevena v souvislosti s regulací transkripce genů účastnících se metabolismu dusíku (Merrick, 1993). U bakterie *Bacillus subtilis* hraje  $\sigma^{54}$  významnou roli v utilizaci argininu a ornitinu (Gardan *et al.*, 1997) a v transportu fruktosy (Debarbouille *et al.*, 1991). S nástupem sekvenování genomů byly identifikovány geny potenciálně kódující  $\sigma^{54}$  u mnoha bakterií, například u extrémně termofilních bakterií (Deckert *et al.*, 1998); (Studholme *et al.*, 2000), intarcelulárních

patogenů (Stephens *et al.*, 1998); (Kalman *et al.*, 1999), spirochet (Fraser *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1998) nebo zelených sírných bakterií (Studholme & Buck, 2000). U *Corynebacterium glutamicum* nebyl sekvenačními technologiemi sigma faktor tohoto typu objeven (Patek & Nesvera, 2011).

### 2.3. Sigma faktory u korynebakterií

U korynebakterií nebyly identifikovány sigma faktory patřící do rodiny  $\sigma^{54}$  a také sigma faktory třetí skupiny z rodiny  $\sigma^{70}$ . Sigma faktory korynebakterií byly určeny a pojmenovány podle sekvenčně homologních sigma faktorů velmi blízkého druhu *Mycobacterium tuberculosis*, u něhož byly sigma faktory intenzivně studovány. Na základě této analýzy byl popsán primární sigma faktor SigA ( $\sigma^A$ ) patřící do 1. skupiny sigma faktorů a alternativní *primary-like* sigma faktor SigB ( $\sigma^B$ ) patřící do 2. skupiny sigma faktorů. Oba tyto sigma faktory byly nalezeny u 19 osekvenovaných korynebakteriálních druhů (Patek & Nesvera, 2011; Watanabe *et al.*, 2013).

*Corynebacterium glutamicum* kóduje ve svém genomu 7 sigma faktorů: primární sigma faktor SigA, *primary-like* sigma faktor SigB a 5 ECF sigma faktorů SigC, SigD, SigE, SigH a SigM (Patek & Nesvera, 2011). Aktivita ECF sigma faktorů může být regulována prostřednictvím reverzibilní vazby s anti-sigma faktorem. U *C. glutamicum* byl teoreticky stanoven anti-sigma faktor u SigH na základě homologie s anti-sigma faktory u *M. tuberculosis* RshA (regulátor SigH) a anti-sigma faktorem RsrA (regulátor SigR, což je ortholog SigH) u *Streptomyces coelicolor* (Kim *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2003). Přímá interakce byla však u *C. glutamicum* prokázána pouze mezi sigma faktorem SigE a jeho anti-sigma faktorem CseA (Park *et al.*, 2008). Podobné genomové uspořádání genů *sigH* a *rshA* bylo teoreticky stanoveno u kmene *C. jeikeium* (Tauch *et al.*, 2005).

#### 2.3.1. Sigma faktory u *Corynebacterium glutamicum*

##### 2.3.1.1. Primární sigma faktor $\sigma^A$

Primární sigma faktor SigA je u *C. glutamicum* odpovědný za regulaci transkripce tzv. *housekeeping* genů. Sekvence aminokyselin SigA odpovědné za vazbu sigma faktoru k promotorové DNA (2, 4 a 3) jsou konservované u mnoha Gram pozitivních bakterií (Oguiza *et al.*, 1997). Exprese genu *sigA* je velmi silná v exponenciální fázi růstu bakterie a zeslabuje se přechodem kultury do stacionární fáze (Nakunst *et al.*, 2007). Dá se tedy předpokládat, že transkripce většiny aktivních genů během exponenciální fáze růstu je regulována  $\sigma^A$  (Larisch *et al.*, 2007). Na základě srovnávacích studií bylo zjištěno, že  $\sigma^A$  dependentní promotory u *C. glutamicum* mají analogickou skladbu promotorových

oblastí -35 (5'-TTGACA-3') -10 (5'-TATAAT-3') jako promotory *E. coli* rozeznávané primárním sigma faktorem RpoD. Rovněž počet nukleotidů mezi oběma hexamery je podobný jako u *E. coli* (Patek *et al.*, 2013). U *C. glutamicum* jsou promotorové motivy méně konservované než u *E. coli*. Na základě srovnávací analýzy 159 promotorů *C. glutamicum*, u nichž lze předpokládat, že jsou rozeznávány SigA, byly stanoveny tyto konvenční sekvence: pro oblast -35 (5'-TTGNCA-3'), pro rozšířenou oblast -10 (5'-GNTANANTNG-3'). Nukleotidy znázorněné tučně se vyskytují ve více než 80% studovaných promotorů, ostatní ve více než 35 % studovaných promotorů. Oblasti hexamerů jsou znázorněny podtržením (Patek & Nesvera, 2011). Pro korynebakteriální  $\sigma^A$  dependentní promotory je typická přítomnost rozšířené oblasti -10. Vzhledem k faktu, že  $\sigma^A$  není možné inaktivovat, je přímé dokazování  $\sigma^A$ -dependentních promotorů v podmínkách *in-vivo* velmi obtížné.

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

Gen *sigB* kóduje sigma faktor patřící do druhé skupiny sigma faktorů. Svou funkcí a promotorovou specifitou se podobá primárnímu sigma faktoru, ovšem na rozdíl od něho není esenciální pro růst bakterie (Oguiza *et al.*, 1997). U Gram-negativní bakterie *E. coli* je zástupce druhé skupiny sigma faktorů sigma faktor RpoS, který je indukován vstupem buněčné kultury do přechodné fáze růstu mezi exponenciální a stacionární fází a působením řady stresových faktorů a hraje tak významnou roli v buněčné adaptaci na nefyziologické podmínky růstu (Hengge-Aronis, 2002). U sigma faktorů RpoS a primárního sigma faktoru RpoD u *E. coli* je známo, že rozeznávají stejné promotorové sekvence *in-vitro*, ale *in-vivo* regulují rozdílné skupiny genů (Weber *et al.*, 2005). U *E. coli* je téměř 10% genů pod přímou či nepřímou regulací sigma faktoru RpoS, kde se předpokládá, že RpoS hraje roli druhého vegetativního sigma faktoru a to nejen za stresových či nefyziologických podmínek růstu (Weber *et al.*, 2005).

U Gram-pozitivních bakterií *C. glutamicum* a *M. tuberculosis* se předpokládá podobná role sigma faktoru SigB jakou má RpoS u *E. coli*. Gen *sigB* kóduje neesenciální sigma faktor SigB, který je přepisován během exponenciální fáze růstu. SigB se účastní transkripce genů kódujících proteiny zahrnutých v metabolismu uhlíku, aminokyselin, membránových procesech, metabolismu fosforu, avšak jeho hlavní funkcí je regulovat expresi genů za stresových podmínek vyvolaných vnějším prostředím během bakteriálního růstu a dále pak během přechodu z exponenciální do stacionární fáze (Oguiza *et al.*, 1997); (Halgasova *et al.*, 2001); (Larisch *et al.*, 2007; Oguiza *et al.*, 1997). Dále se účastní regulace transkripce genů za stresových podmínek, hlavně při limitaci

kyslíkem (Halgasova *et al.*, 2001). Disrupce genu *sigB* vede k poruše růstu a životaschopnosti *C. glutamicum* v podmínkách tepelného a chladového šoku, za přítomnosti vyšších koncentrací solí, nízkého či vysokého pH a při alkoholovém stresu. Z toho lze usuzovat, že sigma faktor SigB hraje důležitou roli během vegetativního růstu a v buněčné odpovědi na různé stresové podmínky (Halgasova *et al.*, 2001). Množství exprimovaného genu *sigB* silně závisí na růstové fázi bakterie, kdy jeho exprese vzrůstá mezi exponenciální a stacionární fází. Naopak je tomu u sigma faktoru SigA, jehož množství mRNA přechodem z exponenciální fáze do stacionární ubývá (Oguiza *et al.*, 1997). Z toho lze usoudit, že sigma faktor SigB nahrazuje primární SigA během přechodu buňky z exponenciální do stacionární fáze růstu (Larisch *et al.*, 2007). SigB-dependentní promotory byly zjištěny např. u genů kódujících acetyltransferasu a flavohemoprotein (Ehira *et al.*, 2008; Larisch *et al.*, 2007; Patek & Nesvera, 2011). Konvenční sekvence promotoru rozpoznávaná sigma faktorem SigB vykazuje velikou podobnost s konvenční sekvencí promotorů rozeznávaných sigma faktorem se SigA. Oba sigma faktory SigA a SigB tedy zřejmě rozpoznávají skupinu podobných promotorů (Oguiza *et al.*, 1997). Bylo zmapováno celkem 13 SigB dependentních promotorů, jejichž konvenční promotorové oblasti jsou pro oblast -35 (5'-GNGNCN-3') a -10 (5'-TAA/CAATTGA-3'). Písmena vyznačená tučně se vyskytují v 80% a ostatní ve více než 40% případů (Patek & Nesvera, 2011). Samotná exprese genu *sigB* je řízena jiným alternativním sigma faktorem SigH (Halgasova *et al.*, 2001) (Ehira *et al.*, 2009b).

### 2.3.1.3. Sigma faktory $\sigma^C$ a $\sigma^D$

Sigma faktory s extracytoplazmatickou funkcí SigC a SigD nebyly u *C. glutamicum* do této doby příliš prozkoumány. Při testování vlivu nadprodukce exprese genů kódujících sigma faktory na rychlost růstu bakteriální kultury v minimálním médiu bylo zjištěno, že růstovou rychlost nejvíce zpomalila zvýšená exprese sigma faktorů SigC a SigD, naopak slabého efektu bylo naměřeno u kmenů s nadprodukcí SigA, SigB, SigE a SigH (Taniguchi & Wendisch, 2015).

Sigma faktor SigC byl detailně studován teprve v nedávné době s použitím delečního kmene nesoucího nefunkční kazetu s genem *sigC* (Yukawa *et al.*, 2007). Mutace v genu *sigC* se fenotypově projevovala nižší schopností růstu bakteriální kultury *C. glutamicum* a současně byl pozorován výskyt spontánních mutací a jiné fenotypové změny kolonií (Toyoda & Inui). Podobné projevy mutace v genu *sigC* byly již dříve publikovány u mykobakterií (Matsoso *et al.*, 2005); (Small *et al.*, 2013) nebo u *E. coli* (VanOrsdel *et al.*, 2013). Gen *sigC* se nachází ve společném operonu s genem *ctaA* a *ctaB*

kódujícím hem *a* respektive hem *b* syntasu. Promotorová konsensus sekvence 16 identifikovaných SigC-dependentních promotorů byla u *C. glutamicum* stanovena 5'-GGGAACT-N16(15)-CGAC(A/T)(A/G)-'3 (Toyoda & Inui). Tato sekvence se podobá již dříve publikovaným konsensus sekvencím u *M. tuberculosis* 5'-SSSAAT-N17-20-CGTSSS-'3 (S indikuje G nebo C) (Sun *et al.*, 2004), respektive *Mycobacterium bovis* 5'-GGGAAC-N17-CGACT-'3 (Rodrigue *et al.*, 2007).

Funkcí sigma faktoru SigC je pozitivní regulace exprese genů kódujících proteiny dýchacího řetězce, na jehož konci jsou cytochromy *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* a cytochrom *bd*. SigC současně aktivuje transkripci genů kódujících enzymy CtaA a CtaB účastníci se syntézy hemu *a*, který je součástí komplexu cytochromu *aa<sub>3</sub>* a vytváří superkomplex s komplexem cytochromu *bc<sub>1</sub>* (Toyoda & Inui).

U sigma faktoru SigD existuje hypotéza, že se účastní regulace transkripce při adaptaci na mikroaerobní podmínky (Ikeda *et al.*, 2009). V tomto případě je stejným fenotypovým znakem nižší schopnost růstu bakteriální kultury při nízkých koncentracích kyslíku v médiu. Do této doby nejsou známy promotory rozeznávané sigma faktory  $\sigma^D$ , respektive jejich konvenční promotorové sekvence. Rovněž nejsou známy mechanismy, které regulují transkripci genů kódujících tyto sigma faktory.

#### 2.3.1.4. Sigma faktor $\sigma^E$

Alternativní ECF sigma faktor SigE *C. glutamicum* se účastní odpovědi buňky na povrchové stresy (Jakob *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). Připravený mutantní kmen s delecí v genu *sigE* vykazuje zvýšenou citlivost na deficit hořečnatých iontů, na působení povrchově aktivních látek EDTA, SDS, lysozymu a v neposlední řadě na tepelný šok. Gen kódující sigma faktor *sigE* se nachází v operonu s genem *cseE*, který kóduje jeho anti-sigma faktor. Přímá vazba proteinu CseE se sigma faktorem SigE byla prokázána *in-vitro* afinitní chromatografií (Park *et al.*, 2008). Ve vlastní vazbě hrají velmi důležitou roli 4 vysoce konservované cysteinové zbytky, pomocí kterých anti-sigma faktor reguluje aktivitu vlastního sigma faktoru. Zatím není znám mechanismus ani vnější signál či podnět, který by navodil podmínky pro rozvolnění komplexu SigE-CseE a uvolnění sigma faktoru SigE.

V genomu *C. glutamicum* byl do této doby publikován pouze jeden gen s označením *cg1266*, jehož expresi může regulovat sigma faktor SigE (Park *et al.*, 2008). Příslušný protein Cg1266 pravděpodobně kóduje enzym rRNA guanine-N1-methyltransferasu. Účast sigma faktoru SigE při expresi genu *cg1266* byla zjištěna na základě experimentu komparativní proteomické analýzy, kde byl porovnán divoký kmen



*C. glutamicum* (wt) s kmenem nesoucí delecí v genu *sigE* (*C. glutamicum*  $\Delta sigE$ ), a to za podmínek tepelného stresu. Následnou dvourozměrnou gelovou elektroforézou byl protein Cg1266 identifikován pouze u divokého kmene, což nasvědčuje faktu, že exprese genu *cg1266* je přímo závislá na přítomnosti sigma faktoru SigE (Park *et al.*, 2008). Množství transkriptu genu *sigE* bylo ve zvýšené míře naměřeno v mutantním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta rel$  (Brockmann-Gretza & Kalinowski, 2006) a dále za podmínek hladovění na dusík (Silberbach *et al.*, 2005a; Silberbach *et al.*, 2005b) a při tepelném stresu (Barreiro *et al.*, 2009). Tyto výsledky naznačují, že alternativní sigma faktor SigE hraje přímou či nepřímou roli v regulaci transkripce v řadě buněčných procesů. Vzhledem k výše uvedenému nebyla zatím stanovena konsensus promotorová sekvence, typická pro sigma faktor SigE.

U příbuzného kmene *M. tuberculosis* má sigma faktor SigE významnou roli v řadě buněčných procesů (Hernandez Pando *et al.*, 2010), jakými jsou dvousložkový systém (He *et al.*, 2006), fagocytóza (Casonato *et al.*, 2014) nebo bakteriální infekce (Giacomini *et al.*, 2006; Hernandez Pando *et al.*, 2010). Bylo rovněž zjištěno, že množství transkriptu genu *sigE* je oproti normálním podmínkám zvýšené za různých podmínek vnějšího prostředí, jakými jsou tepelný šok, přítomnost detergentu SDS či vankomycinu (Manganelli *et al.*, 2004); (Provvedi *et al.*, 2009) a při oxidativním stresu působením diamidu (Manganelli *et al.*, 2002; Raman *et al.*, 2004). Mutace v genu *sigE* u *M. tuberculosis* vede ke zvýšené citlivosti na výše zmíněné stresové podmínky. Samotná transkripce genu *sigE* je u *M. tuberculosis* řízena ze tří promotorů (P1,P2,P3). Exprese genu *sigE* z promotoru P1 je aktivní za normálních fyziologických podmínek (Dona *et al.*, 2008). Druhý promotor P2 je regulovaný dvousložkovým systémem MprAB a indukovaný při alkalickém a povrchovém stresu (He *et al.*, 2006). Třetí promotor P3 je rozeznávaný sigma faktorem SigH a indukovaný při tepelném a oxidativním stresu (Sachdeva *et al.*, 2010). Aktivita sigma faktoru SigE je regulována jeho ant-sigma faktorem RseA (Barik *et al.*, 2010).

V Laboratoři molekulární genetiky bakterií MBÚ AV ČR byly odvozeny promotorové oblasti genu *sigE* -35 (5'-TAGATT-3') a -10 (5'-CAAAAT-3') rozeznávané primárním sigma faktorem SigA s transkripčním počátkem na úrovni start kodónu (*atg*) samotného genu *sigE* (nepublikovaná data).

### 2.3.1.5. Sigma faktor $\sigma^H$

Alternativní ECF sigma faktor SigH se účastní buněčné odpovědi bakterie na tepelný stres a hraje velmi důležitou roli v regulaci exprese genů při mnoha dalších

stresových situacích. Jeho gen *sigH* byl nalezen v genomu všech osekvenovaných kmenů *C. glutamicum* a jeho nukleotidová sekvence je zároveň vysoce konservovaná (62-88%) jak u korynebakterií, tak u mykobakterií (Patek & Nesvera, 2011). Zásadní role SigH v buněčné odpovědi na stresové podněty je dána jeho účastí v regulaci transkripce ostatních sigma faktorů například SigB a SigM (Ehira *et al.*, 2009b; Nakunst *et al.*, 2007). SigH se rovněž účastní regulace transkripce genů kódujících transkripční regulátory, jakými jsou SufR (Ehira *et al.*, 2009b), ClgR (Engels *et al.*, 2004), HspR (Barreiro *et al.*, 2004), WhcE (Kim *et al.*, 2005b) a WhcA (Choi *et al.*, 2008). Vzhledem k prominentní roli SigH při regulaci transkripce genů kódujících ostatní alternativní sigma faktory a mnoha regulačních genů, je považován za globální regulátor řídící transkripci celé sítě genů účastnících se regulace transkripce za stresových podmínek, převážně pak za tepelného a oxidativního stresu a různých stresů indukovaných růstovou fází (Brinkrolf *et al.*, 2010). Zcela zásadní roli hraje sigma faktor SigH v regulaci transkripce za podmínek tepelného šoku u genů kódujících ATP-dependentní Clp proteasy a molekulární *chaperony*, což bylo dokázáno a následně publikováno v mnoha studiích (Barreiro *et al.*, 2009; Engels *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005a). V práci (Kim *et al.*, 2005a) byla sestrojena mutanta *C. glutamicum* HL1032 s delecí v genu *sigH*. V experimentu rostly buňky za teploty 30 °C na minimálním médiu a v momentu přechodu do stacionární fáze byly inkubovány ve 30 °C a 38 °C. Bylo zjištěno, že při teplotě 38 °C byl růst mutanty v genu *sigH* silně inhibován (Kim *et al.*, 2005a). U tohoto kmene byla rovněž zjištěna zvýšená citlivost na tepelný a oxidativní stres způsobený účinkem diamidu. V jiné práci (Engels *et al.*, 2004) bylo zjištěno, že sigma faktor SigH aktivuje iniciaci transkripce genů *clpC*, *clpP1P2*, *clgR* a to za podmínek zvýšené teploty. Clp jsou ATP-dependentní proteasy degradující v buňce nefunkční proteiny vzniklé za stresových podmínek. Stresová odpověď na oxidativní stres, která je řízená sigma faktorem SigH, zahrnuje zvýšenou expresi genů *trxB* a *trxC* (thioredoxinový systém) a genu *mtr* (mykothiolový systém). Tyto geny společně reprezentují hlavní antioxidantní systém nalezený u všech zástupců aktinobakterií (den Hengst & Buttner, 2008).

Geny, které jsou regulovány sigma faktorem SigH byly identifikovány na základě srovnávacích analýz metodou *DNA Microarray hybridization* u divokého a mutantního kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  s delecí v genu *sigH* a to za podmínek tepelného stresu (Ehira *et al.*, 2009b). Ze získaných výsledků byl odvozen SigH regulon, do kterého patří geny, jejichž míra transkripce vzrostla vlivem tepelného šoku u divokého kmene, zatímco u mutantního bylo patrné výrazné snížení (Ehira *et al.*, 2009a). Další metoda, pomocí které byly identifikovány geny se SigH-dependentním promotorem, využila kmene *C.*

*glutamicum* s posílenou expresí *sigH*. U tohoto kmene naopak došlo ke zvýšení exprese SigH-dependentních genů. Na základě doposud dosažených výsledků bylo zmapováno 45 genů řadících se do 29 transkripčních jednotek, které byly zařazeny do SigH regulonu, tedy skupiny, jejíž transkripce je regulována sigma faktorem SigH (Ehira *et al.*, 2009b). Z těchto genů byly následně odvozeny konvenční sekvence SigH dependentních promotorových oblastí -35 respektive -10 (5'-G/TGGAA-N17-20-T/CGTT-3'), které jsou vysoce konservované a zároveň jsou jejich konvenční sekvence totožné se SigH respektive SigR dependentními promotory *M. tuberculosis* a *S. coelicolor* (Paget *et al.*, 2001; Paget, 2015; Raman *et al.*, 2004).

Aktivita homologního sigma faktoru SigH u *M. tuberculosis* a *S. coelicolor* je řízena anti-sigma faktorem RshA, respektive RsrA. (Kang *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2003). RshA je malý protein bohatý na cystein, fungující jako stresový či redoxní senzor, který se za normálních podmínek váže na sigma faktor SigH, a tím mu znemožňuje vazbu na RNA polymerasu a tedy transkripci SigH dependentních genů. Jakmile je buňka vystavena tepelnému či oxidativnímu stresu, dojde k uvolnění komplexu SigH-RshA a volný sigma faktor se může navázat k RNA polymerase a aktivovat transkripci stresových genů (Song *et al.*, 2003). Homologní gen *rshA* je u *C. glutamicum* lokalizován 2 báze za stop kodonem genu *sigH* ve směru transkripce a je zároveň přítomen v chromosomech všech osekvenovaných kmenů *C. glutamicum* (Patek & Nesvera, 2011).

Samotná exprese genu *sigH* byla monitorována pomocí reportérového systému promotor-*cat* (gen kódující chloramfenikolacetyltransferasu). Během této analýzy bylo zjištěno, že aktivita sigma faktoru SigH stoupá vlivem účinků tepelného a oxidativního stresu a během stacionární fáze růstu (Kim *et al.*, 2005b). Zároveň bylo zjištěno, že protein SigH je důležitý pro expresi vlastního genu nacházejícího se v operonu s jeho potenciálním anti-sigma faktorem RshA (Kim *et al.*, 2005a).

Bylo zjištěno, že SigH se rovněž podílí na regulaci funkce promotoru lokalizovaného v mezigenové oblasti genů *cg1934-cg1935*. Produktem transkripce je nekódující *antisense* RNA (ArnA), která se specificky váže do oblasti genu *cg1935*, který kóduje transkripční regulátor rodiny GntR (Zemanova *et al.*, 2008).

V nedávné publikaci (Toyoda *et al.*, 2015) bylo spojením metod chromatinové imunoprecipitace a *DNA Microarray* a současně použitím delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA* (delece v genu pro anti-sigma faktor) identifikováno celkem 88 genů, které měly zvýšenou aktivitu právě v tomto delečním kmeni (Toyoda *et al.*, 2015). Tento výsledek značí, že v nepřítomnosti funkčního proteinu RshA je patrná zvýšená

exprese určitých genů, které tak potenciálně obsahují SigH-dependentní promotor (Toyoda *et al.*, 2015).

Sigma faktor SigH se rovněž podílí na expresi F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPasového operonu *atpBEFHAGDC*, jež probíhá z monocistronního (1,2 kb) a polycistronního (7,5 kb) transkriptu při optimálním pH 9,0. Transkripce probíhá ze SigH-dependentního promotoru genu *atpB* (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2012). U delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  bylo zjištěno, že optimální pH pro expresi tohoto operonu je 7,0, tedy nižší než u divokého kmene a SigH se tedy zřejmě podílí na regulaci genové exprese výše zmíněného operonu při různém pH (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2012).

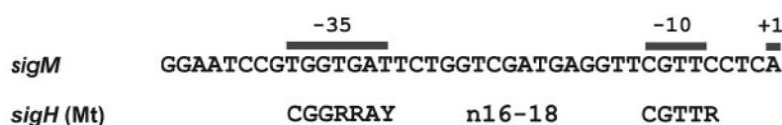
Bylo zjištěno, že SigH se rovněž podílí na regulaci exprese genu *mpx* kódující mykothiol peroxidasu, která se účastní buněčné odpovědi na oxidativní stres (Wang *et al.*, 2016) a na expresi genu pro mykothiol S-konjugativní amidasu. (Si *et al.*, 2015)

### 2.3.1.6. Sigma faktor $\sigma^M$

Alternativní ECF sigma faktor SigM se účastní buněčné odpovědi na oxidativní a tepelný stres (Nakunst *et al.*, 2007). Gen *sigM* kódující příslušný sigma faktor je lokalizován na chromosomu v jednom shluku společně s geny *trxB* (kóduje thioredoxin), *trxC* (kóduje thioredoxinreduktasu) a *cwlM* (kóduje hydrolasu buněčné stěny). Připravený mutantní kmen s delecí v genu *sigM* (*C. glutamicum*  $\Delta sigM$ ) vykazoval zvýšenou citlivost k diamidovému, tepelnému a chladovému stresu. U divokého kmene *C. glutamicum* se za výše popsaných stresových podmínek zvýšila exprese genu *sigM*, což vedlo k předpokladu, že sigma faktor SigM je přímo zapojen v regulaci transkripce právě za těchto stresových podmínek. Experimenty s použitím metody *DNA Microarray* odhalily celkem 23 genů se zvýšenou intenzitou exprese u divokého kmene v porovnání s mutantním. Kromě genů *trxB*, *trxC* a *cwlM* byly takto identifikovány například geny kódující proteiny účastníci se reakce na tepelný stres (*groES*, *groEL*, *clpB*, *grpE*, *dnaJ*, *hspR*), proteiny odpovědné pro vazbu, formování a opravu Fe-S skupin obsažených v proteinech (tzv. *suf* operon), jehož součástí je gen *sufR* (transkripční regulátor operonu *suf*). U čtyř genů (*trxB*, *trxC*, *trxB1* a *sufR*) byly na základě znalosti transkripčních počátků stanoveny jejich promotorové oblasti 5'-GGAAT-N18-19-GTTG-3' pro hexamery -35 respektive -10 oddělené 18 až 19 nukleotidy (Nakunst *et al.*, 2007).

U *M. tuberculosis* je transkripce genu kódující sigma faktor SigM regulována alternativním sigma faktorem SigH (Manganelli *et al.*, 2002). Analogicky byl proto zkonstruován u *C. glutamicum* mutantní kmen s delecí v genu *sigH* (*C. glutamicum*  $\Delta sigH$ ) kódující sigma faktor SigH. V následných experimentech bylo prokázáno, že míra

transkripce genů *sigM*, *trxB*, *trxC*, *cwIM* a *trxB1* vzrostla po diamidovém stresu u divokého kmene *C. glutamicum*, kdežto u mutantního *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  byla naopak nižší v porovnání s divokým (Nakunst *et al.*, 2007). U kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  bylo zjištěno, že exprese genů *sigM*, *trxB*, *trxC*, *cwIM* a *trxB1* byla po diamidovém stresu nižší v porovnání s divokým kmenem. Je zajímavé, že za těchto stresových podmínek naopak došlo ke zvýšení množství mRNA u genu *sigH*. V jiné práci byl použit kmen *C. glutamicum* s nadprodukcí sigma faktoru SigH a současně s chromosomální delecí v genu *sigH*. Bylo zjištěno, že geny *trxB*, *trxC*, *cwIM* a *trxB1* obsahují SigH-dependentní promotor, který je aktivován oxidativním stresem (Ehira *et al.*, 2009b). Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že sigma faktor SigH se účastní transkripce genu *sigM*, který pak následně aktivuje transkripci celého operonu, tedy geny *sigM*, *trxB*, *trxC* a *cwIM* (Nakunst *et al.*, 2007). Samotná promotorová oblast s transkripčním počátkem genu *sigM* byla určena metodou 5' RACE. Na Obr. 2.2 je znázorněn transkripční počátek nacházející se na pozici adeninu a od něho byly následně odvozeny sekvence promotorových oblastí -35 (5'-TGGTGAT-3') a -10 (5'-CGTTC-3'). Obě promotorové oblasti si jsou ve svých sekvencích podobné s promotorovými motivy rozeznávané sigma faktorem SigH u *M. tuberculosis*, složené z CGGRRAY (pro oblast -35) a motivem CGTTR (pro oblast -10) (Kaushal *et al.*, 2002; Nakunst *et al.*, 2007). Z výše uvedeného lze předpokládat, že sigma faktor SigM je součástí regulační kaskády, kde jeho transkripce je pravděpodobně regulována hlavním stresovým sigma faktorem SigH, aby pak následně mohl regulovat transkripci genů *trxB*, *trxC*, *cwIM* a pravděpodobně i transkripci svého vlastního genu *sigM* (Nakunst *et al.*, 2007). Vzhledem ke skutečnosti, že oba sigma faktory SigH a SigM rozeznávají v promotorových sekvencích takřka identické motivy, nelze vyloučit, že oba regulují transkripci stejných genů za různých specifických podmínek. Transkripční regulace pomocí dvou sigma faktorů byla prokázána například u *M. tuberculosis*, kde je gen *sigB* za podmínek tepelného stresu přepisován z promotoru rozeznávaného sigma faktorem SigH, kdežto za podmínek povrchového stresu je transkripce regulována sigma faktorem SigE a to ze stejného promotoru (Patek & Nesvera, 2011). Další příklad dvojí regulace transkripce stejného promotoru byla publikována i u *B. subtilis* (Qiu & Helmann, 2001) a u *E. coli* (Olvera *et al.*, 2009).



**Obr. 2.2 – Promotorová oblast genu *sigM* u *C. glutamicum*.** (Nakunst *et al.*, 2007)

## 2.4. Regulace transkripce genů za stresových podmínek u *C. glutamicum*

*C. glutamicum* je nepatogenní, nesporulující, gram-pozitivní půdní bakterie, která se řadí mezi aktinomycety s vysokým podílem G+C párů v genomu (Stackebrandt *et al.*, 1997; Ventura *et al.*, 2006). Tento mikroorganismus je hojně využíván v průmyslové produkci aminokyselin (Gopinath *et al.*; Hermann, 2003; Wendisch *et al.*, 2006). Možnost použití molekulárně genetických technik a snadná kultivace učinily z druhu *C. glutamicum* modelový organismus pro studium dalších významných aktinomycet jako jsou např. lidské patogeny *Corynebacterium diphtheriae* a *Mycobacterium tuberculosis* (Khamis *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 1995; Wendisch *et al.*, 2006). Osekvenování genomu *C. glutamicum* o velikosti 3,3 Mb před více než deseti lety (Ikeda & Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003) odhalilo více než 3 000 anotovaných sekvencí kódujících proteiny. Na základě znalosti genomu se začala intenzivně studovat regulace transkripce u *C. glutamicum* (Brinkrolf *et al.*, 2007), která odhalila 97 transkripčních regulátorů a více než 1 432 regulačních interakcí (Pauling *et al.*, 2012). Mezi tyto regulátory patří i 7 sigma faktorů regulujících transkripci rozpoznáváním specifických promotorových oblastí v závislosti na signálech z vnějšího prostředí (Patek & Nesvera, 2011). Použitím nové technologie pro studium exprese na genomové úrovni, sekvenováním cDNA (RNAseq) bylo u *C. glutamicum* identifikováno více než 2000 transkripčních počátků, a tedy funkčních promotorů (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Touto metodou bylo rovněž identifikováno více než 800 genů (Erill *et al.*, 2007), kódujících malé RNA (sRNA) (Mentz *et al.*, 2013).

### 2.4.1. SOS buněčná odpověď

Fyzikálně-chemické vlivy mohou v buňkách vyvolat různé modifikace DNA či její přímé poškození. Stresová situace nastartuje řadu procesů známých jako SOS buněčná odpověď, která byla prvně popsána u *E. coli* (Walker, 1984). Hlavní složkou SOS opravného mechanismu jsou transkripční regulátor LexA a protein RecA (Butala *et al.*, 2009), který se uplatňuje i v procesech rekombinace DNA. Za normálních podmínek působí LexA jako represor transkripce genů kódujících proteiny důležité pro reparační mechanismy DNA. Všechny tyto geny obsahují tzv. SOS box, 16-20 nukleotidovou sekvenci bazí, která funguje jako operátor. Protein LexA se za normálních podmínek váže ve formě dimeru do SOS boxů, čímž znemožňuje vazbu RNAP do příslušné promotorové oblasti a blokuje tím tak transkripci genů účastnících se SOS odpovědi (Butala *et al.*, 2009). Za podmínek poškození DNA se v buňce objeví její jednořetězcové zlomy (ssDNA), na které se váže protein RecA (Sassanfar & Roberts, 1990). Takto aktivovaný

RecA\* následně iniciuje rozštěpení dimeru proteinu LexA a tím jeho deaktivaci. Dojde tak k uvolnění operátoru a zahájení transkripce SOS genů (Jochmann *et al.*, 2009).

Protein LexA je negativním transkripčním regulátorem SOS buněčné odpovědi. Homolog jeho genu *lexA* byl identifikován téměř u všech doposud osekvenovaných bakterií (Erill *et al.*, 2007) včetně mykobakterií (Gamulin *et al.*, 2004; Rand *et al.*, 2003). U *C. glutamicum* byl LexA regulon podrobně prostudován v práci Jochmann, *et al.* (Jochmann *et al.*, 2009). Kombinací metod *DNA Microarray* (porovnání genové exprese divokého kmene *C. glutamicum* a kmene nesoucího mutaci v genu *lexA*), gelové zpomalovací analýzy EMSA (prokázání vazby proteinu LexA na vybrané DNA úseky v prostředí *in-vitro*) a bioinformačními analýzami bylo prokázáno, že LexA se váže do 40 SOS boxů. Konvenční sekvence SOS boxu se skládá z 16 nukleotidů o sekvenci TcGAAnnTGTtCGA (m = A nebo C). Bioinformační analýzou za použití anotace genomu *C. glutamicum* ATCC 13032 (Davis *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2005), bylo stanoveno, že LexA regulon se zřejmě skládá ze 48 SOS genů uspořádaných ve 36 transkripčních jednotkách (Jackman & Pelczynska, 1986).

Konvenční sekvence SOS boxu u *C. glutamicum* je velmi podobná DNA vazebné sekvenci proteinu LexA u *M. tuberculosis*, jenž se skládá z 16 nukleotidů o sekvenci TCGAACnnnnGTTCGA (Jochmann *et al.*, 2009).

#### 2.4.2. Regulace transkripce při odpovědi na oxidativní stres

Jak již bylo zmíněno, hlavní úlohu v buněčné odpovědi na oxidativní stres hraje pravděpodobně alternativní sigma faktor SigM (Nakunst *et al.*, 2007). U *C. glutamicum* se předpokládá, že existují další dva transkripční regulátory účastníci se buněčné odpovědi na oxidativní stres. Tyto proteiny se řadí do WhiB rodiny a jsou kódovány geny *whcE* a *whcA* (Kim *et al.*, 2005b). Oba proteiny mají své homology u *M. tuberculosis*, kde byla podrobně popsána jejich funkce.

Funkce proteinu WhcE, homolog proteinu WhiB1 u *M. tuberculosis*, byla objasněna pomocí připraveného kmene s mutací v genu *whcE*. Ten byl citlivější na účinky tepelného a oxidativního stresu. U tohoto kmene byla rovněž naměřena nižší aktivita thioredoxinové reductasy TrxB za stresových podmínek. Tyto výsledky signalizují, že exprese genu *trxB* je regulována proteinem WhcE (Kim *et al.*, 2005b). Na základě homologie s *M. tuberculosis* se usuzuje, že WhcE funguje jako transkripční aktivátor, který pozitivně reguluje expresi genu *trxB* při přechodu bakteriální kultury z exponenciální do stacionární fáze růstu, kdy při tomto přechodu dochází ke zpomalení metabolismu, což vede ke změnám v redoxním systému (Schroder & Tauch, 2010)

Samotná exprese genu *whcE* nebyla zjištěna u mutantního kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH$ , z čehož lze usoudit, že sigma faktor SigH se účastní regulace exprese genu *whcE* (Kim *et al.*, 2005b).

Druhý protein WhcA patřící do rodiny WhiB, který je homologní s proteinem WhiB4 u *M. tuberculosis*, má patrně negativní roli při regulaci transkripce v buněčné odpovědi řízené sigma faktorem SigH (Choi *et al.*, 2008). Gen *whcA* je konstitutivně exprimován během růstu, který není ovlivněn oxidativním stresem. Kmen s posílenou expresí genu *whcA* vykazuje zpomalení růstu a současně vyšší citlivost k oxidativním činidlům diamidu a menadionu v porovnání s divokým kmenem *C. glutamicum*. Zároveň v tomto kmeni byla naměřena nižší aktivita thiooxidinové reductasy TrxB, kdežto v mutantním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta whcA$  byla aktivita genu *trxB* vyšší navzdory přítomnosti či absence stresového faktoru diamidu. Stejně tak byla hladina transkriptu genu *trxB* nižší u kmene s posílenou expresí genu *whcA*. Z těchto získaných dat lze usoudit, že regulátor WhcA negativně působí na expresi genu *trxB* ať už přímo či nepřímo. Na základě dalších experimentů byly identifikovány celkem čtyři geny, jejichž exprese je pravděpodobně ovlivněna proteinem WhcA. Tyto geny kódují NADH oxidasu (*cg0404*), alkohol dehydrogenasu (*cg2342*), chinon reductasu (*cg3405*) a cystein desulfurasu (*cg1214*). Tyto geny nebyly exprimovány za podmínek oxidativního stresu u kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH$ , naopak tomu však bylo u mutantního kmene  $\Delta whcA$ , kde exprese těchto genů probíhala konstitutivně během růstu. Oba geny, *whcA* a *whcE*, jsou zahrnuty do buněčné odpovědi na oxidativní stres, kterou reguluje sigma faktor SigH. Zároveň se oba geny účastní regulace transkripce genu *trxB*, avšak jejich funkce jsou odlišné (Choi *et al.*, 2008).

#### 2.4.3. Regulace transkripce při odpovědi na tepelný šok u *C. glutamicum*

Rychlá změna teploty vnějšího prostředí vede k fyzikálním a chemickým změnám bakteriálních proteinů a membrán. Tyto změny vedou k nastartování buněčné stresové odpovědi, která zahrnuje expresi genů, jejichž produkty tvoří regulační síť ovlivňující transkripci mnoha dalších genů. Tyto geny kódují vysoce konservované proteiny chránící buňku před negativními účinky vysokých teplot (Ventura *et al.*, 2006). Na regulaci transkripce genů buněčné odpovědi na tepelný šok se podílí alternativní sigma faktory rozpoznávající specifické promotorové oblasti genů tepelného šoku a transkripční regulátory, které se vážou do promotorových oblastí těchto genů a fungují jako aktivátory či represory transkripce (Ventura *et al.*, 2006). Důležitou součástí ochrany proti vnějším stresovým faktorům je syntéza proteinů tepelného šoku (HSPs), které zvyšují odolnost



buňky hlavně proti účinkům vysokých teplot, salinitě a vlivu těžkých kovů (Craig, 1985). Proteiny tepelného šoku lze rozdělit na buněčné *chaperony* a proteasy. Molekulární *chaperony* se vyznačují ATPasovou aktivitou a jsou aktivovány při buněčném stresu, kdy po přijetí signálu hydrolyzují ATP na ADP a fosfát, což vede k jejich aktivaci. *Chaperony* mají i své pomocníky, tzv. *co-chaperony*, které jim v tom pomáhají. Mezi molekulární *chaperony* patří GroE a DnaK a mezi ATP-dependentní proteasy se řadí Lon, HslVU, ClpP, DegP a FtsH (Craig, 1985; Nakahigashi *et al.*, 1999; Yura & Nakahigashi, 1999).

Na základě dat ze sekvenace genomu *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003), byla objevena jedna kopie genu *dnaK*, který se nachází v operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, kde geny *grpE* a *dnaJ* kódují *co-chaperony* a *hspR* regulační protein. Transkripční analýzou byl zahrnutý *Northern blot analysis* a *primer-extension* byly u genu *dnaK* identifikovány dva transkripční počátky (TSP) a od nich odvozeny patřičné promotorové oblasti -10 a -35 (Barreiro *et al.*, 2004).

Při odpovědi na tepelný stres se u *C. glutamicum* uplatňuje též katalytický komplex GroE skládající se z chaperonů GroEL a GroES. Tento komplex katalyzuje uspořádání proteinů a umožňuje jejich degradaci pomocí proteasy (Rosen & Ron, 2002). Během normálních fyziologických podmínek je exprese tohoto komplexu blokována regulačním proteinem HrcA, který se specificky váže na operátorové sekvence v promotorové oblasti (Barreiro *et al.*, 2004), které se označují jako CIRCE (*Control Inverted Repeat of Chaperone Expression*) (Buttner *et al.*, 2001).

## 2.5. Nové metody pro studium transkripce

### 2.5.1. *In-vitro* transkripční systém a jeho význam pro studium exprese genů

Regulace exprese genů na úrovni transkripce patří mezi základní regulační mechanismy *in-vivo* u všech (mikro)organismů. Pro poznání mechanismů interakce RNAP holoenzymu s promotory byl u řady bakterií, např. u *E. coli* (Artsimovitch & Henkin, 2009), *B. subtilis* (Krasny & Gourse, 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Fujita *et al.*, 2000) a *M. tuberculosis* (Jacques *et al.*, 2006), vyvinut systém transkripce *in-vitro*. Transkripční *in-vitro* systém se skládá z jádra RNA polymerasy (z podjednotek  $2\alpha, \beta, \beta', \omega$ ), sigma faktoru a templátové DNA nesoucí promotorovou oblast, která je rozeznávaná příslušným sigma faktorem. Tento systém umožňuje přímé testování funkce regulátorů, které svou vazbou na templátovou DNA či sigma faktor ovlivňují průběh iniciace transkripce. Studium protein-DNA či protein-protein vazebných interakcí ovlivňujících genovou expresi bývá v systému *in-vivo* velmi obtížné. Transkripční *in-vitro* systém umožňuje detailní analýzu transkripce na všech jejích úrovních (iniciace,

elongace, terminace). Dále umožňuje prokázání specifity sigma faktorů k jednotlivým promotorům a může být nápomocen k jednoznačnému určení konvenčních promotorových motivů rozpoznávaných jednotlivými sigma faktory. Další využití může nalézt ve studiu regulačních faktorů na úrovni interakce DNA-DNA či vzájemnou proteinovou interakcí, například sigma faktor – anti-sigma faktor.

*In-vitro* transkripční systém proto představuje silný nástroj pro studium regulace transkripce u bakterií.

### 2.5.2. Mapování transkriptomu na genomové úrovni

Od samého počátku molekulární biologie se vědci snaží porozumět mechanismům a kontrolním procesům transkripce buněčné DNA (Seshasayee *et al.*, 2006). Změny v množství transkriptu jsou úzce spjaty se změnami na úrovni buněčné translace, což vede k produkci nových proteinů, což se projeví v buněčném složení buňky. Největší zájem je proto upřen na získání podrobných informací o složení buněčného transkriptomu, tedy složení a množství úplné knihovny prepisovaných sekvencí molekul DNA v celé buňce (Hinton *et al.*, 2004). Tato knihovna obvykle obsahuje molekuly kódujících RNA (mRNA) a nekódujících RNA zahrnující rRNA, tRNA, strukturní RNA, regulační RNA a mnohé další. Mezi všemi druhy molekul RNA je nutné rozlišit *de-novo* syntetizovanou RNA (primární transkript) a post-transkripčně modifikovanou RNA tak zvaný sekundární transkript (van Vliet, 2009). Metoda, která umožnila sledování dynamiky syntézy mRNA *in-vivo* se označuje *DNA Microarray*. Tato technika byla primárně vyvinuta pro rostlinné patogeny na konci devadesátých let a našla své uplatnění k monitorování exprese všech genů v organismu (Hinton *et al.*, 2004). U *C. glutamicum* byla technika *DNA Microarray* poprvé použita pro analýzu buněčného metabolismu (Huser *et al.*, 2003; Ishige *et al.*, 2003) a od té doby je rutinně užívána pro charakterizaci transkriptomu *C. glutamicum* za nejrůznějších podmínek (Follmann *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2016; Nishimura *et al.*, 2011; Sawada *et al.*, 2012; Veit *et al.*, 2009).

Technologie zvaná *High-throughput sequencing*, neboli RNA-seq, je nová metoda umožňující mapování transkriptu v celogenomovém měřítku (t Hoen *et al.*, 2008). Lze ji využít pro identifikaci transkripčních počátků daného transkriptu a od nich odvodit příslušné promotorové oblasti. Tímto způsobem lze mapovat promotorové oblasti a jejich transkripční počátky na genomové úrovni z hlediska kvantitativního, ale i kvalitativního, protože získáme i relativní množství primárního transkriptu mRNA s přesně ohraničeným 5' koncem, tedy počátkem transkriptu (Shendure *et al.*, 2005). *High throughput* sekvenace cDNA knihoven má veliký potenciál pro studium transkriptomu v buňce na

nukleotidové úrovni. Zároveň podá podrobnější informace o průběhu množství mRNA v mikrobiální buňce (Deutscher, 2003). Tato metoda umožnila u *C. glutamicum* identifikovat více než 2000 transkripčních startů a určit promotorové sekvence příslušných genů (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013) a dále více než 800 genů kódujících malé RNA (Mentz *et al.*, 2013).

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Materiál

##### 3.1.1. Bakteriální kmeny

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  – *supE44*, *lacU169*, ( $\phi$ 80*lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*), kmen umožňující  $\alpha$ -komplementaci  $\beta$ -galaktosidasy (Hanahan, 1983)

*Escherichia coli* BL21 – expresní kmen (Studier & Moffatt, 1986)

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 – typový kmen

*Corynebacterium glutamicum* rpoC-H8 – 8 histidinová kotva na C-konci proteinu před stop kodonem (Holatko *et al.*, 2012)

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigH – deleční kmen zkonstruovaný v diplomové práci (Šilar, 2007) z výchozího kmene *C. glutamicum* ATCC 13032

Deleční kmeny zkonstruované z výchozího kmene *C. glutamicum* RES 167 na pracovišti Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, Bielefeld, SRN:

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigB – kmen s chromosomální delecí v genu *sigB*

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigD – kmen s chromosomální delecí v genu *sigD*

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigE – kmen s chromosomální delecí v genu *sigE*

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigH – kmen s chromosomální delecí v genu *sigH*

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigM – kmen s chromosomální delecí v genu *sigM*

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigEM – kmen s dvojitou chromosomální delecí v genech *sigE* a *sigM*

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigHM – kmen s dvojitou chromosomální delecí v genech *sigH* a *sigM*

*Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ sigED – kmen s dvojitou chromosomální delecí v genech *sigE* a *sigD*

*Corynebacterium glutamicum* *ArshA* – kmen s chromosomální delecí v genu *rshA*

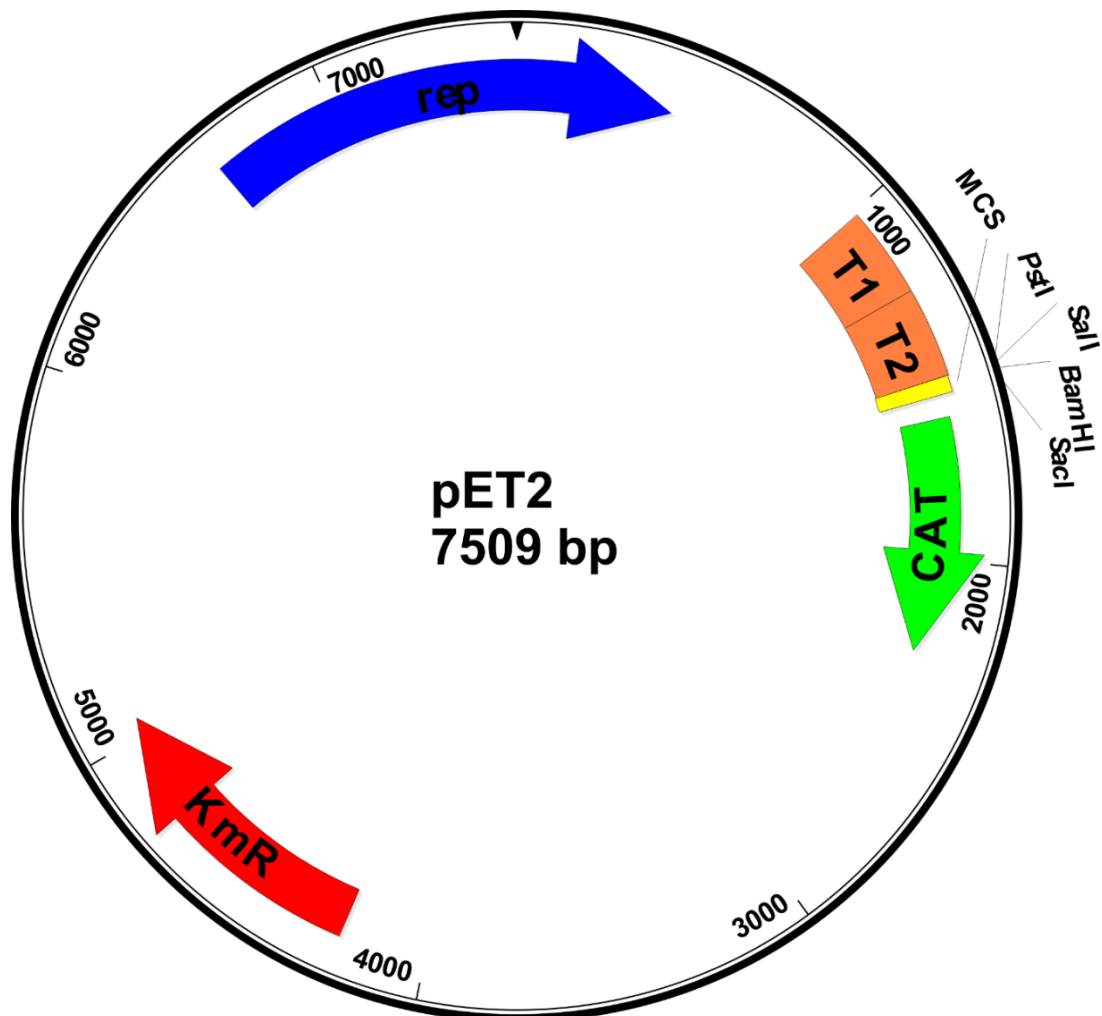
## 3.1.2. Plazmidy

Tabulka 3.1 Seznam použitých plazmidových vektorů

Plazmid	Charakteristika	Zdroj
pET2	Km <sup>R</sup> , podvojný ( <i>E. coli</i> , <i>C. glutamicum</i> ) promoter-probe vektor, reportérový gen <i>cat</i>	(Vašicová <i>et al.</i> , 1998)
pEPR1	Km <sup>R</sup> , podvojný ( <i>E. coli</i> , <i>C. glutamicum</i> ) promoter-probe vektor, reportérový gen <i>gfpuv</i>	(Knoppova <i>et al.</i> , 2007)
pRLG770	Ap <sup>R</sup> , <i>E. coli</i> vektor, <i>rrnB</i> terminátor, <i>in-vitro</i> transkripční systém	(Krasny & Gourse, 2004)
pET-22b(+)	Ap <sup>R</sup> , <i>E. coli</i> expresní vektor, promotor T7, His tag kódující sekvence na C- konci transkriptu, izolace proteinů	Novagen
pJET2.1	Ap <sup>R</sup> , promotor T7, klonování PCR produktů s tupými konci	Fermentas
pKSAC45	Km <sup>R</sup> , vektor pro alelické výměny, vektor se v <i>E. coli</i> replikuje, v <i>C. glutamicum</i> se uchovává pouze po integraci do chromosomu, pozitivní selekce sekundárních rekombinantů pomocí levansacharasy kódované genem <i>sacB</i> (Jager <i>et al.</i> , 1992)	(Holatko <i>et al.</i> , 2008)

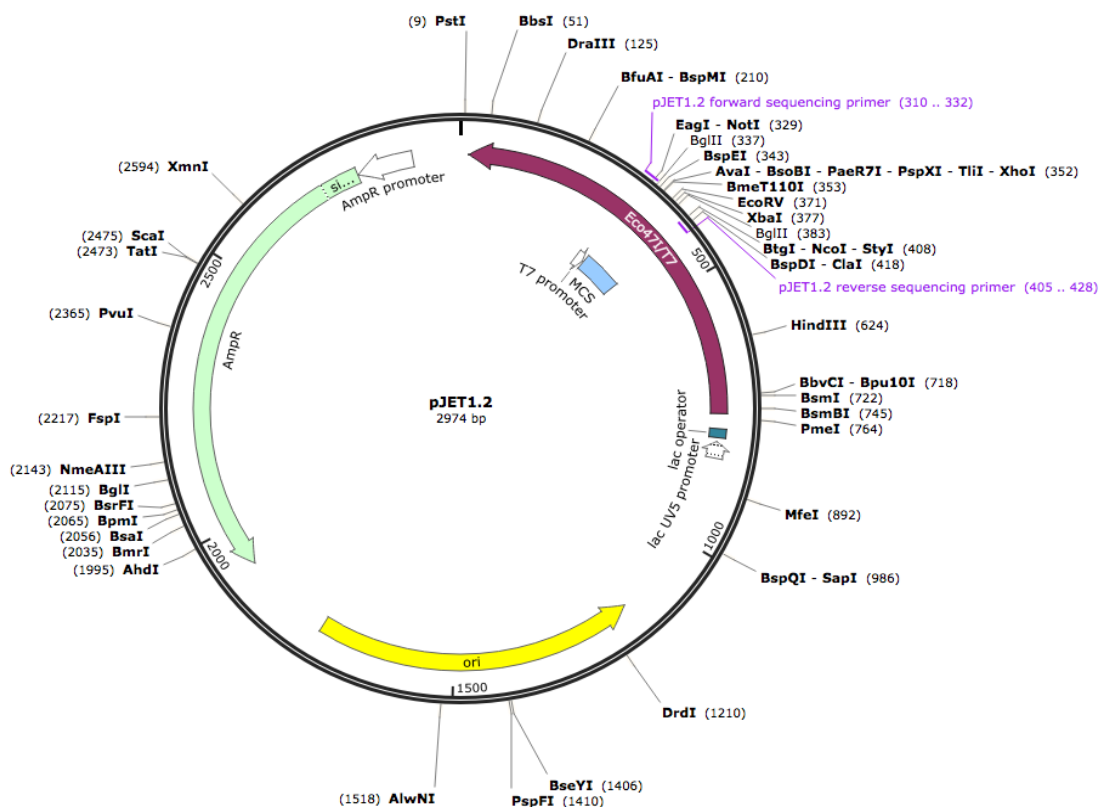
Km<sup>R</sup>- rezistence ke kanamycinu

Amp<sup>R</sup>- rezistence k ampicilinu



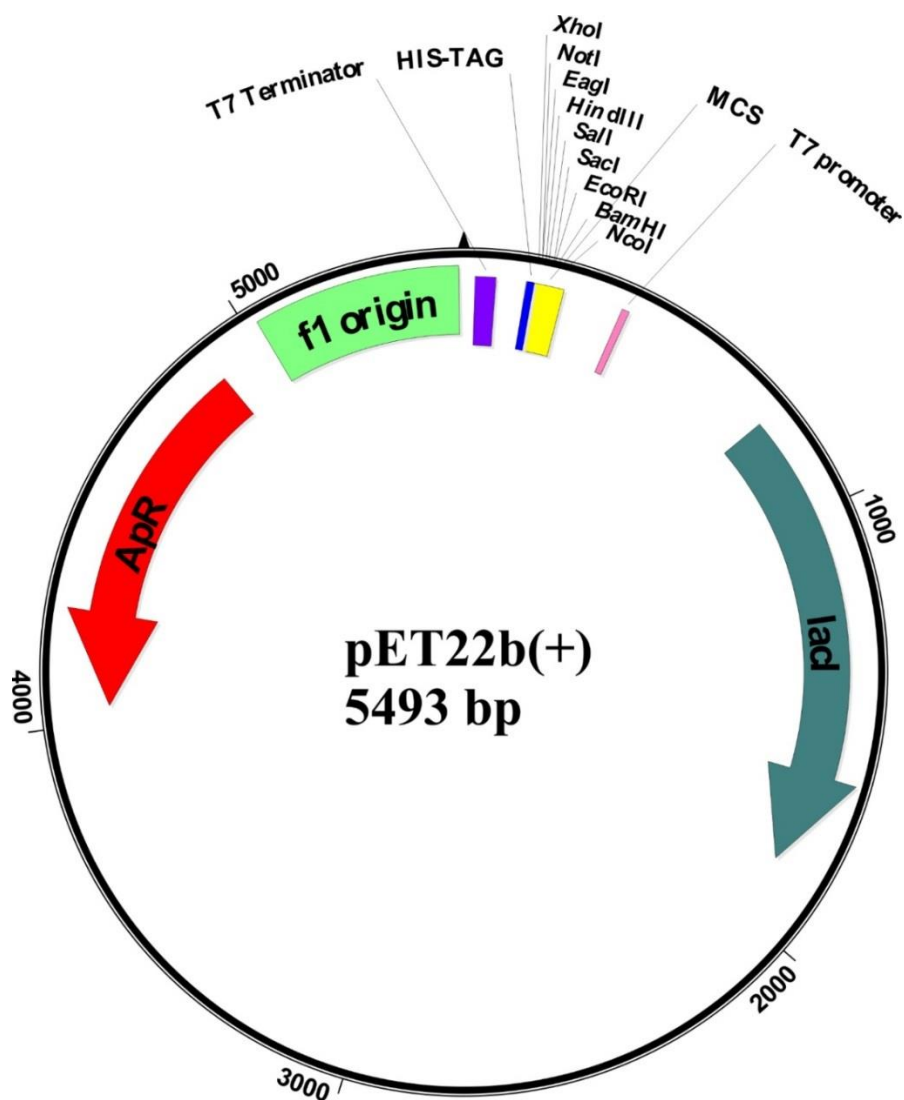
Obr. 3.1 - Genetická a restrikční mapa *promoter-probe* vektoru pET2

Podvojný replikativní vektor pET2 (Vašicová *et al.*, 1998) lze použít pro měření síly promotorů v *E. coli* a v *C. glutamicum*. Vektor pET2 nese pět unikátních klonovacích míst (*Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI, *Kpn*I, *Sac*I). T1 = transkripční terminátor genu *leuB* z *C. glutamicum*, T2 = transkripční terminátory *rrnBT*<sub>1</sub>T<sub>2</sub> z *E. coli*, MCS = mnohočetné klonovací místo, *cat* = bezpromotorový gen *cat* (reportérový gen) kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu, která determinuje rezistenci k chloramfenikolu, Km<sup>R</sup> = gen pro rezistenci ke kanamycinu.



**Obr. 3.2 - Genetická a restrikční mapa vektoru pJET1.2**

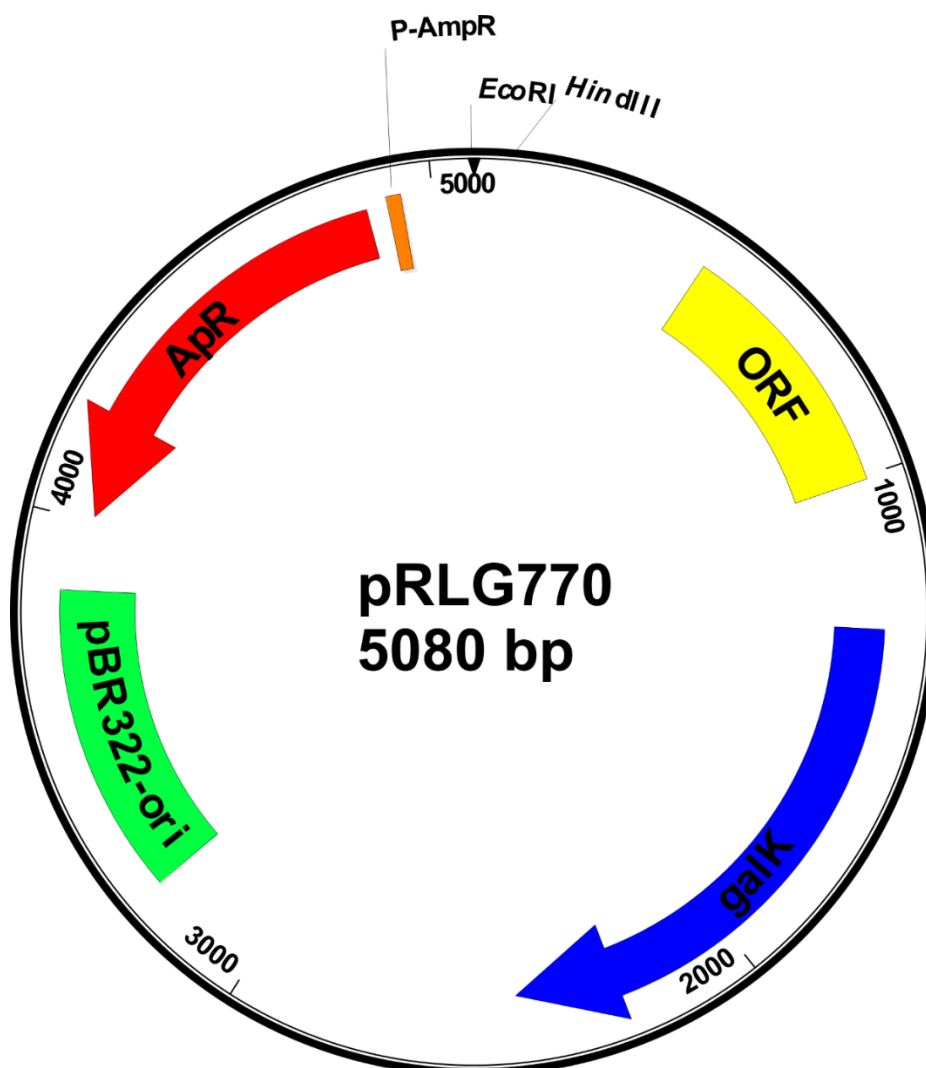
Vektor pJET1.2 lze použít pro klonování PCR produktů s tupými 3' a 5' konci cílového fragmentu. Amp<sup>R</sup> = gen pro rezistenci k ampicilinu, MCS = mnohočetné klonovací místo. Bližší podrobnosti v návodu výrobce (Fermentas).



**Obr. 3.3 - Genetická a restrikční mapa vektoru pET22b(+)**

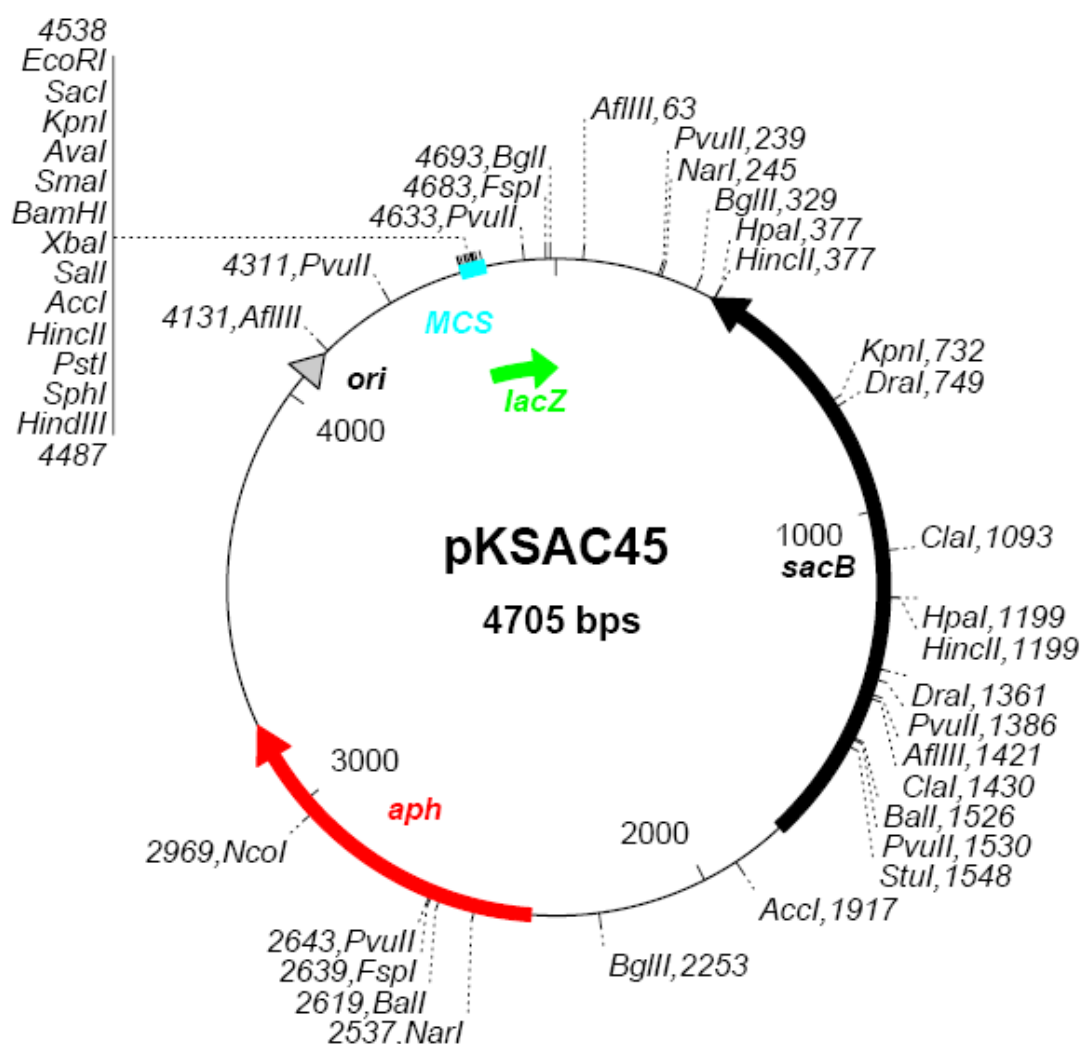
Expresní vektor pET22b(+) je vhodný pro klonování genů a následnou nadprodukční izolaci proteinů. Na vektoru se nachází 9 unikátních klonovacích míst rozeznávaných restrikčními endonukleázami: *XhoI*, *NotI*, *EagI*, *HindIII*, *SalI*, *SacI*, *EcoRI*, *BamHI* a *NcoI*. Vektor je charakteristický přítomností IPTG inducibilního promotoru T7 a histidinové kotvy pro izolaci proteinů. Kotva se připojuje na C-konec izolovaného proteinu ve formě 6 histidinů. Ap<sup>R</sup> = gen pro rezistenci k ampicilinu





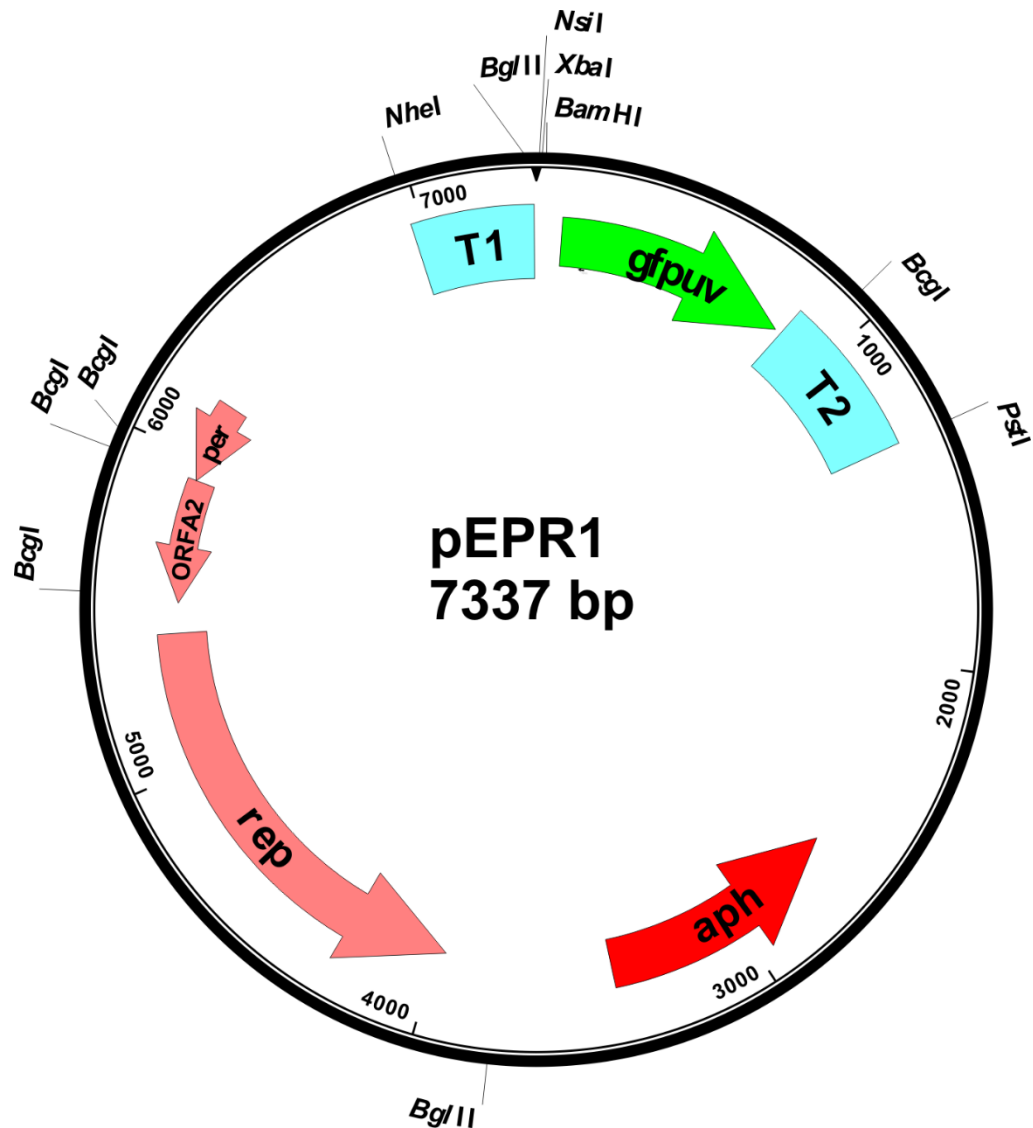
Obr. 3.4 - Genetická a restrikční mapa vektoru pRLG770

Vektor pRLG770 (Krasny & Gourse, 2004) nese 2 unikátní klonovací místa rozeznávané restrikčními endonukleázami *HindIII* a *EcoRI* pro naklonování specifických promotorových oblastí. Výsledný konstrukt je následně linearizován a použit jako templát pro experimenty *in-vitro* transkripce. Ap<sup>R</sup> = gen pro rezistenci k ampicilinu



**Obr. 3.5 - Genetická a restriční mapa vektoru pKSAC45 pro alelické výměny**

Vektor replikující se pouze v buňkách *E. coli*. V *C. glutamicum* se může udržet pomocí inserce do chromosomu homologní rekombinací mezi fragmentem DNA, klonovaným ve vektoru, a úsekem chromosomové DNA. *aph* = determinanta rezistence vůči kanamycinu ( $Km^R$ ); *sacB* = gen kódující levansacharasu, enzym umožňující pozitivní selekci sekundárních rekombinantů (Jager *et al.*, 1992); *lacZ* = gen je součástí laktosového operonu, selekce  $\alpha$ -komplementací; MCS = mnohočetné klonovací místo; *ori* = počátek replikace plazmidu v *E. coli* (Holatko *et al.*, 2008).



**Obr. 3.6 - Genetická a restrikční mapa *promoter-probe* vektoru pEPR1**

Podvojný aplikativní vektor pEPR1, který lze použít pro sledování transkripční aktivity promotorů v *C. glutamicum*. T1, T2 = sekvence kódující transkripční terminátory *T-TrpE* respektive *T-rrnB*; *aph* = determinanta rezistence vůči kanamycinu ( $Km^R$ ); *gfpuv* = reportérový gen kódující fluorescenční protein GFP (*green fluorescent protein*); *rep* = kódující iniciační protein Rep; *per* = gen zajišťující segregační stabilitu plazmidu (Knoppova *et al.*, 2007).

Tabulka 3.2 Seznam plazmidů zkonstruovaných v této práci

Konstrukt	Charakteristika konstruktů <i>C. glutamicum</i>
pET2-PsigH <sup>1</sup>	Promotorová oblast genu <i>sigH</i> , aktivita CAT, PEX
pET2-P1P2P3sigH <sup>2</sup>	Promotory P1, P2 a P3 genu <i>sigH</i> , aktivita CAT
pET2-P4sigH <sup>3</sup>	Promotor P4 genu <i>sigH</i> , aktivita CAT, PEX
pET2-PrshA <sup>4</sup>	Promotor genu <i>rshA</i> , aktivita CAT, PEX
pET2-PdnaJ2 <sup>5</sup>	Promotorová oblast genu <i>dnaJ2</i> , aktivita CAT, PEX
pET2-PuvrA <sup>6</sup>	Promotorová oblast genu <i>uvrA</i> , aktivita CAT, PEX
pET2-PuvrD <sup>7</sup>	Promotorová oblast genu <i>uvrD</i> , aktivita CAT
pET2-PsigM <sup>8</sup>	Promotorová oblast genu <i>sigM</i> , aktivita CAT
pET2-Pddi <sup>9</sup>	Promotorová oblast genu <i>cg2661</i> , aktivita CAT
pET2-Pzdo <sup>10</sup>	Promotorová oblast genu <i>cg3405</i> , aktivita CAT
pRLG770-P4sigH <sup>11</sup>	Promotor P4 genu <i>sigH</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pRLG770-P2dnaJ2 <sup>12</sup>	Promotor P2 genu <i>dnaJ2</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pRLG770-P3dnaJ2 <sup>13</sup>	Promotor P3 genu <i>dnaJ2</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pRLG770-PtrxB <sup>14</sup>	Promotor genu <i>trxB</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pRLG770-PtrxB1 <sup>15</sup>	Promotor genu <i>trxB1</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pRLG770-P2dnaK <sup>16</sup>	Promotor P2 genu <i>dnaK</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pRLG770-Pper <sup>17</sup>	Promotor genu <i>per</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pRLG770-P1clgR <sup>18</sup>	Promotor P1 genu <i>clgR</i> , <i>in-vitro</i> transkripce
pET-22b(+)-sigA <sup>19</sup>	Gen sigma faktoru SigA, <i>in-vitro</i> transkripce
pET-22b(+)-sigB <sup>20</sup>	Gen sigma faktoru SigB, <i>in-vitro</i> transkripce
pET-22b(+)-sigD <sup>21</sup>	Gen sigma faktoru SigD, <i>in-vitro</i> transkripce
pET-22b(+)-sigE <sup>22</sup>	Gen sigma faktoru SigE, <i>in-vitro</i> transkripce
pET-22b(+)-sigH <sup>23</sup>	Gen sigma faktoru SigH, <i>in-vitro</i> transkripce
pET-22b(+)-sigM <sup>24</sup>	Gen sigma faktoru SigM, <i>in-vitro</i> transkripce
pJET-P4sigH <sup>25</sup>	Promotor genu <i>sigH</i> , 5' RACE
pEPR-P1clgR <sup>26</sup>	Promotor P1 genu <i>clgR</i> , aktivita GFP
pEPR-P2dnaK <sup>27</sup>	Promotor P2 genu <i>dnaK</i> , aktivita GFP
pEPR-P2dnaJ2 <sup>28</sup>	Promotor P2 genu <i>dnaJ2</i> , aktivita GFP

<sup>1</sup> - Konstrukt sestavený v diplomové práci (Šilar, 2007)

<sup>1-28</sup> - Použité primery pro sestavení konstruktů jsou uvedeny v Tab. 3.3

P - označení pro promotor daného genu

P1P2P3 - Fragment DNA nesoucí celkem 3 promotorové oblasti (P1, P2 a P3)

## 3.1.3. Oligonukleotidy (primery) pro PCR

Tabulka 3.3 Seznam použitých primerů vyrobených firmou VBC-GENOMICS

Primer	Sekvence oligonukleotidu (5' - 3')	Zdroj
PSIGHHP2 <sup>1,3</sup>	GAACTTTTTCTGCAGCTTTAGTGAT	Diplomová práce (Šilar, 2007)
PSIGHDB2 <sup>1,2</sup>	CAACGCAGATCTATCGACTGTGCC	Diplomová práce (Šilar, 2007)
PSIGHHP3 <sup>2,3</sup>	TACTGCAGTGTTTTCCCCTTAGATTTGAAG	Tato práce
PSIGHDB3 <sup>3</sup>	CCAGATCTCCACCACAGCAGTTAGTACA	Tato práce
PRSHAHP <sup>4</sup>	AACTGCAGATGCAATGAATCAACTC	Tato práce
PRSHADB <sup>4</sup>	GAGGATCCAGGGCAGCCACAATC	Tato práce
PDNAJF <sup>5</sup>	ACCTGCAGTTACGGCTCCCAG	Tato práce
PDNAJR <sup>5</sup>	GCCTTTTGGATCCCTGATTCGGTT	Tato práce
PUVRAF <sup>6</sup>	ATCTGCAGCATCAATGAGTA	Tato práce
PUVRAR <sup>6</sup>	TCGGATCCTTTTAGGTTATGTTACAG	Tato práce
PHELF <sup>7</sup>	GTCTGCAGAAGAAGCTGAAGGGC	Tato práce
PHELR <sup>7</sup>	CTGGATCCGGCTAATTGCTGTGGTGA	Tato práce
PSIGMF <sup>8</sup>	ATCTGCAGATTCAACGACGCCTCA	Tato práce
PSIGMR <sup>8</sup>	CCGGATCCAAACTGTTTGACGAGT	Tato práce
PDDIF <sup>9</sup>	TGCTGCAGGGAGATCAATAAAG	Tato práce
PDDIR <sup>9</sup>	TGGTATGGATCCAGAAGGTTACT	Tato práce
PZDOF <sup>10</sup>	GCCAAAACCTGCAGCCACGATAACT	Tato práce
PZDOR <sup>10</sup>	GGACGTAGAATGGATCCCCGAAAGTGTT	Tato práce
SIGHTSP4F <sup>11</sup>	CTAGATAGAACATTGTTTCCCCCTAGATTT GAAGTGGTACATATGTTCTAACTGGTAC	Tato práce
SIGHTSP4R <sup>11</sup>	CAGTTAGAACATATGTACCACTTCAAATC TAGGGGGAAACAATGTTCTAT	Tato práce
PDNAJ2TSP2P770F <sup>12</sup>	AATTCCTCGGGAACAATTTCTAAGGTGTC CGCCGTTGCTAAGTATGTTGGTCGTGTA	Tato práce
PDNAJ2TSP2P770R <sup>12</sup>	AGCTTACACGACCAACATACTTAGCAACG GCGGACACCTTAGAAATTGTTCCCGAGG	Tato práce
PDNAJ2TSP3P770F <sup>13</sup>	AATTCGCAGCGCACTGGGCGGATTGGGGG TGGTTGGCCCCACCTATATGGACTAA	Tato práce
PDNAJ2TSP3P770R <sup>13</sup>	AGCTTTAGTCCATATAGGTGGGGCCAACC ACCCCAATCCGCCAGTGCGCTGCG	Tato práce

TRXBP770F <sup>14</sup>	<b>AATTCTGATGGAAGTTTTTCAAAGTGTCT</b> GACGTTGAAAACGGTGAGTTCACAAA	Tato práce
TRXBP770F <sup>14</sup>	<b>AGCTTTTGTGAACCTACCGTTTTCAACGTC</b> AGACACTTTGAAAACTTCCATCAG	Tato práce
TRXB1P770F <sup>15</sup>	<b>AATTCAGAAAATCCTTGGCCGGGAATAAC</b> TACAGTCCGCTGAAAGTTGGTCTATATAT AGACCA	Tato práce
TRXB1P770R <sup>15</sup>	<b>AGCTTGGTCTATATATAGACCAACTTTCA</b> GCGGACTGTAGTTATCCCGGCCAAGGAT TTTCTG	Tato práce
PDNAKP2F <sup>16</sup>	<b>GGGAATTCCGGATTTTTTCTCAAG</b>	Tato práce
PDNAKP2R <sup>16</sup>	<b>TCAAGCTTACATATATAGCAAC</b>	Tato práce
PPERP770F <sup>17</sup>	<b>AGAATTCTCGCAGGTTTTTCGC</b>	Tato práce
PPERP770R <sup>17</sup>	<b>GTGAAGCTTATGACACCATTATA</b>	Tato práce
PCLGRP2MUTF <sup>18</sup>	<b>GTGACCATATTGAGTCGCAGTGACTCAAG</b> TTTCCAGGAAAACCGGGAACAAATTTTAG GGAAAGGGAGTTGAACCTAACGAG	Laboratoř
PCLGRP2MUTR <sup>18</sup>	<b>GATCCTCGTTAGGTTCAACTCCCTTCCCT</b> AAAATTTGTTCCCGGTTTTCTGGAAACT TGAGTCACTGCGACTCAATATGGTCACTG CA	Laboratoř
SIGAPETF <sup>19</sup>	<b>CGTGGAGAGCCATATGGTAGAAAACAA</b>	Tato práce
SIGAPET22TR <sup>19</sup>	<b>CCCGACTGGGCTCGAGGTCCAGGTAGT</b>	Tato práce
SIGBPEFLF <sup>20</sup>	<b>CCACATATGACAGCACCGTC</b>	Laboratoř
SIGBPEFLTR <sup>20</sup>	<b>TCACAGTCGACCTGGGCGTACTCAC</b>	Laboratoř
SIGDPEFLF <sup>21</sup>	<b>AGCATATGGCTGATACTGAGC</b>	Laboratoř
SIGDPEFLR <sup>21</sup>	<b>AGCTCGAGCTTGTTCTCCTGCTGC</b>	Laboratoř
SIGHPETF <sup>22</sup>	<b>TTCGAAAGGGGCCATATGGCTGAAAA</b>	Tato práce
SIGHPET22TR <sup>22</sup>	<b>CGGTTGAGATTCGTCACTCGAGTGCCTCC</b>	Tato práce
SIGHPEFLF <sup>23</sup>	<b>TTCGAAAGGGGCCATATGGCTGAAAA</b>	Tato práce
SIGHPET22TR <sup>23</sup>	<b>CGGTTGAGATTCGTCACTCGAGTGCCTCC</b>	Tato práce
SIGMPEFLF <sup>24</sup>	<b>TGACCGTACTGCCTAAAAAC</b>	Laboratoř
SIGMPET22TR <sup>24</sup>	<b>TTCTCGAGGTTGCTTTCGCACTGTAT</b>	Laboratoř
CM6 RACE <sup>25</sup>	<b>CCTGAAAATCTCGTCGAAGCTCGG</b>	Tato práce
P4SIGHRACE <sup>25</sup>	<b>GTGTCCACCACATCAGTTAGAACATATGT</b>	Tato práce

PCLGRP2MUTF <sup>26</sup>	<b>GTGACCATATTGAGTCGCAGTGA</b> <b>CTCAAGTTCCAGGAAAACCGGGA</b> <b>ACAAATTTTAGGGAAAGGGAGTTG</b> <b>AACCTAACGAG</b>	Tato práce
PCLGRP2MUTR <sup>26</sup>	<b>GATCCTCGTTAGGTTCAACTCC</b> <b>CTTTCCCTAAAATTTGTTCCCG</b> <b>GTTTTCTCTGGAAACTTG</b> <b>AGTCACTGCGACTCAATATGG</b> <b>TCACTGCA</b>	Tato práce
DNAKF <sup>27</sup>	<b>TTCTGCAGCTGTGCTCACAAA</b> <b>AATCA</b>	Tato práce
PDNAKP2R2 <sup>27</sup>	<b>AAGGATCCATATATAGCAAC</b> <b>GGTAAAT</b>	Tato práce
DNAJ2TSP2P770F <sup>28</sup>	<b>AATTCCTCGGGAACAATTTCT</b> <b>AAGGTGTCCGCCGTTGCTAAG</b> <b>TATGTTGGTCGTGTA</b>	Tato práce
DNAJ2TSP2P770R <sup>28</sup>	<b>AGCTTACACGACCAACATACT</b> <b>TAGCAACGGCGGACACCTTAG</b> <b>AAATTGTTCCCGAGG</b>	Tato práce
30F	<b>CCACCTGACGTCTAAGAAACC</b>	Laboratoř
1620R	<b>GCGCTACGGCGTTTCACTTC</b>	Laboratoř
1620R2	<b>CTCCGATCATAAGCTGTCAAAC</b>	Laboratoř
30F2	<b>ATTGTCTCATGAGCGGATAC</b>	Laboratoř
CM4*	<b>GAAAATCTCGTCGAAGCTCG</b>	Laboratoř
CM1	<b>GGTGGTATATCCAGTGATCGG</b> <b>TGGTATATCCAGTGATT</b>	Laboratoř

restrikční místa, **záměny bází**

\* - primer značený fluoresceinem

<sup>1</sup> - Primer sestrojený v diplomové práci (Šilar, 2007)

<sup>2-28</sup> - Primery odpovídající konstruktům v Tab. 3.2

**3.1.4. Kultivační půdy**

Luria-Bertani (LB) médium

na 1000 ml:

Trypton (Oxoid)	10 g
Kvasničný extrakt (Oxoid)	5 g
NaCl (Lachema)	10 g

Doplněno destilovanou vodou a sterilizováno autoklávováním  
pH 6,8 (neupravováno)

**Půda 2xYT**

na 1000 ml:

Trypton (Oxoid)	16 g
Kvasničný extrakt (Oxoid)	10 g
NaCl (Lachema)	5 g

Doplněno destilovanou vodou, pH 6,8 (neupravováno)

**Pevné půdy**

Do 1000 ml půdy LB nebo 2xYT bylo přidáno 15 g agarů.

**Minimální médium CGXII**

Močovina (Aristar)	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Lachema)	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Serva)	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lachema)	1 g
MOPS (kys. morfolinpropansulfonová, Serva)	42 g
CaCl <sub>2</sub> , 1 g/100 ml vody	1 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Lachema) 25 g/100 ml vody	1 ml
<u>Roztok stopových prvků (na 100 ml):</u>	1 ml
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Lachema)	1 g
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Lachema)	1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Lachema)	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> (Lachema)	0,02 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (Lachema)	0,002 g

Doplněno do 100 ml destilovanou vodou.

pH 7,0 (upraveno 2M KOH, Lachema)



Doplněno do 900 ml destilovanou vodou a sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci přidáno:

Glukosa 40% (Lachema)	100 ml
Biotin (Serva) 0,2 mg/ml	1 ml
Kyselina protokatechová (Sigma) 3 mg/10 ml 1M NaOH (Lachema)	100 µl

### **Půda SOB**

Trypton (Oxoid)	20 g
Kvasničný extrakt (Oxoid)	5 g
NaCl (Lachema)	0,6 g
KCl (Lachema)	0,2 g

Doplněno destilovanou vodou do 1000 ml

Po sterilizaci autoklávováním přidáno:

1M MgCl <sub>2</sub> (Lachema) + 1M MgSO <sub>4</sub> (Lachema)	10 ml
pH 6,8 (neupravováno)	

### **Půda SOC**

Do 1000 ml půdy SOB přidáno 7 ml 50% glukosy.

### **3.1.5. Komerční soupravy**

High Pure RNA Isolation Kit	Roche, SRN
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, SRN
GenElute	Sigma-Aldrich, USA
RNeasy kit	Qiagen, SRN
SYBR Green Supermix	Bio-Rad, Kanada
WIZARD-Midiprep	Promega, USA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, SRN
NucleoBond® Xtra Midi / Midi Plus	Macherey-Nagel, SRN
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher Scientific, USA
5′/3′ RACE Kit, 2nd Generation	Roche, SRN
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas (ThermoFisher Scientific), USA
Dialyzační kazeta	ThermoFisher Scientific, USA
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris gel	ThermoFisher Scientific, USA

### 3.1.6. Použitý software

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

**DNASTAR LaserGene 99** (<http://www.dnastar.com>): analýza a zpracování nukleotidových sekvencí

**BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>): porovnání nukleotidových sekvencí se sekvencemi z různých organismů.

**GenBank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>): vyhledávání sekvencí známých genů a genomů.

**EndNote X2** (<http://www.endnote.com>): databáze literárních pramenů.

**KODAK 1D Image Analysis Software**: snímání a editace elektroforegramů DNA.

**MS Office 2013** (<http://office.microsoft.com>): tvorba textů, tabulek a grafů.

**Adobe Design Standard CS3** (<http://www.adobe.com>): zpracování grafických dokumentů, tvorba posterů.

**CorelDraw X4** (<http://www.coreldraw.com>): analýza a zpracování promotorových oblastí, experimentů *primer-extension*, tvorba posterů.

**Fragment Manager**: vizualizace experimentů *primer-extension* ze sekvenátoru A.L.F.

### 3.1.7. Přístroje

Automatický autokláv MAC-235EX	Sanyo, USA
Elektroporátor Bio-Rad Gene Pulser	Bio-Rad, USA
Laboratorní váhy L610D	Sartorius, SRN
Odstředivka EBA 12R	Hettich, SRN
Odstředivka Sigma 112	Sigma, SRN
Odstředivka Hettich Mikro 200R	DJB Labcare, Velká Británie
Odstředivka 5804R	Eppendorf, USA
SpeedVac	Thermo Scientific, USA
pH-metr PHM210	Radiometer Analytical S.A., Francie
Spektrofotometr Biomate 5	Thermospectronics, UK
PCR cycler Techne Progene	Barloworld Scientific, UK
PCR cycler T-Gradient	Biometra, SRN
Dezintegrátor FastPrep FP120	Thermo Electron Comporation, USA
Dezintegrátor FastPrep®-96	MP Biomedicals, USA
Spektrofotometr Nanodrop	Thermo Scientific, USA
Laboratorní mixér	Velp Scientifica, Itálie

Ultrazvukový sonikátor UP200S	Hielscher, SRN
XCELL SURELOCK™ MINI CELL	ThermoFisher Scientific, USA
Molecular Imager FX	Bio-Rad, USA
BAS-IP SR 2025 Imaging Plate	Fujifilm, Japonsko
Saphire2 spectrophotometer	Tecan, USA

### **3.2. Metody**

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

##### Materiál:

- půdy LB, 2xYT, Minimální médium CGXII
- antibiotikum (kanamycin sulfát, ampicilin) (Sigma)

##### Postup:

Buňky *E. coli* byly kultivovány v kultivačních baňkách (o objemu 500 ml) obsahujících 50 ml média LB nebo na miskách s pevnou půdou LB při teplotě 37 °C. Buňky *C. glutamicum* byly kultivovány v kultivačních baňkách (o objemu 500 ml) obsahujících 50 ml média 2xYT nebo 50 ml minimálního média CGXII nebo na miskách s pevnou půdou 2xYT při teplotě 30 °C. Pro selekci kmenů nesoucích plazmidy s rezistencí vůči kanamycinu byl do kultivačního média přidán kanamycin o konečné koncentraci 10 µg/ml nebo 30 µg/ml. Pro kultivaci v tekutém médiu byla použita rotační třepačka.

#### **3.2.2. Izolace nukleových kyselin**

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

##### Materiál:

- Pufr GET - 50mM glukosa, 10mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma), 25mM Tris-HCl (Sigma), pH 8
- Pufr TE - 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8
- 1% SDS (Serva) v 0,2M NaOH (Lachema)
- 3M octan draselný (Merck), pH 4,8 (upraveno k. octovou)
- Isopropanol
- 5M LiCl (Sigma) v 50mM Tris-HCl, pH 7,5
- Ribonukleasa A (RNasa) (Serva)

Objemy do 2 ml byly stáčeny v mikrozkušavce Eppendorf ve stolní mikrocentrifuze Hettich EBA 12R (20260×g, 4 °C), objemy nad 2 ml ve zkumavce v centrifuze 5804R (6300×g, 4 °C).

#### Postup:

Buněčná kultura byla kultivována v 50 ml půdy LB s příslušným antibiotikem přes noc (~16 h) při 37 °C za stálého třepání (200 rpm). Narostlá buněčná kultura byla stočena (10 min, 4 °C), supernatant odstraněn a sediment resuspendován v 5 ml ledového pufru GET. Následovala inkubace v ledu (5 min). Poté bylo přidáno 10 ml čerstvě připraveného 1% roztoku SDS v 0,2M NaOH a suspenze byla promíchána rychlým převrácením zkumavky (4x). Po 10 minutové inkubaci v ledu bylo přidáno 7,5 ml 3M octanu draselného, suspenze byla promíchána (pomalé převrácení zkumavky, 16x), inkubována v ledu (10 min) a centrifugována (20 min, 4 °C). V případě zákalu supernatantu po centrifugaci, následovalo přelití přes sterilní gázu do nové zkumavky a centrifugace se opakovala. Plazmidová DNA byla ze supernatantu srážena přidávkem 13,5 ml isopropanolu (0,6x objem roztoku) po dobu 10 min při laboratorní teplotě, následně centrifugována (20 min, laboratorní teplota). Supernatant byl velmi pečlivě odstraněn a sediment vysušen a rozpuštěn přidávkem 2 ml sterilní vody. Následovalo vysrážení přítomné RNA přidávkem 2 ml roztoku LiCl (15 min, v ledu) a centrifugací (10 min, 4 °C). RNA se vysrážela ve zkumavce a supernatant obsahující DNA byl opatrně přelit do nové sterilní zkumavky, do které bylo přidáno 10 ml 96% etanolu. DNA se srážela po dobu 20 min při teplotě -20 °C. Následovala centrifugace (10 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a vysušený pelet obsahující DNA byl resuspendován ve 400 µl pufru TE obsahujícím RNasu (150 µg.ml<sup>-1</sup>), přenesen do mikrozkušavky a inkubován 30 min při 37 °C pro odstranění zbytkové RNA. DNA byla přečištěna extrakcí fenolem a chloroformem a srážena etanolem (800 µl 96% etanolu po dobu 10 min, -20 °C). Následovala centrifugace (10 min, 4 °C) a rozpuštění sedimentu DNA v 50 µl sterilní vody.

Alternativně byla pro izolaci plazmidové DNA použita komerční souprava *WIZARD-Midiprep* nebo *NucleoBond® Xtra Midi / Midi Plus*. Pracovní postup je určen výrobcí.

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

Bakteriální kultura narostlá na misce obsahující pevnou půdu LB s obsahem příslušného antibiotika byla převedena pomocí mikrobiologické kličky do mikrozkušavky

a resuspendována ve 100  $\mu$ l pufru GET na laboratorním mixeru Vortex. Po inkubaci v ledu (5 min) bylo přidáno 200  $\mu$ l čerstvě připraveného 1% roztoku SDS v 0,2M NaOH. Obsah mikrozkušky byl promíchán okamžitým převrácením (4x) a inkubován v ledu (5 min). Následně bylo přidáno 150  $\mu$ l ledového 3M octanu draselného. Obsah mikrozkušky byl opatrně promíchán pomalým převrácením (8x), inkubován v ledu dalších 15 min. Následovala centrifugace (5 min, 4 °C). Supernatant (s obsahem plazmidové DNA) byl přelit do nové mikrozkušky a srážen přídatkem 850  $\mu$ l 96% etanolu (po dobu 10 min, -20 °C). Po této době byl vzorek centrifugován (10 min, 4 °C). Získaný pelet byl vysušen a sediment (obsahující DNA) rozpuštěn ve 20  $\mu$ l roztoku RNasy (40  $\mu$ g/ml) a inkubován 30 min při 37 °C, případně rozpuštěn ve 20  $\mu$ l sterilní vody a přenesen do sterilní mikrozkušky.

### **3.2.2.3. Izolace plazmidové DNA z *C. glutamicum***

Izolace je založena na alkalické lyzi, které předcházela degradace buněčné stěny lysozymem.

#### Materiál:

- SET- 300mM sacharóza, 10mM Na<sub>2</sub>EDTA, 25mM Tris-HCl, upraveno pH 8.0
- SET + L – SET + lysozym (5 mg/ml)
- 3M octan draselný (Merck), pH 4,9 (upraveno kyselinou octovou)
- 10% SDS (Serva) v 0,2M NaOH (Lachema)
- isopropanol, 96% etanol, 70% etanol
- RNáza (40 mg/ml)

#### Postup:

Čerstvě narostlé kolonie bakteriální kultury na miskách 2xYT s přídatkem příslušného antibiotika byly resuspendovány ve 150  $\mu$ l pufru TE s přídatkem lysozymu na laboratorním mixeru Vortex. Následovala inkubace ve 37 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci bylo přidáno 400  $\mu$ l čerstvě připraveného 1% roztoku SDS v 0,2M NaOH. Vzorek byl promíchán rychlým převrácením mikrozkušky (8x) a inkubována v ledu (5 min). Následně bylo přidáno 300  $\mu$ l 3M roztoku octanu draselného, obsah mikrozkušky byl opatrně promíchán pomalým převrácením (8x) a ponechán v ledu (15 min). Po centrifugaci (5 min, 4 °C) byl supernatant obsahující plazmidovou DNA přelit do nové mikrozkušky a DNA byla srážena přidáním 900  $\mu$ l isopropanolu a ponechána při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Následovala centrifugace (3 min,

pokožová teplota). Získaný pelet byl vysušen a rozpuštěn ve 100 µl pufru TE. Plazmidová DNA byla vysrážena 200 µl 96% etanolu (po dobu 10 min, -20 °C) a rozpuštěna ve 20 µl RNasy (40 µg/ml) a inkubována 30 min při 37 °C, případně rozpuštěna ve 20 µl sterilní vody a přenesena do sterilní mikroskopické kumavky.

### **3.2.3. Transformace**

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

##### Materiál:

- Roztok RF1: 100mM RbCl (Sigma)

80mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O (Lachema)

10mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Lachema)

30mM octan draselný (Sigma)

15% (v/v) glycerol (Lachema)

pH 6,8 (upraveno 0,2N k. octovou)

sterilizováno filtrací

- Roztok RF2: 10mM MOPS (Biomol)

10mM RbCl

70mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

15% (v/v) glycerol

pH 6,8 (upraveno 0,2N NaOH)

sterilizováno filtrací

- Půda SOB a SOC: složení viz Materiál a Metody (3.1.4. Kultivační půdy)

Při izolaci byla použita centrifuga 5804R (6300×g, 4 °C).

##### Příprava kompetentních buněk:

1-2 kolonie čerstvé bakteriální kultury *E. coli* narostlé na misce obsahující pevné médium LB bylo zaočkováno do 250 ml kultivační baňky obsahující 50 ml čerstvé půdy SOB. Kultura byla kultivována za stálého třepání při 37 °C do dosažení optické density OD<sub>600</sub> = 0,2. Následně byla buněčná kultura zchlazena v ledu po dobu 15 min a centrifugována (10 min, 4 °C, 6300×g). Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet resuspendován v 17 ml ledového pufru RF1. Kultura byla ponechána v ledu po dobu 15 minut a znovu centrifugována (10 min, 4 °C, 6300×g). Supernatant byl odstraněn a sedimentované buňky resuspendovány ve 4 ml ledového pufru RF2 a ponechány v ledu po dobu 15 min. Připravené kompetentní buňky byly rozplněny do předchlazených

sterilních mikrozkmavek po 200  $\mu$ l a přímo použity pro transformaci nebo uchovány při  $-70$  °C pro pozdější použití. Celá příprava kompetentních buněk probíhala při teplotě  $0 - 4$  °C s použitím sterilního materiálu.

#### Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA

1-2  $\mu$ l plazmidové DNA nebo 10  $\mu$ l ligační směsi (0,1-1  $\mu$ g DNA) bylo přidáno ke 200  $\mu$ l kompetentních buněk. Vzniklá suspenze byla inkubována v ledu po dobu 30 min. Následoval tepelný šok (90 s, 42 °C) a opětovné rychlé zchlazení v ledu. K transformační směsi bylo přidáno 800  $\mu$ l čerstvé půdy SOC a suspenze byla přenesena do skleněných zkumavek a kultivována při teplotě 37 °C za stálého třepání do dobu 45 min. Následovala centrifugace transformační směsi (2 min, pokojová teplota) a opatrné odstranění supernatantu. Získaný sediment byl resuspendován v 300  $\mu$ l sterilního média LB. Buněčná suspenze byla po 100  $\mu$ l vyseta na misky obsahující půdu LB s příslušným antibiotikem.

#### **3.2.3.2. Transformace *C. glutamicum* elektroporací (Liebl *et al.*, 1989; van der Rest *et al.*, 1999)**

##### Materiál:

- Pufir GT - 8mM Tris-HCl, 10% glycerol (v/v), pH 8
- Roztok G -10% glycerol

Při izolaci byla použita centrifuga 5804R (6300 $\times$ g, 4° C) a stolní mikrocentrifuga Hettich EBA 12 R (20260 $\times$ g; 4 °C)

##### Příprava kompetentních buněk:

Na misce čerstvě narostlá buněčná kultura *C. glutamicum* byla smyta 1 ml tekuté půdy 2xYT a zaočkována do 125 ml tekuté půdy 2xYT pro dosažení  $OD_{600} = 0,10$ . Buněčná kultura byla inkubována při 30 °C za stálého třepání až do dosažení  $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ . Následně byla kultura ochlazená v ledu po dobu 15 min a centrifugována (10 min, 4 °C). Supernatant byl pečlivě odstraněn a získaný pelet promyt resuspendováním ve 25 ml ledového pufru GT. Následně byla suspenze centrifugována (10 min, 4 °C). Promývací krok v pufru GT byl ještě 2x opakován. Po promývacím kroku byl supernatant pečlivě odstraněn, buňky resuspendovány v 1 ml ledového roztoku G, suspenze převedena do mikrozkmavek a znovu centrifugována po dobu 1 minuty (4 °C). Promytí v roztoku G bylo opakováno. Po odstranění supernatantu byly buňky opět

resuspendovány v 1 ml ledového roztoku G a rozplněny po 200  $\mu$ l do sterilních a předchlazených mikrozkuvek. Připravené kompetentní buňky byly přímo použity pro transformaci elektroporací nebo uloženy v  $-70$  °C. Během přípravy kompetentních buněk byly buňky uchovávány při teplotě 0 - 4 °C a za maximálně sterilních podmínek.

#### Elektroporace plazmidové DNA

Parametry nastavené na elektroporačním přístroji (Gene-Pulser, Bio-Rad): napětí 2,5 kV, kapacitance 25  $\mu$ F, odpor 200  $\Omega$ . K připraveným kompetentním buňkám bylo přidáno 1-2  $\mu$ l plazmidové DNA (0,5-1  $\mu$ g). Transformační směs byla promíchána pomalým převrácením a ponechána v ledu po dobu 1 minuty. Následně byla transformační směs převedena do předchlazené ( $-20$  °C, 10 min) elektroporační kyvety (šířka 0,2 cm) a vystavena elektrickému pulzu trvajícím 3-5 ms. Následovalo okamžité přidání 1 ml sterilní půdy 2xYT a transformační směs byla přelita z kyvety do skleněné zkumavky. Transformované buňky byly kultivovány za stálého třepání při 30 °C po dobu 2-3 h. Po této době byly transformované buňky převedeny do sterilních mikrozkuvek a centrifugovány (2 min, pokojová teplota). Supernatant byl pečlivě odstraněn a sediment resuspendován v 300  $\mu$ l média 2xYT. 100  $\mu$ l získané suspenze bylo vyseto naisky obsahující pevnou půdu 2xYT s příslušným selekčním antibiotikem.

#### **3.2.4. Dlouhodobé uchovávání buněk v glycerolu při $-70$ °C**

##### Materiál:

- čerstvě připravené půdy LB, 2xYT
- příslušné antibiotikum
- glycerol
- zamrazovací mikrozkuvky

##### Postup:

Buněčné kultury *E. coli* nebo *C. glutamicum* byly kultivovány ve zkumavce v malém objemu média (1-5 ml) na rotační třepačce přes noc ve 30 °C. Následně bylo 850  $\mu$ l buněčné kultury převedeno do zamrazovací mikrozkuvky, ke které bylo přidáno 150  $\mu$ l glycerolu. Směs byla opatrně promíchána pipetováním a uchována v  $-70$  °C.



### **3.2.5. Manipulace s DNA**

Následující postupy jsou založeny převážně na metodách popsanych v laboratorním manuálu *Molecular Cloning* (Sambrook a Russel, 2001).

#### **3.2.5.1. Extrakce fenolem**

##### Materiál:

- Fenol pH 8 – fenol (Sigma) upravený 0,1M Tris-HCl, pH 8
- Fenol (pH 8)/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1)
- chloroform/isoamylalkohol (24:1)

##### Postup:

Centrifugace probíhala na stolní mikrocentrifuze Hettich Mikro 200R (13000x g; 2 min, pokojová teplota).

K roztoku DNA byl přidán stejný objem směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol, směs byla důkladně protřepána a centrifugována. Následně byla do nové mikrozkušavky opatrně odebrána horní vodná fáze obsahující DNA. Tato extrakce fenolem byla opakována ještě jednou. K horní vodné fázi byla přidána směs chloroform/isoamylalkohol (poměr 1:1) pro odstranění zbytků fenolu. Směs byla důkladně roztřepána a centrifugována. Horní vodná fáze s rozpuštěnou DNA byla odebrána do nové mikrozkušavky. Takto získaná DNA byla přečištěna srážením etanolem (viz níže).

#### **3.2.5.2. Srážení DNA etanolem**

##### Materiál:

- 96% etanol
- 70% etanol
- 3M octan draselný

##### Postup:

Centrifugace probíhala na stolní mikrocentrifuze Sigma 112 (13000x g; 2 min, pokojová teplota).

K roztoku obsahující DNA byl přidán 3M octan draselný (1/10 objemu) a 96% etanol (dvojnásobek objemu směsi DNA-octan draselný). Získaná směs byla uchována při - 20 °C po dobu 20 min. Po centrifugaci (20 min, 4 °C) byl odstraněn supernatant a pelet obsahující DNA byl důkladně promyt přídatkem 200 µl 70% etanolu. Suspenze byla opět centrifugována (10 min, 4 °C). Následně byl odstraněn supernatant, pelet

pečlivě vysušen s použitím sníženého tlaku a rozpuštěn podle potřeby ve sterilní vodě nebo vhodném pufru.

### **3.2.5.3. Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu**

#### Materiál:

- Pufr TAE - 40mM Tris-acetát (Sigma), 1mM EDTA, pH 8 (upraveno kyselinou octovou)
- Agarosa (Lachema)
- indikační směs - 30% glycerol, 0,25% bromfenolová modř (Serva)
- ethidiumbromid 100 µg/ml (Serva) v H<sub>2</sub>O

#### Postup:

Elektroforetická separace plazmidové a chromosomové DNA nebo jejích fragmentů byla prováděna v horizontálním agarosovém gelu v pufru TAE. Koncentrace použité agarosy (0,6 – 2%) závisela na velikosti analyzovaného vzorku DNA. Ke vzorku DNA byla před nanesením do jamek v agarosovém gelu přidána indikační směs (obvykle 2 µl) a směs doplněna sterilní vodou do celkového objemu 10 µl. Samotná elektroforéza probíhala při konstantním napětí 50-100 V po dobu 1-3 h (v závislosti na velikosti analyzované DNA). Následně byl gel přenesen do vodného roztoku ethidiumbromidu a barven po dobu 5-20 min (podle hustoty a tloušťky gelu a podle koncentrace DNA) Po obarvení byla analyzovaná DNA vizualizována UV zářením a elektroforetogram byl zdokumentován pomocí digitální kamery KODAK DC290 Zoom a softwaru KODAK 1D *Image Analysis Software*.

### **3.2.5.4. Elektroforetická analýza SDS-PAGE**

#### Materiál:

- elektroforetická souprava *XCELL SURELOCK™ MINI CELL*
- komerční souprava NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris gel
- 1x *NuPAGE® MES SDS Running Buffer*
- 3 x Pufr nanášecí: 2,4 ml 1M Tris, pH = 6,8 (upraveno HCl), 3 ml 20% (w/v) SDS, 3 ml glycerolu
- 1,6 ml 2-merkaptoetanolu, 0,006 g bromfenolové modři
- Barvicí roztok: 0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250, 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) kyselina octová
- Odbarvovací roztok: 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) kyselina octová

Postup:

Do sestavené elektroforetické soupravy byl umístěn připravený komerční gel a do sestavy byl nalit pufr (zásobní roztok je 20x koncentrovaný). Z gelu byl vyjmut hřeben a do vzniklých jamek byly nanесeny analyzované vzorky, které byly smíchány s nanášecím puffrem (20  $\mu$ l proteinového vzorku + 10  $\mu$ l nanášecího puffru). Elektroforetická aparatura byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100V. Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy zóna bromfenolové modři doputovala ke spodnímu okraji gelu. Následně byl gel vložen do barvicího roztoku a inkubován za stálého a pomalého promíchávání při laboratorní teplotě po dobu 1h. Druhý den byl gel odbarven v odbarvovacím roztoku. Proteinový standard *PeqGold Prestained Protein-Marker IV* byl použit pro určení velikosti separovaných proteinů ve vzorku.

**3.2.5.5. Izolace plazmidové DNA a jejích fragmentů z agarosového gelu**Materiál:

- Kolonky *GenElute* pro purifikaci DNA
- Komerční souprava *QIAquick® Gel Extraction Kit*

Postup:

DNA byla izolována z agarosového gelu s použitím kolonek *GenElute* případně s použitím soupravy *QIAquick® Gel Extraction Kit*. Postupováno bylo podle doporučení výrobce. Během postupu byla využita stolní mikrocetrifuga Hettich Mikro 200R. Požadovaný fragment DNA byl po elektroforetické separaci v agarosovém gelu vyříznut. Agarosový bloček byl následně rozkrájen na malé kousky, které byly vloženy do mikrozkuřavky. Následně byl přidán pufr QG v poměru 100  $\mu$ l/100 mg vzorku. Mikrozkuřavka byla vložena do termo-bloku na 10 min při teplotě 50 °C. Mikrozkuřavka byla každé 2-3 minuty otočena, aby se docílilo rozehřátí agarosy. Po této době byl přidán isopropanol v poměru 100  $\mu$ l na 100  $\mu$ l vzorku, čímž se docílilo vysrážení DNA. Směs byla přenesena do připravené kolonky, která byla volně nasazena na mikrozkuřavku předem zbavenou víčka. Následovala centrifugace (12000x g, 10 min, pokojová teplota). Následovalo promývání kolonky puffry QB a PE (dodanými výrobcí). Po promytí bylo přidáno 30-50  $\mu$ l puffru EB, kolonka byla přenesena do nové mikrozkuřavky a centrifugována. Vodná fáze přítomná v mikrozkuřavce obsahovala izolovanou DNA, která byla v následujícím kroku vysrážena etanolem.

### 3.2.5.6. Štěpení DNA restričními endonukleasami

Restriční endonukleasy použité v této práci:

- *HindIII*, *SmaI*, *MluI*, *NruI*, *BamHI* (New England BioLabs)
- *PstI* (MBI Fermentas)

Postup:

Plazmidová DNA byla štěpena restričními endo-deoxyribonukleasami v objemu 10 -100  $\mu$ l v pufru dodávaném výrobcem a za podmínek jím doporučených. Samotná doba štěpení závisela na těchto faktorech: účinnosti a stabilitě enzymu, na počtu a poloze zásahových míst pro daný enzym a na koncentraci a čistotě štěpené DNA. Plazmidová DNA byla obvykle štěpena po dobu 2x 1 hodiny. V případě produktů PCR byla doba štěpení prodloužena, jelikož účinnost některých restričních enzymů výrazně klesá, nachází-li se restriční místa na koncích lineárního fragmentu DNA. Úspěšnost štěpení DNA byla kontrolována elektroforetickou analýzou v agarosovém gelu (0,7 - 1,5%, 70 V).

### 3.2.5.7. Ligace fragmentů plazmidové DNA

Materiál:

- T4-DNA ligasa (MBI Fermentas) + reakční pufr dodaný výrobcem

Pro ligační reakci v celkovém objemu 20  $\mu$ l bylo použito obvykle 100-200 ng vektoru. Množství fragmentu DNA vkládaného do příslušného vektoru bylo stanoveno podle vzorce:

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

$m_I$  = množství insertu (ng)

$m_V$  = množství vektoru (ng)

$L_I$  = velikost insertu (kb)

$L_V$  = velikost vektoru (kb)

MR = zvolený molární poměr insert/vektor (většinou 3 : 1)

Postup:

Směs fragmentu klonované DNA a vektoru byla doplněna 2  $\mu$ l 10x koncentrovaného ligačního pufru a 1  $\mu$ l T4-DNA ligasy. Ligační směs byla následně doplněna sterilní vodou do celkového objemu 20  $\mu$ l a inkubována 14 h při 15 °C. Po této době byla ligační směs použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli*.

**3.2.5.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR) (Mullis *et al.*, 1994)**Materiál:

- Taq polymerasa (Top-Bio) + reakční pufr dodaný výrobcem (obsahující 1,5mM MgCl<sub>2</sub>) nebo *Pfx* polymerasa (GIBIO)
- dNTP 20mM (Top-Bio)

Metoda PCR (*polymerase chain reaction*) byla používána pro syntézu specifických úseků DNA nebo pro potvrzení vložených DNA fragmentů do molekul vektorů. PCR reakce obvykle proběhly podle níže uvedeného schématu v přístrojích Techne Progene nebo T-Gradient (Biometra).

Složení reakční směsi:

Složení reakční směsi je uvedeno tabulce 3.4. Celkový objem směsi byl 50  $\mu$ l nebo 100  $\mu$ l.

**Tabulka 3.4. Složení reakční směsi pro PCR**

Složka	<i>Platinum</i> <sup>®</sup> <i>Pfx</i> DNA polymerasa		<i>goTaq</i> <sup>®</sup> DNA polymerasa	
	Objem [ $\mu$ l]	Konečná koncentrace	Objem [ $\mu$ l]	Konečná koncentrace
Templátová DNA <sup>1</sup>	5 - 10 ng	5 - 10 ng	5 - 10 ng	5 - 10 ng
Pufr	5 (10x)	1x	10 (5x)	1x
MgSO <sub>4</sub>	1	1mM	-	-
10x <i>enhancer</i>	1	1x	-	-
dNTP	1	200 $\mu$ M	1	200 $\mu$ M
Primer 1	0,25	0,5 $\mu$ M	0,25	0,5 $\mu$ M
Primer 2	0,25	0,5 $\mu$ M	0,25	0,5 $\mu$ M
Taq polymerasa	0,5	25 $\mu$ U	0,5	50 $\mu$ U
Sterilní voda	Doplnit do 50/100 $\mu$ l	-	Doplnit do 50/100 $\mu$ l	-

<sup>1</sup> Plazmidová nebo chromosomová DNA. V případě *colony PCR* byla jako templát použita nepurifikovaná totální buněčná DNA - jedna klička buněčné směsi byla přenesena z misky do mikrozkušavky obsahující 50  $\mu$ l sterilní vody. Následovala inkubace

buněčné suspence při teplotě 95 °C (10 min) a zchlazení v ledu (3-5 min). Pro účel *colony-PCR* byly použity 2 µl buněčného lyzátu

**Tabulka 3.5. Program PCR reakce**

Cyklus	Krok	<i>Platinum<sup>®</sup> Pfx</i>	<i>goTaq<sup>®</sup> DNA</i>	Časový interval	Počet cyklů
		DNA polymerasa	polymerasa		
		Teplota	Teplota		
1	Denaturace	94 °C	94 °C	2 min	1
2	Denaturace	94 °C	94 °C	30 s	36 <sup>1</sup>
	Hybridizace	T <sub>m</sub> -5 °C	T <sub>m</sub> -5 °C	30 s	
	Syntéza	68 °C	72 °C	30 s - 3 min	
3	Závěrečná syntéza	68 °C	72 °C	10 min	1

<sup>1</sup> V případě *colony-PCR* byl počet cyklů snížen na 10.

### 3.2.5.9. Klonování promotorových oblastí do vektoru pRLG770 pomocí hotových oligo fragmentů

#### Příprava vektoru

##### Materiál:

- Restrikční endonukleasy *EcoRI* a *HindIII*, pufr číslo 2, 10x Taq buffer, 50mM MgSO<sub>4</sub>, T4-DNA ligasa + reakční pufr (*New England Biolabs*)

##### Složení reakční směsi:

1 µl *EcoRI* a 1 µl *HindIII*, 2 µl pufru číslo 2 (NEB), X µl vektoru (dle koncentrace), X µl vody do celkového objemu 20 µl.

##### Postup:

Plazmidová DNA byla štěpena oběma restrikčními endo-deoxyribonukleasami v celkovém objemu 20 µl v pufru dodávaném výrobcem a za podmínek jím doporučených. Štěpení probíhalo po dobu 2x 2h. Po uplynutí prvních dvou hodinách štěpení byl do reakční směsi přidán 1 µl endonukleasy *EcoRI* a *HindIII* a štěpení pokračovalo další 2h. Kontrola štěpení byla provedena elektroforézou v agarosovém gelu (1,5%) po dobu 3h při napětí 50 V.

## **Hybridizace primerů**

### Materiál:

- Primery s koncovými restrikčními místy *EcoRI* a *HindIII*

### Složení reakčních směsí:

#### Hybridizace primerů:

- 2x 5 µl primerů (o koncentraci 100 pmol)

- 10 µl 10x Taq buffer + 2,5 µl 50mM MgSO<sub>4</sub> (výsledná koncentrace je 1,25 mM)

Doplněno sterilní vodou do celkového objemu 100 µl

## **Ligace**

### Materiál:

- 2µl směsi primerů

- 50 ng vektoru

- 1 µl ligázy

- 1 µl pufr

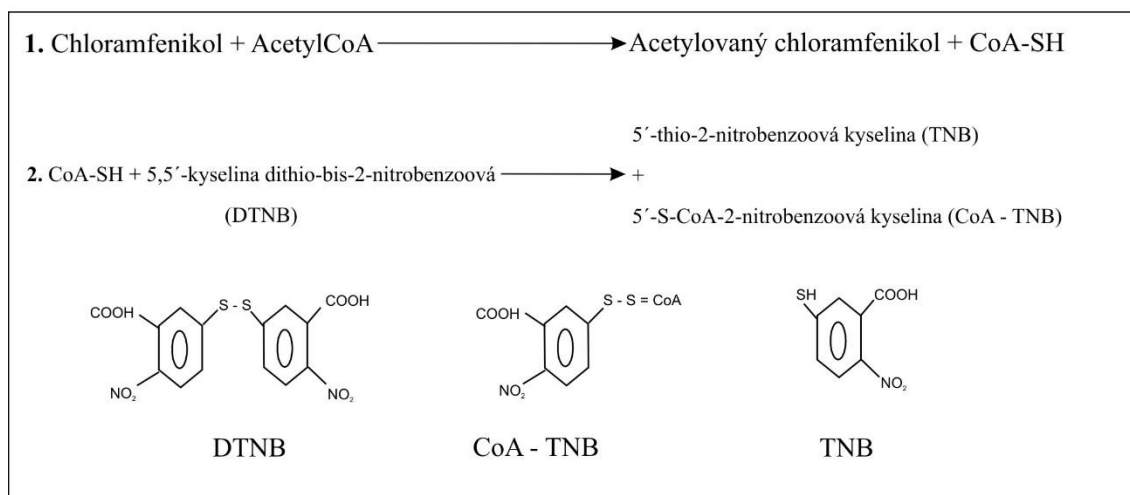
Doplněno sterilní vodou do celkového objemu 10 µl.

### Postup:

Hybridizace probíhala v PCR cycleru. Počáteční teplota byla 95 °C, která se každou minutu snížila o 1 °C až na konečnou teplotu 45 °C. Získané hybridizované primery byly použity do ligační směsi. Ligace probíhala v PCR cycleru přes noc při teplotě 15 °C. Vzniklá ligační směs byla použita pro transformaci do buněk *E. coli*. Transformované buňky byly vysety na plotny obsahující 2xYT pevné médium s obsahem ampicilinu o koncentraci 100 µl/ml. Kontrola transformantů byla provedena metodou *colony-PCR* s použitím různých kombinací kontrolních primerů 30F, 30F2, 1620R a 1620R2.

### **3.2.6. Stanovení specifické aktivity - chloramfenikolacetyltransferasa (CAT)**

Enzymová aktivita chloramfenikolacetyltransferasy byla stanovena kolorimetricky s použitím spektrofotometru *BioMate 5*, *ThermoSpectronic*. Princip metody (Shaw, 1975) je založen na přenosu acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na chloramfenikol (Obr. 3.5). Vzniklý koenzym A reaguje s kyselinou 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoovou (DTNB) za vzniku disulfidu koenzymu A a kyseliny thionitrobenzoové a ekvivalentního molárního množství volné kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB), která je žlutě zbarvena. Množství vznikající TNB bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm.



**Obr. 3.5 - Princip stanovení enzymatické aktivity chloramfenikolacetyltransferasy**  
Konečným produktem reakce je TNB sytě žluté barvy, jejíž intenzita je měřena spektrofotometricky při  $\lambda=412$ .

#### Materiál:

- Pufr KPP - 9 dílů 0,5M  $K_2HPO_4$  (Lachema), 1 díl 0,5M  $KH_2PO_4$  (Lachema), pH 7,8
- Pufr RM (10 ml) - 4 mg DTNB (Serva) v 1 ml 1M Tris-HCl (pH 7,8) + 200  $\mu$ l 5mM acetyl-koenzym A (Sigma), doplnit vodou do 10 ml
- 5mM chloramfenikol
- Roztok Protein 1 - 4,5 g vinan sodno-draselný (Lachema), 1,5 g  $CuSO_4 \times 5 H_2O$  (Lachema), 2,5 g KI (Lachema), doplnit do 500 ml 0,2N NaOH
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)

Objemy do 2 ml byly stáčeny ve stolní mikrocentrifuze Hettich EBA 12 R (20260 $\times$ g; 4  $^\circ$ C), objemy nad 2 ml ve zkumavce v centrifuze 5804R (6300 $\times$ g; 4  $^\circ$ C).

#### Příprava bezbuněčného extraktu

25 ml pŕdy 2xYT s příslušným antibiotikem bylo zaočkováno čerstvou buněčnou kulturou. Následovala kultivace za stálého třepání do  $OD_{600} = 2 - 4$ . Narostlá buněčná kultura byla zchlazena v ledu (10 min) a centrifugována (10 min, 4  $^\circ$ C). Buněčný pelet byl promyt 25 ml ledového pufru KPP a resuspendován v 500  $\mu$ l pufru KPP. Buňky byly rozbity s použitím přístroje Fast Prep FP120 následujícím způsobem. K buněčnému peletu bylo přidáno 200  $\mu$ l kuliček Balotina o velikosti 10. Celý objem byl pak převeden do speciálních mikrozkuavek a následně vložen do přístroje Fast Prep FP120, kde byly buňky desintegrované rychlostí 6,5 m/s po dobu 20 sekund. Tento cyklus se opakoval 6x. Mezi jednotlivými cykly drcení bylo nutné mikrozkuavky chladit 5 minut v ledu,



aby nedošlo k přehřátí vzorku.

Po rozbití buněk následovala centrifugace (20260×g, 20 min, 4 °C), supernatant (bezbuněčný extrakt) byl odebrán a uchován při -20 °C.

#### Měření specifické aktivity CAT

Měření specifické aktivity CAT probíhalo při 37 °C a vlnové délce 412 nm. Do kyvety bylo přidáno 970 µl pufru RM a 10-50 µl bezbuněčného extraktu. Po dobu 1 min byla potom zaznamenána změna absorbance extraktu bez substrátu. Poté bylo přidáno 50 µl 5mM chloramfenikolu (substrát), obsah byl promíchán a měřena změna absorbance po dobu 1 min. Bezbuněčný extrakt byl zředěn tak, aby se změna absorbance v čase pohybovala v rozmezí 0,05-0,1/min. Každý vzorek byl měřen alespoň 3x.

#### Měření celkové koncentrace proteinů

Obsah bílkovin v bezbuněčném extraktu byl stanoven biuretovou metodou. K 5-100 µl bezbuněčného extraktu byla přidána voda do celkového objemu 100 µl a 900 µl roztoku Proteinu 1. Obsah byl promíchán a inkubován ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min. Poté byla měřena absorbance vzorku při vlnové délce 580 nm. Stejným postupem s použitím řady vodných roztoků BSA o různé koncentraci (0-1 mg/ml) byla získána kalibrační křivka. Výsledná celková koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena odečtením z grafu kalibrační křivky.

#### Výpočet specifické aktivity CAT

Specifická aktivita CAT byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$SA = (\Delta E \cdot V_c) / (\varepsilon \cdot V_E \cdot C)$$

- SA specifická aktivita [U/mg proteinu]; (U = µmol/min)  
 $\Delta E$  změna absorbance za 1 min [1/min]  
 $V_c$  celkový objem reakční směsi [ml]  
 $\varepsilon$  extinkční koeficient [ml/µM]  
 $V_E$  objem bezbuněčného extraktu [ml]  
 C koncentrace proteinů [mg/ml]

### **3.2.7. Stanovení fluorescence zeleného proteinu (GFP)**

#### Materiál:

Pufr PBS - 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 147mM NaCl, 2,7mM KCl

Objemy do 2 ml byly stáčeny ve stolní mikrocentrifuze Hettich EBA 12 R (20260×g; 4 °C), objemy nad 2 ml ve zkumavce v centrifuze 5804R (6300×g; 4 °C).

#### Postup:

Promotorová aktivita byla stanovena jako intenzita fluorescence zeleného fluoreskujícího proteinu Gfp kódovaného reportérovým genem *gfpuv*, který se nachází v *promotor-probe* vektoru pEPR1 (Knoppova *et al.*, 2007). Buňky *C. glutamicum* obsahující vektor pEPR1 s příslušnou naklonovanou promotorovou oblastí byly kultivovány v tekutém médiu 2xYT s přidavkem příslušného antibiotika. Buňky byly kultivovány za standardních fyziologických podmínek (30 °C) po dobu 24h. V pravidelných 2h intervalech byly odebírány vzorky buněčných kultur (1,5 ml) a centrifugovány (5 min, 4 °C). Buňky byly promyty 1 ml pufrem PBS s 2-merkaptoetanolem (3mM) a fenylmetylsulfonyl fluoridem (PMSF; 0,1mM) a homogenizovány použitím FastPrep homogenizátoru (MP Biomedicals), kde byly buňky desintegrovány rychlostí 6 m/s po dobu 60 sekund (opakováno celkem 3x). Fluorescence buněčného extraktu byla měřena spektrofotometrem Sapphire2 (Tecan), na kterém byly nastaveny parametry uvedené v Tab. 3.6. Pro analýzu bylo odebíráno vždy 1,8 mg buněk podle rovnice  $OD_{600} \times 0,3 = \text{biomasa/objem kultury [mg/ml]}$ .

Obsah bílkovin v bezbuněčném extraktu byl stanoven Bradfordovou metodou (Bradford, 1976). Intenzita fluorescence byla vyjádřena v arbitrárních jednotkách (AU/mg protein). Buněčný extrakt *promotor-probe* vektoru pEPR1 byl použit jako kontrola pro určení pozadí fluorescence.

**Tabulka 3.6. Parametry použité při měření fluorescence**

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Excitační vlnová délka	397 nm
Emisní vlnová délka	509 nm
Šířka excitační štěrby	5 nm
Šířka emisní štěrby	20 nm
Počet opakování jednotlivých snímaní	4
Citlivost	Vysoká

### 3.2.8 DNA Microarray hybridization

Metoda DNA Microarray hybridization u kmene *Corynebacterium glutamicum* byla vyvinuta a popsána v publikaci (Huser *et al.*, 2003). Tato metoda se uplatňuje při srovnávací analýze genové exprese sledovaných kmenů za různých fyziologických podmínek. Pomocí PCR reakcí byla sestrojena DNA knihovna obsahující fragmenty o délce 50-70 oligonukleotidů více než 93% hypotetických chromosomálních genů *C. glutamicum* (Huser *et al.*, 2003). Kmen *C. glutamicum*  $\Delta$ rshA byl kultivován v minimálním médiu CGXII za standardních podmínek (30 °C) a zpracován podle protokolu (viz výše). Z buněčné kultury byla izolována celková RNA, která byla použita pro syntézu cDNA (pro reverzní transkripci bylo použito 8  $\mu$ g přečištěné celkové RNA, cDNA byla značena fluorescenčně pomocí Cy3 a Cy5). Počítačová analýza dat byla provedena s použitím programu EMMA 2 (Dondrup *et al.*, 2009) na pracovišti Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld. Pro analýzu byly použity parametry signal intensity (A-value) a signal intensity ratio (M-value), které odpovídají změně genové exprese rovná nebo větší 1,5. Podrobný popis metody a soupis použitého materiálu je uveden v interním materiálu *Oligonucleotide Microarray Manual* (verze 1.5 z října 2006) pracoviště Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld.

### 3.2.9 Určování transkripčních počátků

#### 3.2.9.1 Primer-extension

K určení transkripčního startu (5' konce mRNA) byla použita metoda *primer-extension* (PEX). Metoda je založena na schopnosti reverzní transkriptasy syntetizovat DNA podle templátu RNA od jeho 3' konce. Primer byl navržen tak, aby hybridizoval s RNA vzniklou transkripcí studovaného genu. Použití primeru značeného fluoresceinem umožnilo analyzovat výsledek pomocí neradioaktivní sekvenace na automatickém sekvenátoru A.L.F DNA Sequencer. Pro získání silnějšího signálu byla studovaná oblast klonována do mnohokopiového vektoru pET2. Takto získaný konstrukt byl elektroporací vpraven do buněk *C. glutamicum*. Po kultivaci následovala izolace celkové RNA, která byla použita pro samotný experiment *primer-extension*. Počítačová analýza dat generovaných sekvenátorem byla provedena s použitím programu Fragment Manager V1.1. Vzorky byly centrifugovány ve stolní centrifuze Hettich Mikro 220R (18620 $\times$ g) při teplotě 4 °C.

#### Materiál:

- Pufr HP: 40mM PIPES pH = 6,4, 1mM EDTA, pH = 8,0, 400mM NaCl, 80% formamid

deionizovaný pomocí Resin 501-X8

- Pufr TES: 10mM Tris, pH = 8 (upraveno HCl), 1mM EDTA, pH = 8, 100mM NaCl
- Pufr TE: 10mM Tris, pH = 7,8 (upraveno HCl), 1mM EDTA, pH = 7,6
- STOP pufr: dodáván se soupravou *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*
- Pufr RTB: 4  $\mu$ l 5x pufr pro SuperScript II (40 U)
- 2  $\mu$ l 0,1M DTT (dithiotreitol)
- 2  $\mu$ l actinomycin D (500  $\mu$ g/ml)
- 2  $\mu$ l RNasin
- 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- Reverzní transkriptáza SuperScript II
- Ribonukleasa A (2 mg/ml)

#### Hybridizace značeného primeru s RNA

100  $\mu$ g celkové RNA ( $\approx$  60  $\mu$ l) bylo vakuově vysušeno (SpeedVac, 45 min). Získaný pelet byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l pufru HP. K tomuto roztoku byly přidány 2  $\mu$ l (= 20 pmol) fluoresceinem značeného primeru CM4. Po přidání primeru byla směs denaturována v tekuté lázni (10 min při 95 °C). Následovala hybridizace primeru s RNA v termo-bloku za podmínek 45 °C přes noc. Poté bylo ke směsi přidáno 300  $\mu$ l sterilní ledové vody a 800  $\mu$ l 96% etanolu (-20 °C). Precipitace RNA probíhala 1 hodinu v ledu. Vysrážená RNA byla centrifugována (12 min, 4 °C), vzniklý pelet byl promyt 500  $\mu$ l 70% etanolu při pokojové teplotě, opět centrifugován (8 min, pokojová teplota), vysušen a rozpuštěn ve 20  $\mu$ l pufru RTB.

#### Reverzní transkripce

RNA s hybridizovaným primerem rozpuštěná ve 20  $\mu$ l pufru RTB byla inkubována v termo-bloku při teplotě 42 °C po dobu dvou minut. Následně byly přidány 2  $\mu$ l (20 U) reverzní transkriptázy SuperScript II. Reverzní transkripce probíhala v termo-bloku po dobu 1 hodiny při teplotě 42 °C. Reakce byla ukončena teplotní inaktivací enzymu při 70 °C po dobu 15 min. RNA byla odstraněna přidáním 1  $\mu$ l RNasy a inkubací 30 min. při 37 °C. Po inkubaci byla vzniklá jednořetězcová cDNA precipitována přidáním 150  $\mu$ l pufru TES a 500  $\mu$ l 96% etanolu (-20 °C) a ponechána 1 hodinu v ledu. Vysrážená DNA byla centrifugována (12 min, 4 °C) a sediment byl promyt 500  $\mu$ l 70% etanolu. Suchý pelet byl rozpuštěn v 6  $\mu$ l TE pufru, 6  $\mu$ l pufru STOP a před nanesením na polyakrylamidový gel (PAA) byl vzorek denaturován při 95 °C po dobu 5 min. Následovala elektroforéza v automatickém sekvenátoru A.L.F DNA

Sequencer společně s produkty sekvenačních reakcí stejného fragmentu klonovaného v pET2.

### **3.2.9.2 5' RACE**

*Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) je metoda umožňující charakterizovat 5' konec mediátorové RNA a určit tak počátek transkripce. Schéma metody je znázorněno na Obr. 3.6.

#### Materiál:

- 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (ROCHE)
- CloneJET™ PCR Cloning Kit (FERMENTAS)
- mikroskopavky

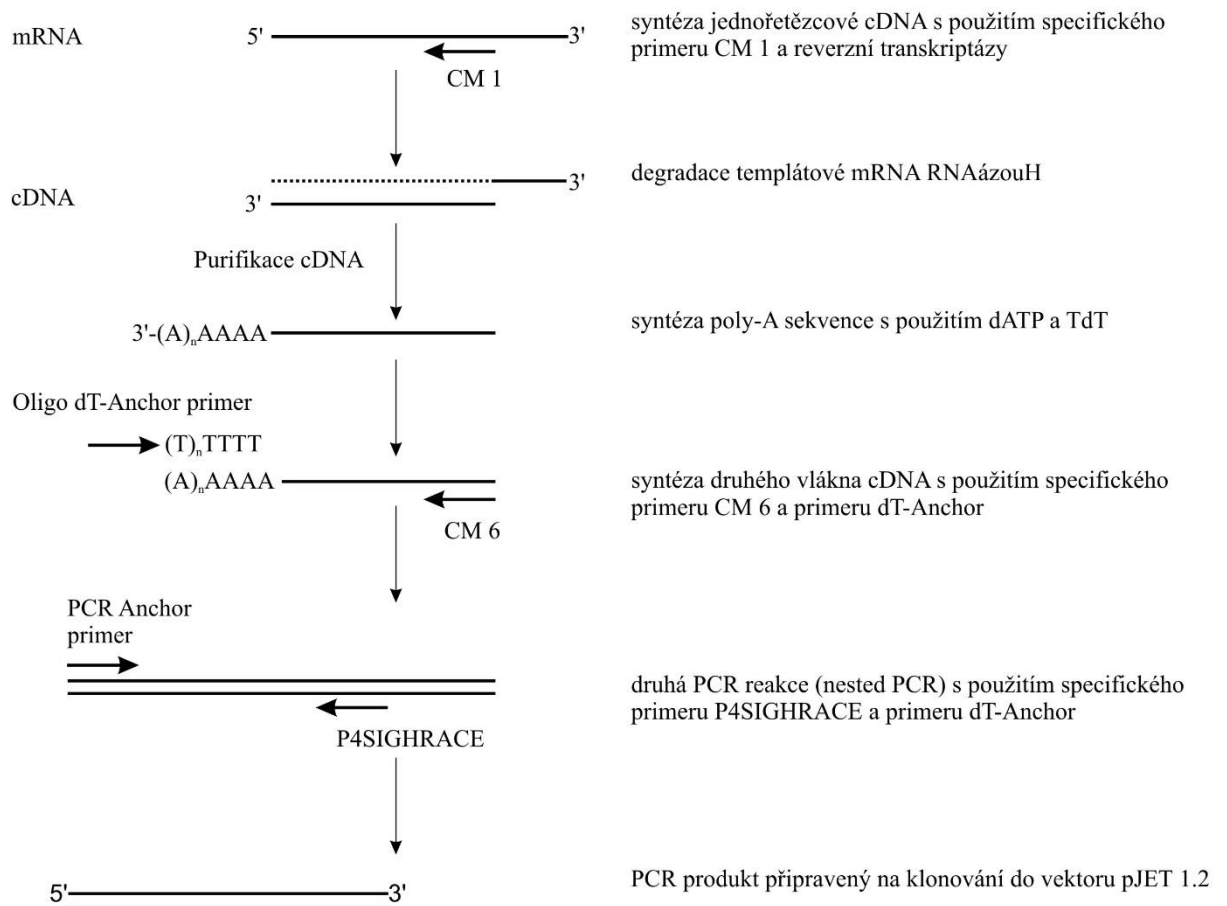
#### Příprava RNA:

Buněčná kultura *C. glutamicum* s naklonovaným konstruktem pET2/P4SigH byla kultivována v tekutém médiu 2xYT za standardních fyziologických podmínek při teplotě 30 °C do OD<sub>600</sub> = 2,5. Kultura byla následně centrifugována (10 min, 20260×g, 4 °C). Pelet byl uchován v -70 °C přes noc, což je důležité pro rozbití buněčné stěny. Z buněčného peletu byla druhý den izolována celková RNA pomocí kitu *High Pure RNA Isolation Kit* (krok pro odstranění DNA pomocí DNAsy proveden celkem 3x). Pracovní postup je určen výrobcem. Koncentrace RNA byla změřena přístrojem Nanophotometr a vizuálně zkontrolována na 1,5% agarosovém gelu (80 V, 50 minut).

#### Postup 5' RACE:

V experimentu byla použita komerční souprava 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation. Schéma experimentu je znázorněno na Obr. 3.6. V prvním kroku byla reverzní transkripcí syntetizována cDNA za použití 2 µg celkové RNA a specifického primeru CM1. Následovala degradace templátové mRNA pomocí RNAázyH. Po přečištění získané cDNA byl na její 3' konec nasyntetizován polyA řetězec komplementární k primeru Oligo dT-Anchor (součást komerční soupravy), který byl společně se specifickým primerem CM 6 použit pro syntézu druhého řetězce cDNA. Získaný dvouřetězcový cDNA fragment byl použit jako templát pro *nested PCR* za použití primerů P4SIGHRACE (specifický) a PCRANCHORPRIMER (součást komerční soupravy). Finální PCR fragment byl nanesen na agarosový gel z něhož byl izolován s použitím komerční soupravy *QIAquick® Gel Extraction Kit*. Přečištěný PCR fragment byl

naklonován do plazmidu pJET1.2 s použitím komerční soupravy *CloneJET PCR Cloning Kit*. Získaný konstrukt byl přenesen transformací do kompetentních buněk *E. coli*. Transformační směs byla vyseta na misky obsahující půdu LB s přidavkem antibiotika ampicilinu o celkové koncentraci 100 µg/ml. Narostlé kolonie byly testovány metodou *colony PCR*. Pro reakci byly použity primery PJET1.2FORWARD a PJET1.2REVERSE, které jsou součástí komerční soupravy. Vybrané klony byly následně sekvenovány pro získání sekvence 5' konce sledovaného transkriptu.



**Obr. 3.6. Grafické znázornění metody 5' RACE. Převzato a upraveno podle návodu komerční soupravy 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (ROCHE).**

### 3.2.10. *In-vitro* transkripční systém

#### Materiál:

- bakteriální kmeny *E. coli DH5a*, *E. coli BL21 (DE3)*, *C. glutamicum ATCC 13032*
- Pufr A (50mM Tris, 0,5mM EDTA, 5% glycerol, 0,1mM DTT, pH 8,0 + gradient 150 - 500mM NaCl)
- Pufr P (300mM NaCl, 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5% glycerol, 3mM 2-merkaptioetanol, 0,1mM fenylmethylsulfonylfluorid, pH 8.0)

- Pufr P + gradient imidazolu (20 – 400 mM)
  - niklové kuličky *Ni-NTA Agarose* (Qiagen)
  - 2M imizadol (pH 8.0)
  - chromatografická kolona *Poly-Prep Column* (0.8×4 cm, Bio-Rad)
  - Bradfordové činidlo
  - 1M IPTG (Izopropyl-β-D-thiogalaktosid)
  - 0,1M PMFS
  - 260 μl 2-merkaptoetanol
  - dialyzační kazety *Thermo Scientific Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes*
  - heparin – agarosové kuličky (Heparin –Agarose Type I, Sigma Aldrich)
  - skladovací pufr (50mM Tris, 100mM NaCl, 50% glycerol, 3mM 2-merkaptoetanol, pH 8.0)
- Centrifugace byla provedena na odstředivce 5804R (6300×g, 4 °C)

### 3.2.10.1. Konstrukce kmene *C. glutamicum rpoC-His8* a izolace jádra RNA polymerasy

Metodou *crossover PCR* byl připraven fragment *rpoC-His8* o velikosti 1,6 kb nesoucí 8 histidinů na 3'-konci (před stop kodonem) kódující sekvence genu *rpoC*, jehož produktem je β' podjednotka RNA polymerázy. Fragment byl klonován do integrativního vektoru pKSAC45 (Holatko *et al.*, 2008). Specifickou vlastností vektoru pKSAC45 je jeho replikace v buňkách *E. coli*, avšak v buňkách kmene *C. glutamicum* vektor se udržuje pouze integrací do hostitelského chromosomu. Integrace vektoru pKSAC45 je založena na homologní rekombinaci mezi klonovaným fragmentem a odpovídající homologní oblastí v chromosomu. Klony vzniklé integrací se vyznačují rezistencí ke kanamycinu (determinována vektorem). Následná selekce klonů s integrovaným fragmentem *rpoC-His8* v chromosomu byla provedena na základě letálního efektu vektorového genu *sacB* v *C. glutamicum*, kde v přítomnosti 10% sacharózy v médiu přežívají pouze klony, ve kterých proběhla druhá homologní rekombinaci spojená se ztrátou vektorové DNA. V takovém případě došlo i ke ztrátě genu *sacB*. Přítomnost integrované histidinové kotvy (8His) před stop kodon genu *rpoC* byla potvrzena sekvenací PCR fragmentu připraveného z chromosomální DNA. Získaný kmen byl označen *C. glutamicum rpoC-His8*.

Pro izolaci jádra RNAP byly buňky kmene *C. glutamicum rpoC-His8* kultivovány v kompletním médiu 2xYT až do dosažení  $OD_{600} = 1,5$ , centrifugovány, promyty a resuspendovány v pufru P. Buněčná stěna byla narušena pulzní sonikací (sonikátor

Hielscher UP400S, amplituda 60%, cyklus 0,5, 25×10s). Mezi jednotlivými intervaly byl vzorek chlazen 1 minutu v ledu, aby nedošlo k denaturaci proteinů vlivem zvyšující se teploty. Z tohoto důvodu probíhal celý proces sonikace na ledu. Buněčný lyzát byl centrifugován a čirý supernatant přenesen do nových zkumavek vysvícených UV zářením (5 min.). Následně byl přidán roztok s niklovými kuličkami *Ni-NTA Agarose* (váže proteiny s histidinovou kotvou). Směs byla 2 h inkubována v ledu za pomalého lineárního třepání. Poté byla směs centrifugována a pelet obsahující niklové kuličky přenesen do chromatografických kolon *Poly-Prep Column* (Bio-Rad). Směs v kolonách byla promyta pufrům P obsahující 5mM imidazol. Eluce proteinu z chromatografické matrice *Ni-NTA Agarose* byla provedena pufrům P s přidavkem imidazolu o různých koncentracích. Gradient imidazolu byl v rozmezí 10 – 200mM. Nejvyšší výtěžek jádra RNAP byl stanoven ve frakcích obsahující 10 a 20mM imidazol. Pro stanovení koncentrace proteinů bylo použito Bradfordové činidlo, pro vizualizaci byly jednotlivé frakce analyzovány elektroforeticky v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, 8%). Frakce s nejvyšším výtěžkem byly spojeny a dialyzovány přes noc pomocí dialyzační kazety *Thermo Scientific Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes* (postup stanoven výrobcem) proti pufru A (dialyzační pufr).

### **3.2.10.2. Purifikace jádra RNA polymerasy**

Dialyzované jádro RNA polymerasy bylo smícháno s heparin-agarosovými kuličkami. Směs byla 2 h inkubována v ledu za pomalého lineárního třepání, centrifugována a pelet obsahující heparin-agarosové kuličky přenesen do chromatografických kolon *Poly-Prep Column* (Bio-Rad). Eluce jádra RNAP probíhala pomocí gradientu soli v pufru A (100–500 mM). Frakce s nejvyšším podílem jádra RNAP byly spojeny, dialyzovány proti skladovacímu pufru a analyzovány elektroforeticky v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, 8%). Celkový výtěžek izolace jádra RNAP činil přibližně 100 µg na 1 litr buněčné kultury.

### **3.2.10.3. Klonování a izolace proteinů sigma faktorů**

Na základě znalosti nukleotidové sekvence byly navrženy primery pro PCR syntézu fragmentů s kódujícími sekvencemi genů sigma faktorů. Vzniklé fragmenty byly vloženy do expresního vektoru pET22b(+) a klonovány nejprve v buňkách *E. coli* H5α (uchovávací kmen) a výsledné konstrukty následně přeneseny do buněk kmene *E. coli* BL21 (DE3, expresní kmen). Buněčná kultura o objemu 1 l byla kultivována v médiu 2×YT s přidavkem ampicilinu o koncentraci 150 µg/ml v Erlenmayerově baňce o objemu



5 l za teploty 30 °C až do  $OD_{600} = 0,5$ . Přídavkem 1 ml roztoku 1 M IPTG byla indukována (6h, RT) proteinová exprese pomocí 1mM IPTG s užitím T7 transkripčního systému: chromosomální gen pro T7 polymerasu s IPTG-inducibilním promotorem + vektorový T7 promotor *upstream* genu kódujícího sigma faktor. Zchlazená buněčná kultura (10 min na ledu) byla následně přelita do kyvet vysvícených UV zářením, stočena (15 min, 4 °C) a resuspendována ve 50 ml pufru P. Po následné centrifugaci (15 min, 4 °C) byl odstraněn supernatant a pelet zamražen v -80 °C přes noc. Druhý den byl pelet resuspendován v pufru P a sonikován (sonikátor Hielscher UP400S). Sonikace (amplituda 60%, cyklus 0,5) byla provedena celkem 20× po dobu 10 s. Mezi jednotlivými intervaly byl vzorek chlazen 1 minutu v ledu, aby nedošlo k denaturaci proteinů vlivem zvyšující se teploty. Z tohoto důvodu probíhal celý proces sonikace na ledu. Po následné centrifugaci byl čirý supernatant přenesen do nové kyvety. Byla přidána suspenze s niklovými kuličkami *Ni-NTA Agarose* a pufr P do celkového objemu 50 ml. Směs byla 2 h inkubována v ledu za pomalého lineárního třepání. Eluce proteinu byla provedena za stejných podmínek jako u izolace jádra RNAP (viz výše) s tím rozdílem, že *Ni-NTA Agarose* byla po vazbě proteinu promyta pufr P s 30mM imidazolem a eluční gradient imidazolu v pufru P byl 50-400mM. Největší výtěžky byly zaznamenány ve frakcích 100 a 200mM imidazol. Frakce s nejvyšším podílem sigma faktoru byly spojeny, dialyzovány proti skladovacímu pufru a analyzovány elektroforeticky v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, 8%).

#### 3.2.10.4. Transkripční reakce *in-vitro*

Tato metoda byla použita pro testování specifické iniciace transkripce pomocí holoenzymu RNAP s určitým sigma faktorem na určité promotorové oblasti, naklonované ve vektoru pRLG770. Složení transkripční směsi je uvedeno v tabulce 3.6.

##### Materiál:

- pufr DB: 50mM Tris, 2mM EDTA, 0,1mM DTT, 1mM 2-merkaptoetanol, 0,233M NaCl, 5% glycerol, lysozym 130 µg/ml, pH 8.0
- transkripční pufr: 40mM Tris, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, pH 7,9
- hovězí sérový albumin (BSA, 10 mg/ml)
- 1M KCl
- nukleotidy (ATP, CTP, GTP) o koncentraci 20 mM a 1 mM UTP
- radioaktivně značený nukleotid  $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP
- stop pufr: 7M močovina, 10mM EDTA, 1% SDS, 2x TBE pufr, 0,05% bromfenolová modř, 0,05% xylencyanol

- pufr TBE: 90mM Tris, 90mM kyselina boritá, 2mM EDTA, pH 8,3

### Postup:

RNAP holoenzym byl připraven smícháním jádra RNAP s příslušným proteinem sigma (v různých poměrech RNAP:sigma faktor) s pufrem DB v celkovém objemu 1,5  $\mu$ l. Rekonstituce RNAP holoenzymu s příslušným sigma faktorem probíhala po dobu 15 min při teplotě 30 °C.

Příprava transkripční směsi probíhala na ledu a v plexisklovém boxu umístěném v oddělené místnosti z důvodu používání radioaktivně značených sloučenin. Do transkripční směsi byla postupně přidána templátová DNA (PCR fragment syntetizovaný z vektoru pRLG770 s naklonovanou promotorovou oblastí a transkribovanou sekvencí), transkripční pufr, chlorid draselný, BSA, nukleotidy (ATP, GTP, CTP, UTP) a radioaktivně značený  $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP. Transkripční směs byla smíchána s rekonstituovanou RNAP se sigma faktorem a inkubována po dobu 15 min při teplotě 30 °C. Poté byla reakce zastavena přidáním 10  $\mu$ l stop pufru. Vzorčky byly analyzovány na vertikální elektroforéze nanesením na PAA gel (5,5%, 7M močovina, 1 $\times$ TBE) v pufru TBE. Gel byl následně přemístěn na chromatografický papír 3MM Chr (General Electric), vysušen 30 min. při 80 °C na vakuové sušičce gelů, model 583 (Bio-rad) a vložen do expoziční kazety obsahující fólii absorbující radioaktivní záření BAS-IP SR 2025 Imaging Plate (Fujifilm). Po 24-hodinové expozici byl autoradiogram byl pořízen naskenováním pomocí přístroje Molecular Imager FX (Bio-Rad).

**Tabulka 3.6 – Složení reakční směsi pro experimenty *in-vitro* transkripce**

<i>In-vitro</i> transkripční reakční směs		
Složka	Objem [ $\mu$ l]	Konečná koncentrace
<b>RNAP + sigma faktor</b>	<b>1,5</b>	<b>60 nM</b>
Transkripční pufr (20x)	0,5	1x
BSA (10 mg/ml)	0,1	100 $\mu$ g/ml
Templátová DNA (lineární pRLG770 + insert)	1,0	150 ng
20 mM ATP (20 mM)	0,1	200 $\mu$ M
20 mM GTP (20 mM)	0,1	200 $\mu$ M
20 mM CTP (20 mM)	0,1	200 $\mu$ M
1 mM UTP (1 mM)	0,1	10 $\mu$ M
<b>UTP (<math>\alpha^{32}\text{P}</math>)</b>	0,1	-
KCl (1 M)	0,9	90 mM
ddH <sub>2</sub> O	5,5	-

**Celkový objem** **10  $\mu$ l**  
ddH<sub>2</sub>O – injekční voda 10 ml (B-Braun), prostá RNAs a DNAs

## 4. Výsledky

Hlavním cílem této disertační práce byla analýza regulace exprese genů *sigH* a *rshA*, kódujících stresový sigma faktor RNA polymerasy a jeho příslušný anti-sigma faktor u *Corynebacterium glutamicum*. Za různých fyziologických podmínek byla měřena aktivita promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA*, určeny transkripční počátky těchto genů a od nich odvozeny příslušné promotorové oblasti.

Mezi další cíle této práce patřila identifikace a následná transkripční analýza genů, které jsou regulovány alternativním sigma faktorem SigH. Pro tuto analýzu byly použity (1) *in-vivo* metody (stanovení promotorových aktivit chloramfenikolacetyltransferasy (CAT) a zeleného fluorescenčního proteinu (GFP)), DNA Microarray, *primer-extension*, 5' RACE) a (2) *in-vitro* transkripční systém vyvinutý v Laboratoři molekulární genetiky bakterií MBÚ (Holatko *et al.*).

### 4.1. Charakteristika kmenů *C. glutamicum* s delecemi genů kódujících sigma faktory - růst v tekuté půdě

*C. glutamicum* kóduje ve svém genomu 6 alternativních sigma faktorů: SigB, SigC, SigD, SigE, SigH a SigM a anti-sigma faktor RshA, který se váže na sigma faktor SigH a reguluje tak jeho aktivitu. Bylo připraveno celkem 5 kmenů s delecí v jednom genu kódujícím sigma faktor (uveden za symbolem „Δ“): *C. glutamicum* Δ*sigB*, *C. glutamicum* Δ*sigD*, *C. glutamicum* Δ*sigE*, *C. glutamicum* Δ*sigH* a *C. glutamicum* Δ*sigM*. Kmen s delecí v genu kódujícím anti-sigma faktor RshA nese označení *C. glutamicum* Δ*rshA*. Současně byly připraveny i tři kmeny s rozdílnými dvojitými delecemi, konkrétně *C. glutamicum* Δ*sigED* (delece v genech *sigE* a *sigD*), *C. glutamicum* Δ*sigEM* (delece v genech *sigE* a *sigM*) a *C. glutamicum* Δ*sigHM* (delece v genech *sigH* a *sigM*). Kmen *C. glutamicum* Δ*sigEH* se nepodařilo připravit, pravděpodobně z důvodů neživotaschopnosti tohoto konstruktů.

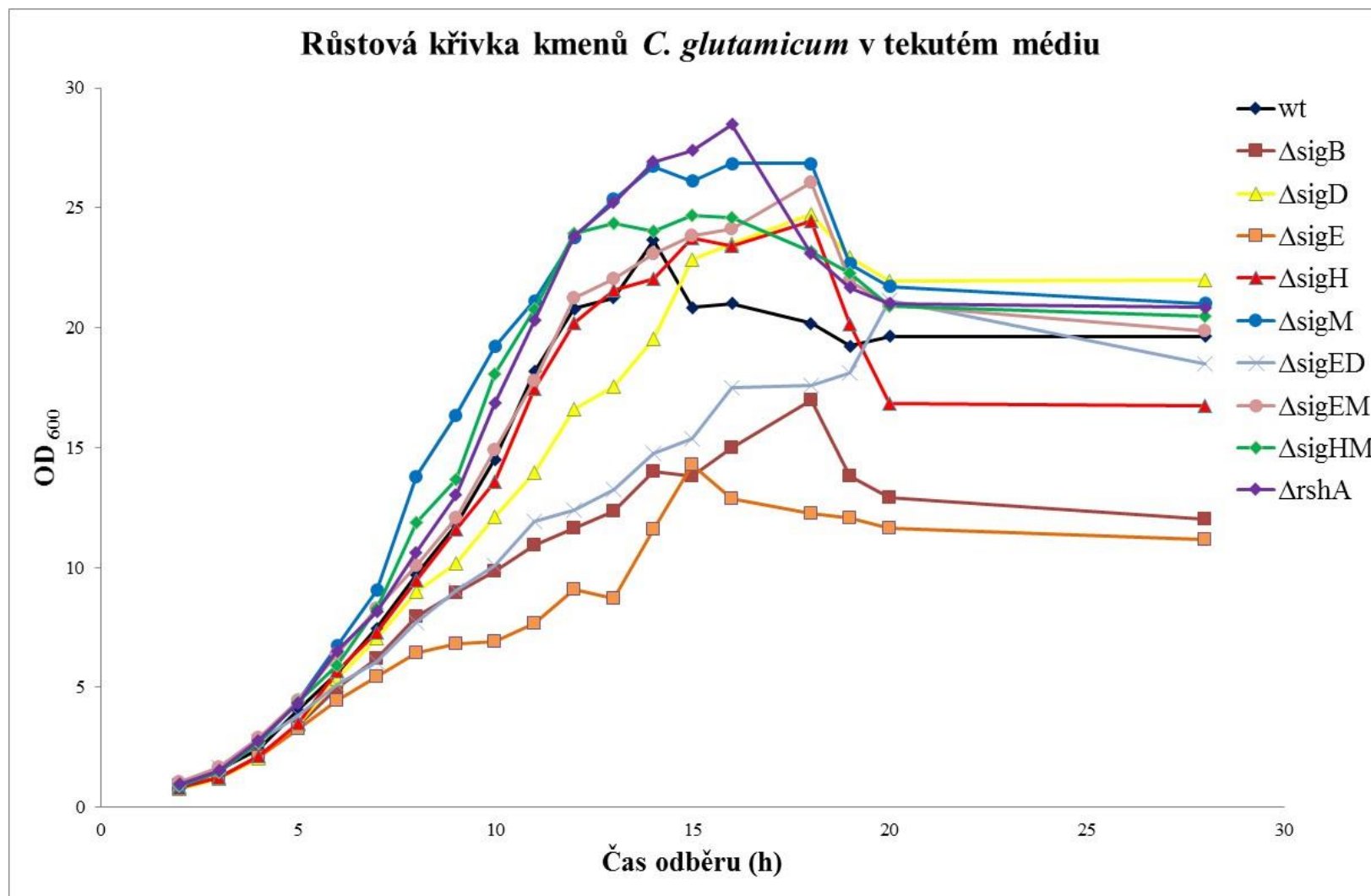
Všechny výše uvedené kmeny *C. glutamicum* byly kultivovány ve dvou biologických replikách v tekutém kompletním médiu 2xYT za standardních fyziologických podmínek a v pravidelných 1 hodinových intervalech byly odebírány vzorky pro měření optické density (viz kapitola Materiál a metody). První měření v čase 0 značí dobu zaočkování. Závěrečný odběr byl učiněn po 28 hodinách od prvního měření. Získané hodnoty optických densit jsou graficky znázorněny na Obr. 4.1.

Z naměřených hodnot optických densit sledovaných kmenů *C. glutamicum* jsou patrné následující růstové fáze: klidová fáze (do 5. hodiny od zaočkování),

exponencionální fáze (mezi 5 až 12 hodinou měření), stacionární fáze (od 12. hodiny do 18-19 hodiny od zaočkování) a fáze odumírání.

Z výsledků je patrné, že z kmenů s delecí jednoho genu vykazují nejnižší nárůst kmeny *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigB$ . U kmenů s delecí dvou genů byl pozorován nejnižší buněčný nárůst u kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigED$ . Srovnání naměřených hodnot kmenů *C. glutamicum* s delecí dvou genů kódujících sigma faktory s kmeny s delecí jednoho genu ukázalo, že přítomnost vícenásobných delecí genů pro sigma faktory (s pravděpodobnou výjimkou současné delecce genů *sigE* a *sigH*, která je zřejmě letální) nemá zásadní vliv na růst bakteriálních kmenů. Tento výsledek je patrný při srovnání kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigHM$  s kmeny *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigM$ , při srovnání *C. glutamicum*  $\Delta sigEM$  s kmeny *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigM$  a rovněž při srovnání kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigED$  s kmeny *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigD$ .

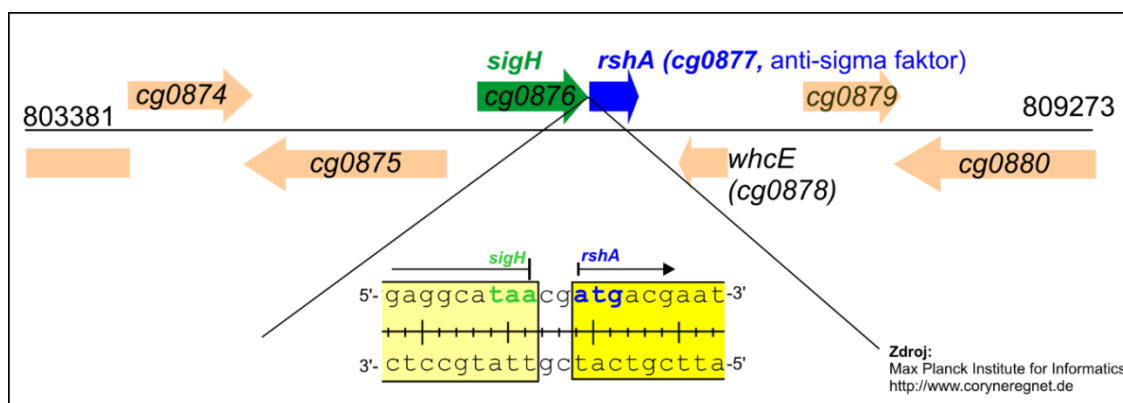
Z uvedených výsledků vyplývá, že růst *C. glutamicum* v kompletním médiu za standardních podmínek je nejvíce ovlivněn delecí v genu *sigE* kódující alternativní sigma faktor SigE.



Obr. 4.1 - Růstová křivka kmenů *C. glutamicum*. Popis na straně č. 61.

## 4.2. Analýza operonu *sigH-rshA*

Gen *sigH* kódující alternativní sigma faktor SigH sousedí v genomu *C. glutamicum* s genem *rshA*. Translační start kodon genu *rshA* je oddělen 2 nukleotidy (nt) od translačního stop kodonu genu *sigH*, jak znázorňuje Obr. 4.2. Lze tedy předpokládat, že gen *sigH* tvoří s genem *rshA*, kódujícím jeho potenciální anti-sigma faktor, společný operon.



**Obr. 4.2 - Lokalizace genů *sigH* a *rshA* v genomu *C. glutamicum*** (genomový úsek 803381-809273 nt). Oba geny se nachází v těsné blízkosti a jsou od sebe odděleny dvojicí nukleotidů cytosinem a guaninem. Stop kodon (*taa*) genu *sigH* je označen zelenou barvou, iniciační kodon (*atg*) genu *rshA* je označen barvou modrou. Schéma bylo pořizeno na základě znalosti sekvence genomu *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003).

K identifikaci promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA*, byly připraveny PCR fragmenty obsahující *upstream* oblasti těchto genů a následně klonovány do *promoter-probe* vektoru pET2 obsahujícího bezpromotorový reportérový gen *cat* kódující chloramfenikolacetyltransferasu (CAT). Získané konstrukty byly použity pro měření promotorových aktivit za fyziologických podmínek (30 °C) a za stresových podmínek. Promotorové aktivity byly měřeny jak v divokém kmeni *C. glutamicum* tak i v mutantních kmenech nesoucí delecii v genu pro daný sigma faktor.

### 4.2.1. Klonování promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA*

Na základě znalosti sekvence DNA genomu *C. glutamicum* byly navrženy dvojice primerů tak, aby výsledné fragmenty DNA použité pro klonování dostatečně pokrývaly *upstream* oblast vybraných genů v rozsahu, který je běžný pro výskyt promotorových oblastí. Fragmenty byly připraveny PCR reakcí pomocí následující kombinace primerů: PSIGHF-PSIGHR pro syntézu fragmentu *PsigH* o velikosti 550 bp a PRSHAF-PRSHAR pro fragment *PrshA* o velikosti 301 bp. Získané fragmenty byly klonovány do *promoter-probe* vektoru pET2 obsahujícího bezpromotorový reportérový gen *cat* kódující

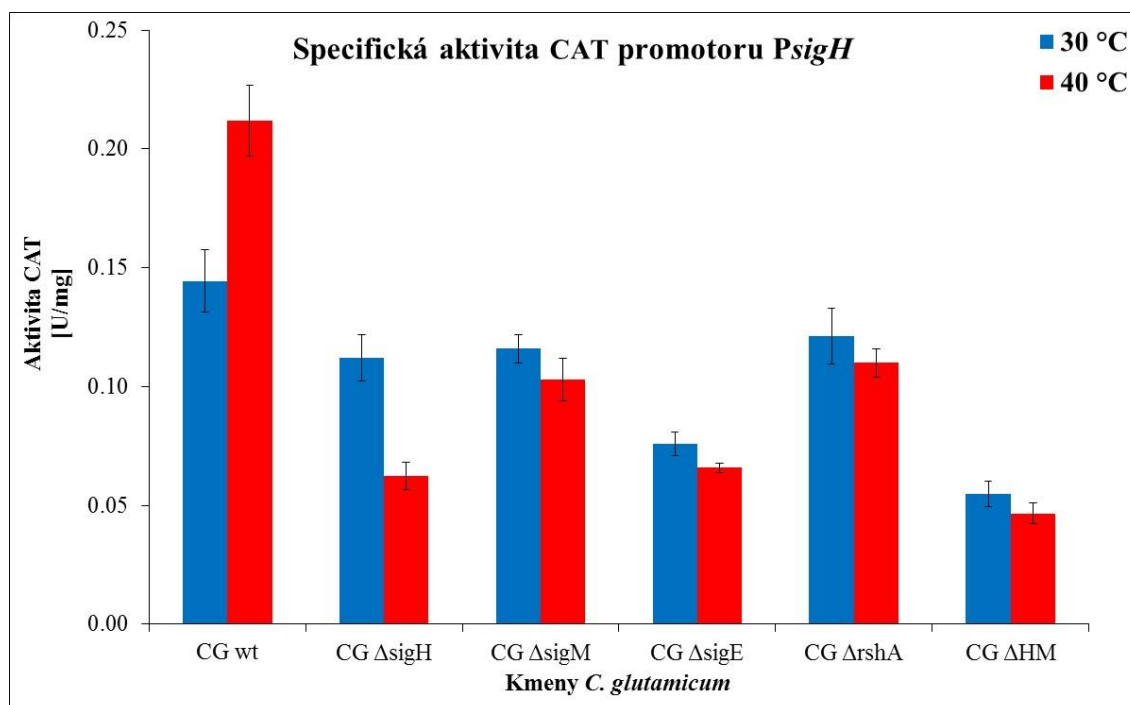
chloramfenikolacetyltransferasu (CAT) a transformovány do kompetentních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Po ověření správnosti sekvence metodou PCR byly získané konstrukty pET2/*PsigH* a pET2/*PrshA* přeneseny elektroporací do buněk divokého kmene *C. glutamicum* a kmenů nesoucích delecí v genu kódujícím příslušný sigma faktor (označení  $\Delta$ ). Transformanty byly selektovány na komplexní půdě 2xYT s kanamycinem o koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$ , u delečního kmene  $\Delta\text{sigE}$  byla použita nižší koncentrace kanamycinu 10  $\mu\text{g/ml}$ . Vzniklé klony byly testovány na přítomnost rekombinantního vektoru pET2 s příslušným naklonovaným fragmentem.

#### 4.2.2. Měření aktivity promotorové oblasti genu *sigH*

Klony obsahující vektor pET2 s naklonovaným promotorovým fragmentem byly použity pro stanovení promotorové aktivity měřením aktivity reportérového enzymu CAT v různých kmenech *C. glutamicum*. Aktivita CAT byla měřena za standardních fyziologických podmínek (30  $^{\circ}\text{C}$ ) a za podmínek tepelného šoku (40  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 60 minut).

Výsledky měření specifických aktivit CAT promotorové oblasti genu *sigH* (*PsigH*) jsou znázorněny na Obr. 4.3.

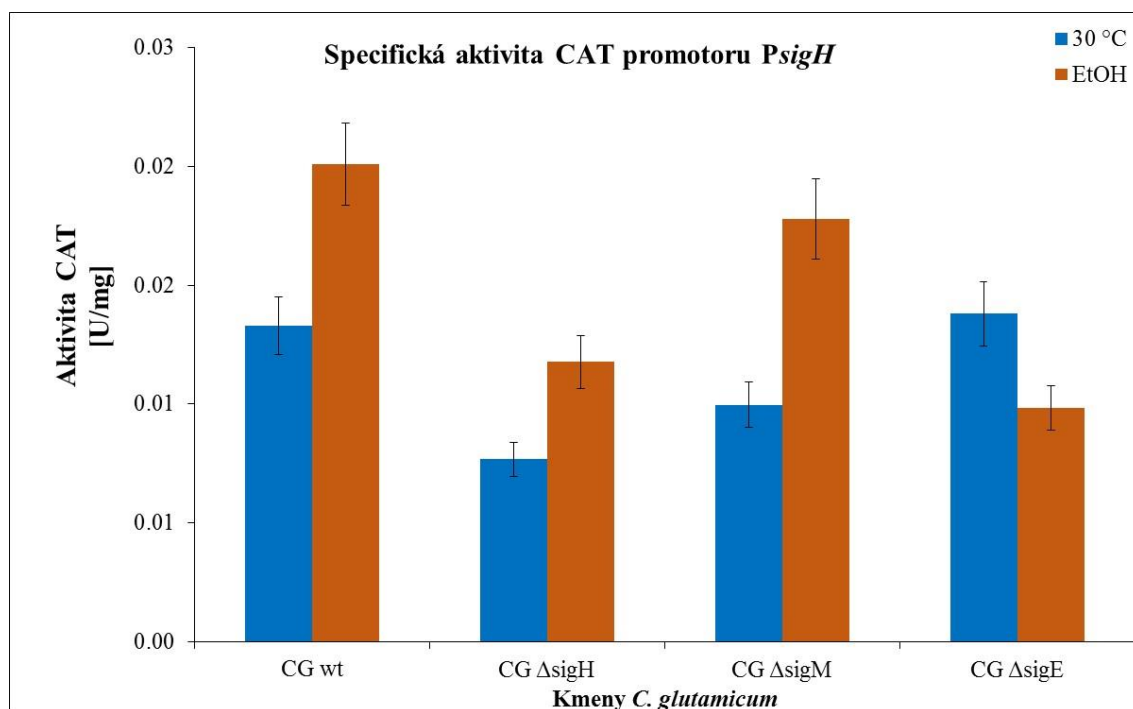


**Obr. 4.3 – Vliv tepelného šoku na aktivitu promotorové oblasti genu *sigH* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30  $^{\circ}\text{C}$ ) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40  $^{\circ}\text{C}$ , 60 min). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

U divokého kmene *C. glutamicum* je patrné zvýšení promotorové aktivity po tepelném šoku oproti hodnotám naměřených za standardních podmínek. Tento výsledek dokazuje, že naklonovaná promotorová oblast genu *sigH* obsahuje aktivní promotor, jehož aktivita se zvyšuje působením zvýšené teploty. Naměřené promotorové aktivity u většiny kmenů *C. glutamicum* s delecemi v *sig* genech se za standardních podmínek výrazně neliší od divokého kmene, po účinku tepelného šoku jsou však viditelně nižší. Největší rozdíl oproti divokému kmeni je po tepelném šoku patrný u kmene  $\Delta sigH$  s chromosomální delecí v genu *sigH*.

Následující experimenty byly zaměřeny na sledování vlivu dalších stresů na aktivitu promotorové oblasti *PsigH*. Byly testovány následující typy stresů: etanolový (10% etanol v médiu), disulfidový (2mM diamid v médiu) a oxidativní (1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v médiu). Buňky byly vystaveny výše zmíněným stresovým faktorům po dobu 15 min.

Výsledky jsou znázorněny na Obr. 4.4 (etanolový stres), Obr. 4.5 (oxidativní stres) a Obr. 4.6 (disulfidový stres).

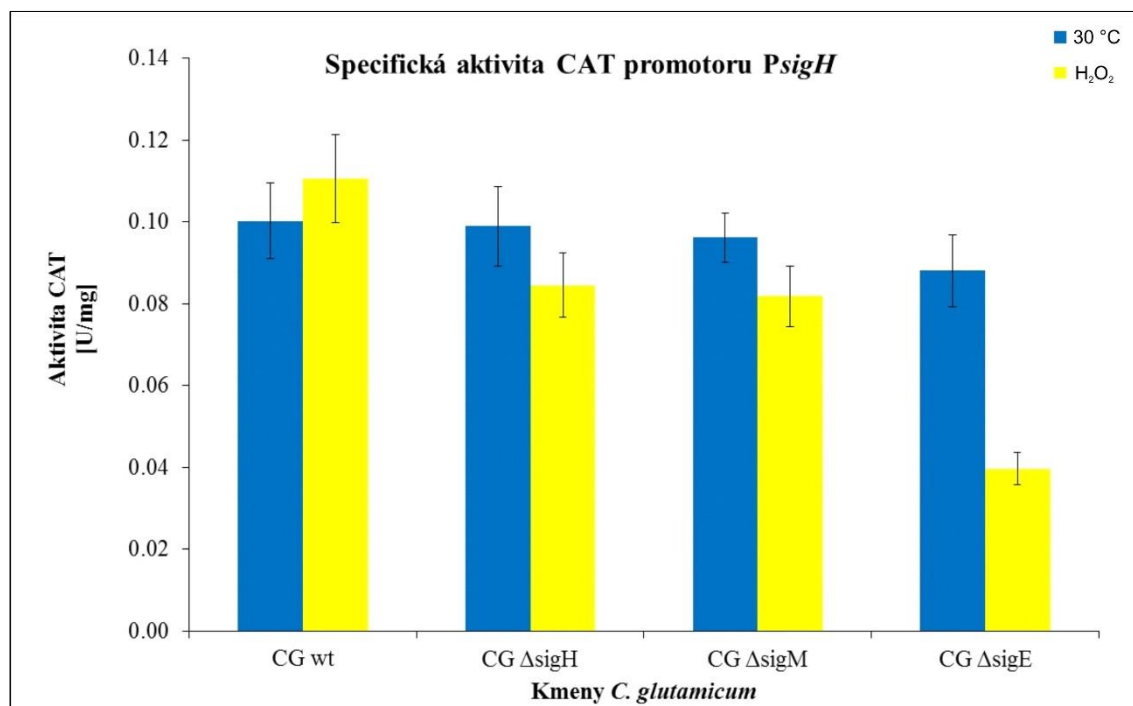


**Obr 4.4 – Vliv etanolového stresu na aktivitu promotorové oblasti genu *sigH* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek etanolového stresu (hnědý sloupec, 10% etanol v médiu, 15 min). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z naměřených hodnot je patrné zvýšení aktivity promotoru *PsigH* působením etanolového stresu o 51 % u divokého kmene *C. glutamicum*. U delečních kmenů  $\Delta sigH$

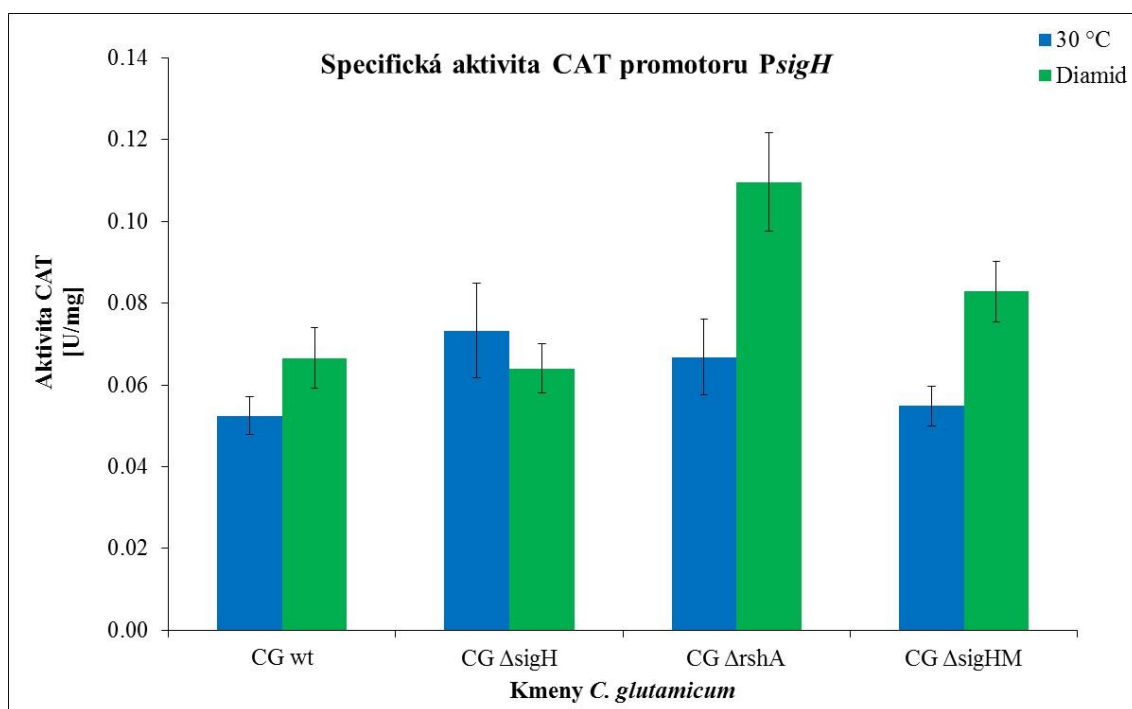


a  $\Delta sigM$  došlo rovněž ke zvýšení promotorové aktivity, avšak u kmene  $\Delta sigE$  naopak ke snížení aktivity účinkem etanolového stresu.



**Obr 4.5 – Vliv oxidativního stresu na aktivitu promotorové oblasti genu *sigH* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek oxidativního stresu (žlutý sloupec, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v médiu, 15 min). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Aktivita promotoru *PsigH* u divokého kmene *C. glutamicum* působením H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stoupla o 10 %. Promotorová aktivita naopak působením oxidativního stresu klesla u všech delečních kmenů  $\Delta sigH$ ,  $\Delta sigM$  a  $\Delta sigE$ .



**Obr 4.6 – Vliv disulfidového stresu na aktivitu promotorové oblasti genu *sigH* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek disulfidového stresu (zelený sloupec, 2mM diamid v médiu, 15 min). Znárodně výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

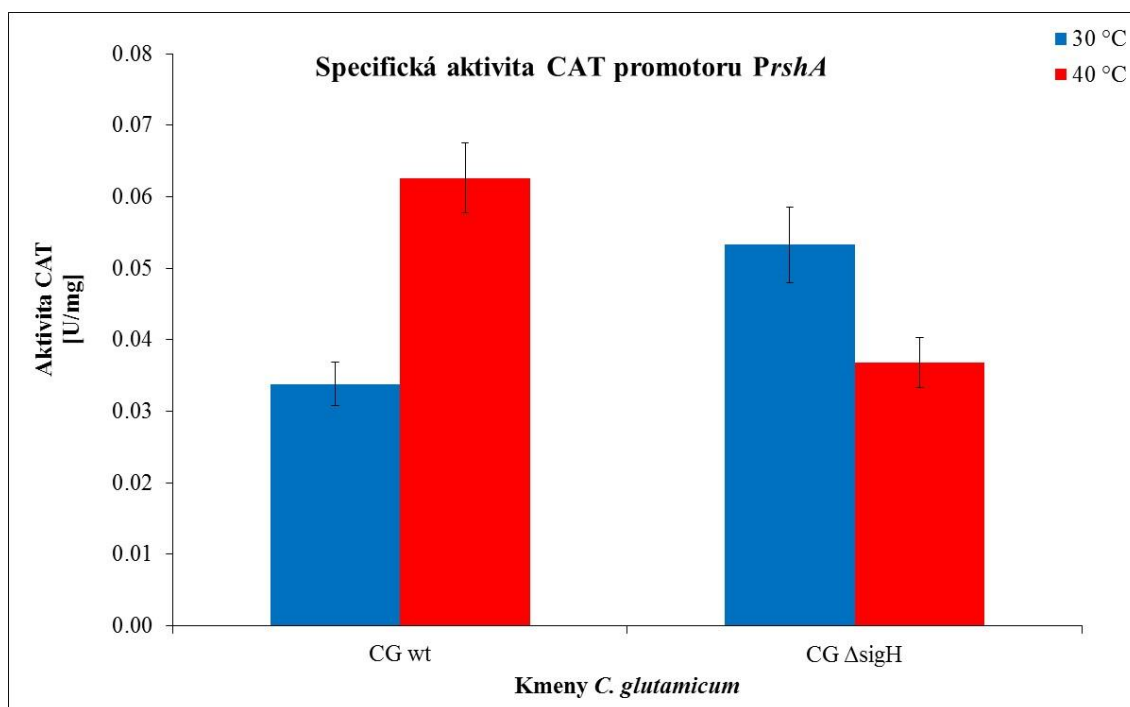
Účinkem disulfidového stresu došlo ke zvýšení promotorové aktivity u divokého kmene, a to o 27 % oproti naměřeným hodnotám za standardních podmínek. U kmene s dvojitou delecí  $\Delta$ *sigHM* a kmene  $\Delta$ *rshA* je patrné zvýšení promotorové aktivity, zatímco u delecčního kmene  $\Delta$ *sigH* došlo k mírnému snížení aktivity působením disulfidového stresu.

Z naměřených výsledků aktivit CAT promotorové oblasti *PsigH* vyplývá, že aktivita promotorové oblasti genu *sigH* je ovlivněna různými typy stresových podmínek. Lze tedy předpokládat, že sigma faktor SigH se aktivně účastní regulace exprese genů zejména za podmínek tepelného šoku, oxidativního, etanolového a disulfidového stresu.

#### 4.2.3. Měření aktivity promotoru genu *rshA*

Klony nesoucí vektor pET2 s naklonovaným fragmentem obsahujícím promotor *PrshA* byly použity pro stanovení promotorové aktivity v různých kmenech *C. glutamicum*. Aktivita promotoru *PrshA* byla měřena za standardních fyziologických podmínek (30 °C) a za podmínek tepelného šoku (40 °C po dobu 60 minut).

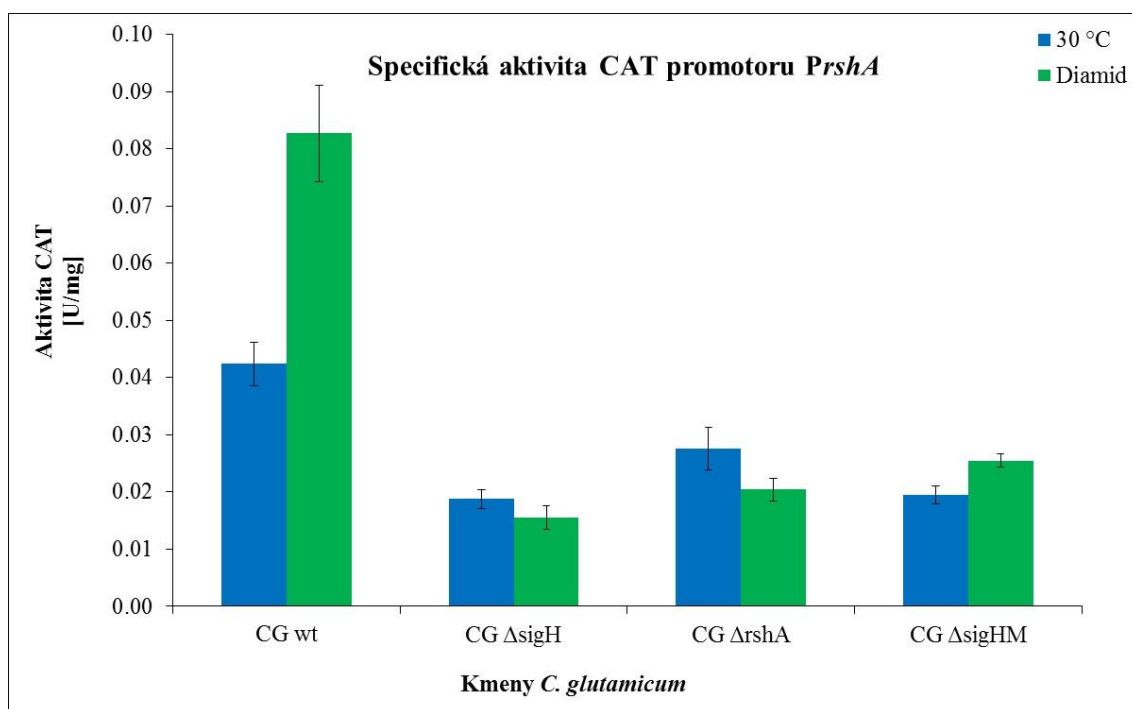
Výsledky měření specifických aktivit CAT promotoru *PrshA* jsou znázorněny na Obr. 4.7.



**Obr. 4.7 – Vliv tepelného šoku na aktivitu promotoru *PrshA* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek tepelného stresu (červený sloupec, 40 °C, 60 min). Znárodněné výsledky jsou aritmetické průměry ze čtyř nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

U divokého kmene *C. glutamicum* došlo u promotoru *PrshA* ke zvýšení promotorové aktivity po tepelném šoku o 85 % oproti hodnotám naměřených za standardních podmínek. U delečního kmene  $\Delta$ sigH došlo naopak účinkem tepelného šoku ke snížení promotorové aktivity oproti hodnotám naměřeným za standardních podmínek.

Aktivita promotoru *PrshA* byla rovněž testována za podmínek disulfidového stresu přidáním diamidu do média o celkové koncentraci 2mM po dobu 15 min. Výsledky měření jsou znázorněny na Obr. 4.8.



**Obr. 4.8 – Vliv disulfidového stresu na aktivitu promotoru PrshA v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek disulfidového stresu (zelený sloupec, 2mM diamid, 15min). Znárodněné výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

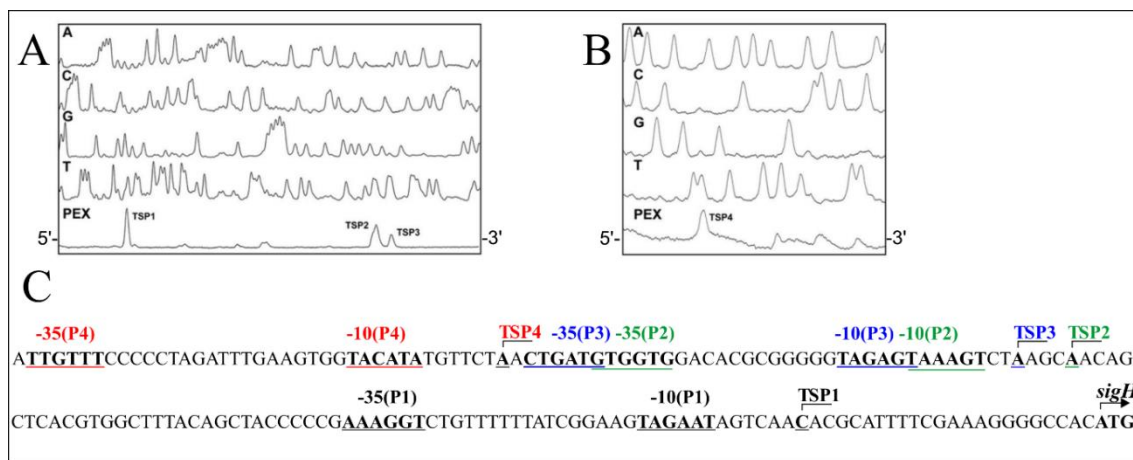
U divokého kmene *C. glutamicum* došlo ke zvýšení aktivity promotoru PrshA po disulfidovém stresu ve srovnání s hodnotami naměřenými za standardních podmínek. U delečních kmenů  $\Delta sigH$  a  $\Delta rshA$  došlo naopak účinkem stresových faktorů ke snížení promotorových aktivit v porovnání s divokým kmenem. U kmene s dvojitou delecí  $\Delta sigHM$  je patrný mírný nárůst aktivity po disulfidovém stresu.

Z naměřených výsledků aktivit promotoru PrshA vyplývá, že aktivita tohoto promotoru je ovlivněna delecí v genu *sigH* za podmínek tepelného šoku. Za podmínek diamidového stresu je patrný vliv na aktivitu promotoru u kmenů s delecemi v genech *sigH* a *rshA*.

#### 4.2.4. Určení transkripčních startů genu *sigH*

Pro analýzu struktury promotorové oblasti genu je potřebné znát transkripční starty, od kterých lze odvodit promotorové motivy -10 a -35. Pro přesné určení 5' konců příslušných mRNA, a tedy transkripčních startů (TSP) genu *sigH*, byla použita neradioaktivní metoda PEX. Kmen *C. glutamicum*/pET2/*sigH* byl kultivován za stejných podmínek jako v experimentu pro měření aktivity CAT. Reverzní transkripce proběhla s primerem CM4 (značeným fluoresceinem), jehož sekvence je komplementární se

sekvencí vektoru pET2 *downstream* od klonovaného fragmentu. Reverzní transkripce z tohoto primeru probíhá opačným směrem než transkripce z klonovaného fragmentu, čímž lze získat začátek mRNA klonovaného úseku DNA. Získaná jednořetězcová cDNA byla analyzována v polyakrylamidovém gelu na sekvenátoru A.L.F. Současně se sekvenací cDNA byla sekvenována i DNA sledovaného konstruktů s použitím stejného primeru CM4 (na obrázku 4.9A a 4.9B označeno jako kontrolní sekvence). Oba výsledky byly vizualizovány v programu Fragment Manager, kde poloha signálu z produktu reverzní transkripce byla přiřazena k příslušnému nukleotidu sekvenované DNA testovaného vzorku. Transkripční počátky jsou znázorněny na obrázku a popsány v textu.



**Obr. 4.9 – Výsledky reakcí primer-extension promotorové oblasti genu *sigH*.**

**A, B** - Dráhy A, C, G, T označují produkty sekvenační reakce DNA sledovaného konstruktů s použitím stejně značeného primeru CM4, dráhy PEX zobrazují identifikované transkripční počátky

**C** - Nukleotidová sekvence *upstream* oblasti genu *sigH* (sekvence je reverzně komplementární k sekvenci znázorněné sekvenační reakcí v části A a B).

Výsledek reakce *primer-extension* je znázorněn na Obr. 4.9. Dráhy s označením A, C, G, T zobrazují kontrolní sekvenační reakci v podobě čtyř bází, adenin, cytosin, guanin a thymin. Dráhy označené PEX zobrazují produkt sekvenace vzorku z kultivace za standardních podmínek. Z výsledku experimentů jsou patrné čtyři transkripční starty (TSP1, TSP2, TSP3, TSP4). Přesné určení transkripčního startu TSP4 bylo potvrzeno PEX analýzou konstruktů pET2/P4*sigH* (viz níže). Z tohoto důvodu je TSP4 znázorněn odděleně. Transkripčnímu startu TSP1 odpovídá adenin ve vzdálenosti 22 nt od translačního počátku genu *sigH*. Od polohy TSP1 byl následně odvozen příslušný promotor P1 s motivy -10 o sekvenci 5'-TAGAAT-3' a motiv -35 o sekvenci 5'-AAAGGT-3'. Další identifikované transkripční starty TSP2 a TSP3 odpovídají adeninům ve vzdálenostech 89 nt pro TSP2 respektive 93 nt pro TSP3 od translačního počátku genu

*sigH*. Odvozené příslušné hexamery promotorů P2 a P3 se vzájemně překrývají. V tomto případě se jedná o tzv. *overlapping promoters*. Hexamery oblastí -10 jsou tvořeny 5'-TAAAGT-3' (P2) a 5'-TAGAGT-3' (P3). Obě oblasti mají společný thymin (znázorněn tučně) ve vzdálenosti 101 nt od translačního počátku genu *sigH*. Promotorové oblasti -35 byly stanoveny 5'-GTGGTG-3' (P2) a 5'-CTGATG-3' (P3). Obě oblasti mají společný guanin (znázorněn tučně) ve vzdálenosti 124 nt od translačního počátku genu *sigH*. Na základě zjištěných -10 sekvencí lze usuzovat, že ve všech třech případech se jedná o vegetativní promotory rozeznávané primárním sigma faktorem SigA.

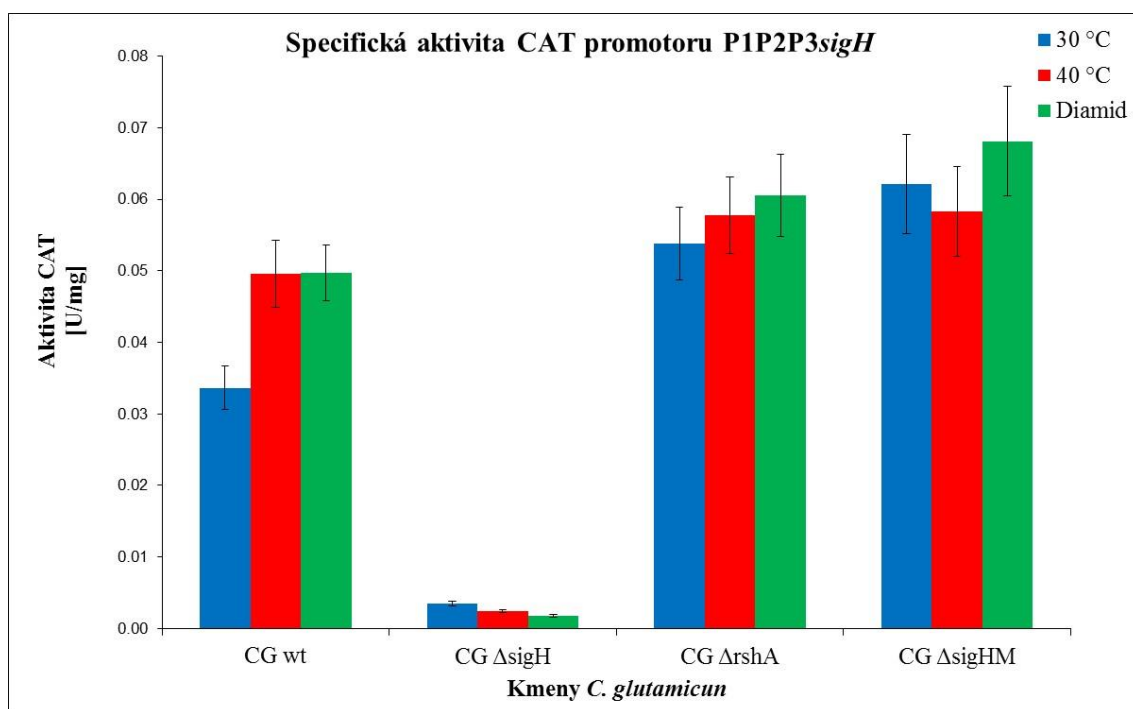
Výsledky experimentů PEX ukázaly na přítomnost dalšího transkripčního startu TSP4 (viz obrázek č. 4.9 B), který byl lokalizován 131 nt od translačního počátku genu *sigH*. Pro jeho přesné určení byl zkonstruován PCR fragment o velikosti 348 bp, který byl klonován do vektoru pET2. Z buněčného extraktu byla izolována RNA pro experiment 5' RACE (viz Materiál a metody, kapitola 3.2.9.2.) pro ověření transkripčního startu TSP4 jinou metodou a pro určení promotoru P4*sigH*. Následně byly odvozeny promotorové motivy -10 o sekvenci 5'-TACATA-3' a -35 o sekvenci 5'-TTGTTT-3'.

#### 4.2.5 Analýza promotorů P1P2P3*sigH* a P4*sigH*

Pro detailnější charakterizaci jednotlivých promotorů genu *sigH* byly připraveny konstrukty pET2/P1P2P3*sigH* a pET2/P4*sigH*.

Konstrukt pET2/P1P2P3*sigH* obsahoval promotorové oblasti transkripčních počátků TSP1, TSP2 a TSP3 genu *sigH* na PCR fragmentu o velikosti 280 bp. Po ověření správnosti sekvence metodou PCR byla DNA tohoto konstruktů přenesena do buněk různých kmenů *C. glutamicum*. Získané kmeny *C. glutamicum*/pET2/P1P2P3*sigH*, *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigH*/pET2/P1P2P3*sigH*, *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigHM*/pET2/P1P2P3*sigH* a *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA*/pET2/P1P2P3*sigH* byly kultivovány v komplexním médiu 2xYT s přísávkem kanamycinu za standardních podmínek a následně vystaveny tepelnému šoku 40 °C po dobu 60 min a disulfidovému stresu (2mM diamid) po dobu 15 minut. Z izolovaného buněčného extraktu byly měřeny specifické promotorové aktivity CAT.

Výsledky měření promotorové aktivity CAT jsou zobrazeny na Obr. 4.10.



**Obr. 4.10 – Vliv tepelného šoku a disulfidového stresu na aktivitu promotoru P1P2P3sigH v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40 °C, 60 min) a disulfidového stresu (zelený sloupec, 2mM diamid, 15min). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

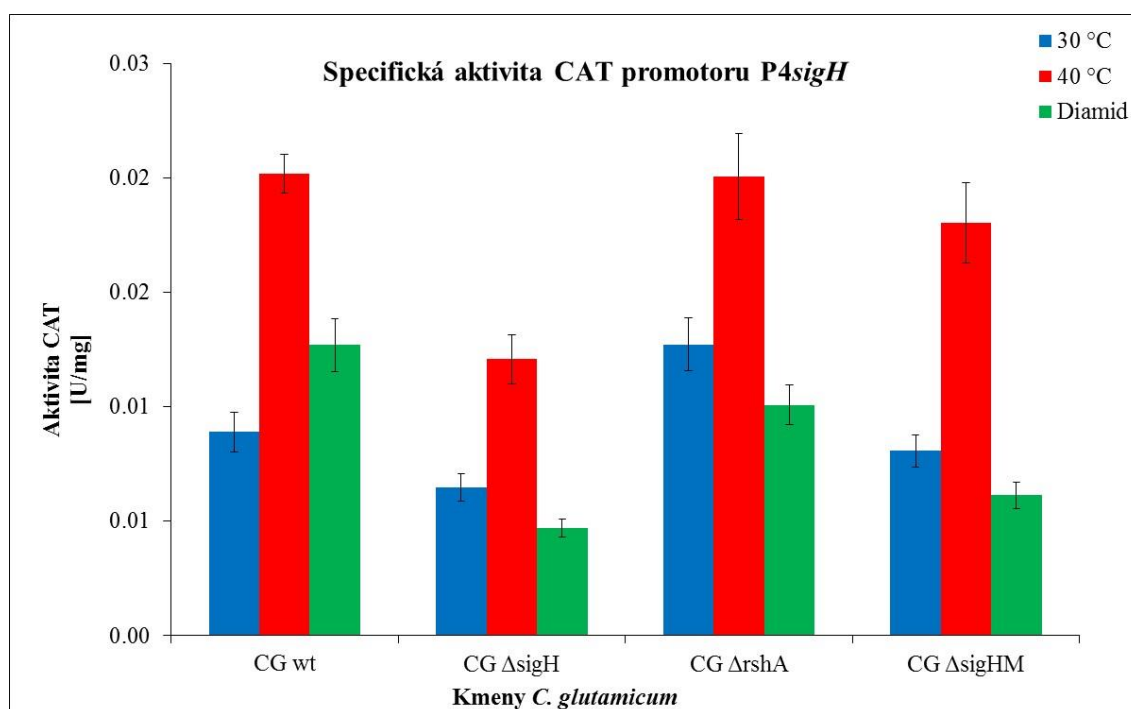
Hodnoty specifické aktivity CAT u naklonovaného fragmentu P1P2P3sigH se velmi liší v závislosti na fyziologických podmínkách a přítomnosti delece v genu pro sigma faktor. U divokého kmene *C. glutamicum* se aktivita promotoru zvýšila účinkem působení tepelného šoku a diamidu o 47 % oproti hodnotám naměřených za standardních podmínek. U kmene *C. glutamicum* ΔsigH byly za standardních podmínek naměřeny velmi nízké hodnoty aktivity CAT působením tepelného a disulfidového stresu. Nepatrný vliv působení stresových faktorů byl zaznamenán u kmene *C. glutamicum* ΔrshA. U delečního kmene *C. glutamicum* ΔsigHM bylo naměřeno snížení promotorové aktivity účinkem tepelného šoku, avšak u disulfidového stresu došlo ke zvýšení promotorové aktivity.

Výsledky měření specifických aktivit CAT ukazují, že promotorová oblast P1P2P3sigH je aktivována tepelným šokem a disulfidovým stresem. Z výsledků je rovněž patrné, že delece v genu sigH kódujícího alternativní sigma faktor SigH měla vliv na aktivitu promotorové oblasti P1P2P3sigH.

Získaný rekombinantní plazmid pET2/P4sigH byl transformován do buněk *E. coli* a následně přenesen do buněk různých kmenů *C. glutamicum*. Získané konstrukty *C.*

*glutamicum*/pET2/P4*sigH*, *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigH*/pET2/P4*sigH*, *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigHM*/pET2/P4*sigH* (kmen s dvojitou mutací v genech *sigH* a *sigM*) a *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA*/pET2/P4*sigH* byly kultivovány v komplexním médiu 2xYT s přidavkem kanamycinu za standardních podmínek a následně vystaveny tepelnému šoku 40 °C po dobu 60 min a disulfidovému stresu (2mM diamid) po dobu 15 minut. Z izolovaného buněčného extraktu byly měřeny specifické aktivity CAT.

Naměřené hodnoty specifických promotorových aktivit CAT konstruktů pET2/P4*sigH* jsou zobrazeny na Obr. 4.11.



**Obr. 4.11 – Vliv tepelného šoku a disulfidového stresu na aktivitu promotoru P4*sigH* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40 °C, 60 min) a disulfidového stresu (zelený sloupec, 2mM diamid, 15min). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze tří nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z naměřených výsledků je patrné, že v naklonované DNA fragmentu P4*sigH* se nachází promotorová oblast, která je indukována tepelným i disulfidovým stresem. U všech sledovaných kmenů došlo ke zvýšení aktivity promotoru následkem zvýšené teploty, u divokého kmene *C. glutamicum* se aktivita zvýšila o 128 %, *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigH* o 85 %, *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA* 58 % a *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigHM* o 121 % oproti hodnotám naměřených za standardních podmínek. Za podmínek disulfidového stresu se aktivita CAT zvýšila jen u divokého kmene *C. glutamicum* (zvýšení aktivity o 128 %). U delečních kmenů je viditelné snížení promotorové aktivity oproti hodnotám naměřených

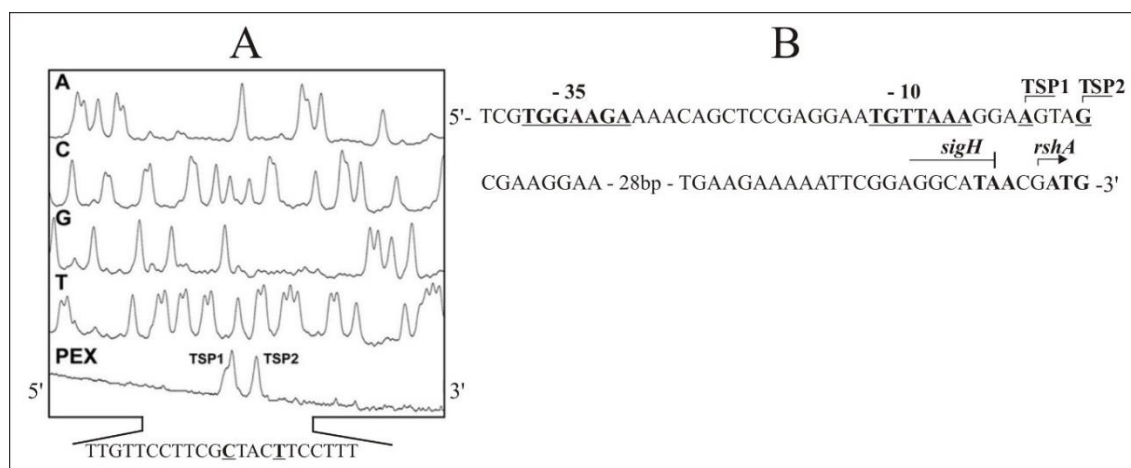


za standardních podmínek. Z dosažených výsledků vyplývá, že aktivita promotoru P4*sigH* je ovlivněna delecí v genu *sigH*, zejména za podmínek tepelného šoku a disulfidového stresu.

#### 4.2.6. Určení transkripčních startů genu *rshA*

Pro analýzu struktury promotorové oblasti genu *rshA* byla použita výše popsaná metoda *primer-extension*. Konstrukt *C. glutamicum*/pET2/*rshA* byl kultivován za stejných podmínek jako v experimentu pro měření aktivity CAT tedy za standardních podmínek (30 °C) a současně za podmínek tepelného šoku (40 °C, 60 min). Buněčná kultura byla zpracována a pelet byl stočen centrifugací a uchován v -70 °C (dále viz kapitola materiál a metody, 3.2.9.1.).

Identifikované transkripční počátky genu *rshA* metodou *primer-extension* jsou znázorněny na Obr. 4.12 a popsány v textu.



**Obr. 4.12 - Výsledky reakcí *primer-extension* promotorové oblasti genu *rshA*.**

**A** - Dráhy A, C, G, T označují produkty sekvenční reakce DNA sledovaného konstruktů s použitím stejně značeného primeru CM4, dráhy PEX zobrazují identifikované transkripční počátky.

**B** - Nukleotidová sekvence *upstream* oblasti genu *rshA* (sekvence je reverzně komplementární k sekvenci znázorněné v části A).

Z výsledků *primer-extension* jsou patrné dva transkripční starty lokalizované na bázích guaninu (TSP1) a adeninu (TSP2) ve vzdálenostech 62 nt respektive 66 nt od translačního počátku genu *rshA*. Na základě získaných transkripčních startů byly odvozeny sekvence promotorových oblastí -10 (5'-TGTTAAA-3') a -35 (5'-TGGAAGA-3'). Podle sekvencí -10 a -35 lze předpokládat, že promotor genu *rshA* je rozeznáván alternativním ECF sigma faktorem SigH.

### 4.3. DNA Microarray analýza kmene *C. glutamicum* $\Delta rshA$

Sigma faktor SigH je za standardních podmínek vázán s anti-sigma faktorem RshA, což způsobuje jeho inaktivaci. Za podmínek buněčného stresu je tato reverzibilní vazba zrušena a sigma faktor SigH je uvolněn. Lze proto předpokládat, že trvalé uvolnění vazby SigH-RshA by způsobilo zvýšenou expresi genů rozeznávaných sigma faktorem SigH i bez navození stresových podmínek v prostředí. K tomuto účelu byl sestrojen kmen *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  nesoucí delecii v genu *rshA* kódujícím anti-sigma faktor RshA. Konstrukce mutantního kmene byla provedena analogicky podle již publikovaného postupu (Ruckert *et al.*, 2003). K identifikaci genů se zvýšenou expresí, u nichž lze předpokládat, že jsou regulovány sigma faktorem SigH, byla použita metoda DNA Microarray. Transkripční profil delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  byl porovnán s divokým kmenem *C. glutamicum*. Oba kmeny byly kultivovány v tekutém minimálním médiu CGXII za standardních podmínek. Izolovaná celková RNA z obou kmenů respektive jejich cDNA byla použita pro mapování transkripčních profilů metodou DNA Microarray (viz kapitola Materiál a metody, 3.2.8.). Tento experiment byl proveden ve spolupráci na pracovišti s laboratoří Microbial Genomics and Biotechnology, Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, SRN.

Výsledky experimentu DNA Microarray jsou zaznamenány v Tabulce 4.1 a zobrazeny na Obr. 4.13.

**Tabulka 4.1** - Přehled genů se zvýšenou hladinou exprese u kmene *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  v porovnání s divokým kmenem *C. glutamicum* za standardních podmínek s použitím metody *Microarray hybridisation* (Busche *et al.*, 2012).

Číslo genu <sup>a</sup>	Název genu	Funkce	'Fold change' <sup>b</sup>
<b><i>Geny účastníci se disulfidového stresu</i></b>			
<u><i>cg3405</i></u> <sup>*</sup>	<i>zdo</i>	Zn-dependentní oxidoreduktasa	13.27
<u><i>cg2538</i></u>		FMN-dependentní alkanalmonooxygenasa	12.3
<u><i>cg2838</i></u>		Předpokládaná dithiol-disulfidisomerasa	11.71
<u><i>cg3236</i></u>	<i>msrA</i>	Protein-methionin-S-oxidoreduktasa	6.59
<u><i>cg2194</i></u>	<i>mtr</i>	Předpokládaná NADPH-dependentní mykothiolreduktasa	4.92
<u><i>cg1709</i></u> <sup>*</sup>	<i>mshC</i>	Předpokládaná 1-D-myo-inosityl-2-amino-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside—L-cysteinligasa	4.47
<u><i>cg3299</i></u>	<i>trxBI</i>	Thioredoxin (TRX)	3.73
<u><i>cg2078</i></u>	<i>msrB</i>	Peptid methionin sulfoxid reduktasa	3.61
<u><i>cg3422</i></u> <sup>o*</sup>	<i>trxB</i>	Thioredoxin reduktasa	3.53
<u><i>cg3423</i></u> <sup>o</sup>	<i>trxC</i>	Thioredoxin (TRX)	2.97
<u><i>cg2661</i></u>		Předpokládaná dithiol-disulfid isomerasa	2.68

<u>cg3344</u>		Předpokládaná nitroreduktasa	2.66
<u>cg1127</u> ▪	<i>mca</i>	Předpokládaná mykothiol S-konjugativní amidasa	2.46
<u>cg2214</u>		Předpokládaná [Fe-S]redoxní enzym	2.27
<u>cg0497</u> □*	<i>hemA</i>	Glutamyl-tRNA reduktasa	2.07
<u>cg1765</u>	<i>sufR</i>	Transkripční represor <i>suf</i> operonu	1.75
<u>cg1553</u>	<i>qor2</i>	Chinon oxidoreduktasa účastníci se odpovědi na disulfidový stres	1.60
<u>cg1375</u>		Předpokládaný thioredoxin (TRX)	1.58
<b>Geny účastníci se tepelného šoku</b>			
<u>cg2515</u>	<i>dnaJ2</i>	Chaperon, obsahující Zn-finger doménu na C-konci	1.85
<u>cg2644</u> ○	<i>clpP2</i>	Endopeptidasa Clp, proteolytická podjednotka	1.68
<u>cg3079</u> ●*	<i>clpB</i>	Předpokládaná ATP-dependentní proteasa (protein tepelného šoku)	1.57
<u>cg2645</u> ○*	<i>clpP1</i>	Endopeptidasa Clp, proteolytická podjednotka	1.57
<b>SOS odpověď a opravy DNA</b>			
<u>cg1555</u>	<i>uvrD3</i>	DNA/RNA helikasa, superrodina I	3.78
<u>cg1560</u>	<i>uvrA</i>	Exonukleasa ABC, podjednotka A ATPasy	2.23
<u>cg0184</u> ^*		Předpokládaný RNA-vazebný protein	1.95
<u>cg0185</u> ^		Předpokládaná glyoxalasa	1.91
<u>cg0186</u> ^		Předpokládaná methylovaný-DNA-protein-cystein methyltransferasa	1.91
<u>cg1795</u>	<i>uvrC</i>	Exonukleasa podjednotka C	1.53
<b>Komponenty Proteasomu</b>			
<u>cg1688</u> ○	<i>pafA2</i>	Předpokládaná proteasomová komponenta	2.71
<u>cg1689</u> ○*	<i>pup</i>	Prokaryotický ubiquitin-like protein	2.48
<u>cg0998</u>		Trypsin-like serin proteasa	1.54
<b>Geny s ostatní funkcí</b>			
<u>cg3407</u> ◇		Předpokládaný membránový protein	6.41
<u>cg2106</u>		Konservovaný hypotetický protein	6.19
<u>cg0617</u> †*		Hypotetický protein	4.20
<u>cg1288</u>		Domnělá vícelátková efluxní permeasa, typu MFS	3.94
<u>cg1432</u>	<i>ilvD</i>	Dehydratasa dihydroxykyselin	3.84
<u>cg1398</u> ‡		Konservovaný hypotetický protein	3.78
<u>cg0614</u> ‡		Hypotetický protein	3.71
<u>cg0616</u> ‡	<i>fdhD</i>	Předpokládaná formát dehydrogenasa, rodina FdhD	3.71
<u>cg1397</u> ‡*	<i>trmU</i>	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferasa	3.71
<u>cg2423</u>	<i>lipA</i>	Lipoyl syntetasa	3.34
<u>cg0378</u>		Předpokládaný Phage-aasociovaný protein	2.93
<u>cg2411</u>		Konzervovaný hypotetický protein, rodina HesB/YadR/YfhF	2.81
<u>cg1799</u> ●*	<i>ribC</i>	Riboflavin syntasa, alfa řetězec	2.73

<i>cg2247</i>		Hypotetický protein	2.41
<i>cg1282</i>		Konservovaný hypotetický protein	2.35
<i>cg2127</i>		Hypotetický protein	2.35
<i>cg3424</i> ◦	<i>cwlM</i>	N-Acetylmuramoyl-L-alanine amidasa	2.33
<i>cg1798</i> •	<i>ribA</i>	Předpokládaná GTP cyclohydrolasa II/3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphatesynthasa	2.22
<i>cg2835</i>		Předpokládaná acetyltransferasa	2.17
<i>cg1281</i>		Transporter typu ABC, ATPasová a permeasová podjednotka	2.16
<i>cg1687</i> ◦		Předpokládaný transkripční regulátor	2.13
<i>cg1797</i> •	<i>ribH</i>	Riboflavin syntasa, beta řetězec	2.10
<i>cg1779</i>	<i>opcA</i>	Glukosa-6-fosfát 1-dehydrogenasová podjednotka	2.06
<i>cg2762</i>	<i>murI</i>	Glutamáteracemasa	2.03
<i>cg3078</i> •		Hypotetický protein	1.97
<i>cg1411</i> ◦	<i>rbsA</i>	Transporter ribosy, ATPasová podjednotka (TC 3.A.1.2.1)	1.92
<i>cg2636</i>	<i>catA</i>	Katechol 1,2-dioxygenasa	1.88
<i>cg1780</i>	<i>pgl</i>	6-Fosfoglukonolaktonasa	1.87
<i>cg1413</i> ◦	<i>rbsB</i>	Transporter typu ABC- ribosy, ATPasová podjednotka (TC 3.A.1.2.1)	1.85
<i>cg0498</i> □	<i>hemC</i>	Porphobilinogenová deaminasa	1.84
<i>cg2665</i>		Hypotetický protein	1.82
<i>cg2181H</i> *		Transporter typu ABC- domnělý dipeptid/oligopeptid, substráto-vazebný lipoprotein	1.80
<i>cg1128</i> ▪		Hypotetický protein, podobný ribosomálnímu proteinu S2	1.79
<i>cg1139</i>		Allofanát hydrolasová podjednotka 2	1.75
<i>cg1708</i> ◦		Konservovaný protein	1.75
<i>cg2560</i>	<i>aceA</i>	Isocitrát lyasa	1.72
<i>cg2183F</i>		Transporter typu ABC, permeasová podjednotka	1.71
<i>cg2434</i>		Předpokládaná monooxygenasa, luciferasa	1.68
<i>cg0380</i>		Hypotetický protein	1.67
<i>cg0043</i>		Transporter typu ABC- mangan/zinek, ATPasová podjednotka	1.65
<i>cg0228</i>		Dvousložkový systém, senzory histidin kinázy, domnělá pseudogenasa	1.65
<i>cg1412</i> ◦	<i>rbsC</i>	Transporter ribosa, permeasová podjednotka (TC 3.A.1.2.1)	1.65
<i>cg1778</i>	<i>zwf</i>	Glukoso-6-fosfát 1-dehydrogenasa	1.65
<i>cg1686</i> ◦		Předpokládaný transkripční regulátor	1.61
<i>cg1482</i>		Předpokládaná Zn-dependentní hydrolasa	1.61
<i>cg2514</i>		Konservovaný hypotetický protein	1.59
<i>cg2206</i>	<i>ispG</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl difosfátová syntasa	1.58
<i>cg2546</i>		Předpokládaný sekundární transportér C4-dikarboxylových sloučenin patřící do rodiny TRAP-T	1.58
<i>cg0699</i>	<i>guaB2</i>	IMP dehydrogenasa	1.56

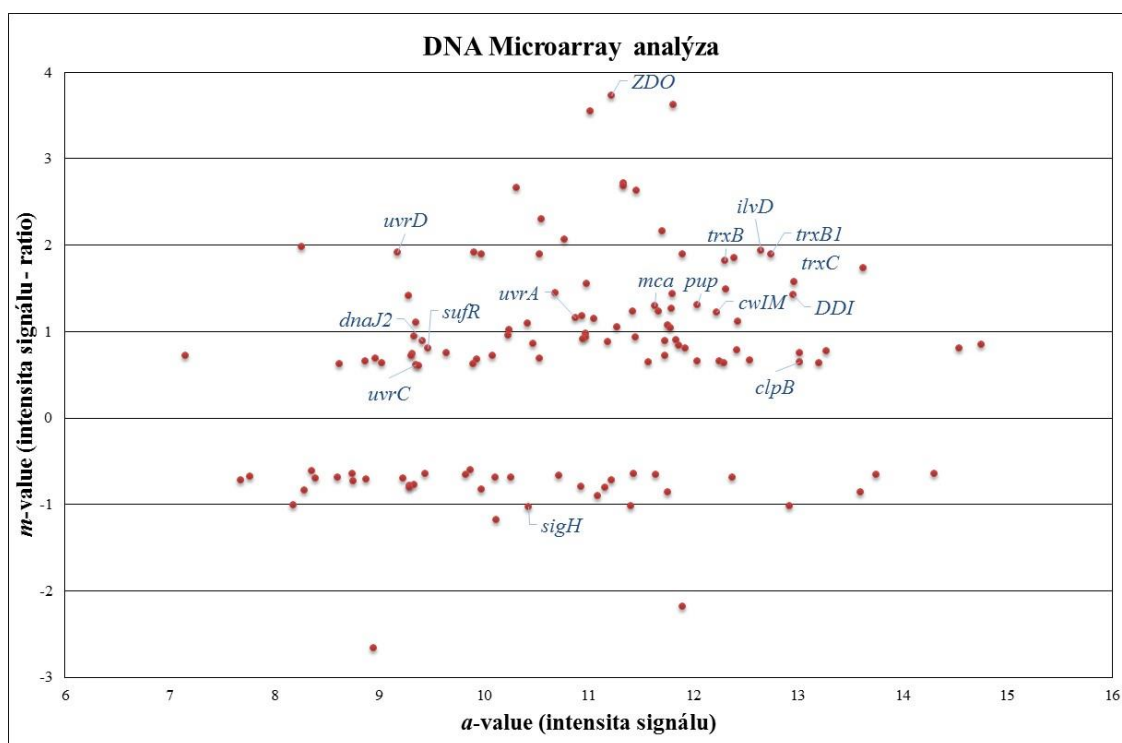
			Výsledky
<i>cg2184</i>		Předpokládaná ATPasová podjednotka transporteru typu ABC	1.56
<i>cg3077</i> ●		Předpokládaný Membránový protein	1.56
<i>cg1410</i> <sup>o*</sup>	<i>rbsR</i>	Transkripční represor ribosového importéru RbsACBD, LacI- rodina	1.54
<i>cg1464</i>		Transkripční regulátor, HTH_3-rodina	1.52

<sup>a</sup> - Geny sdružené do společného operonu jsou označeny stejným symbolem. První gen v operonu je označen hvězdičkou. Podtržené geny byly již dříve publikovány jako SigH-dependentní (Ehira *et al.*, 2009b) (Engels *et al.*, 2004).

<sup>b</sup> - *Fold change*, hodnota *signal intensity ratio* definována jako  $2^{(m-value)}$

Z výsledků analýzy DNA Microarray u sledovaných kmenů *C. glutamicum wt* a *C. glutamicum ΔrshA* vyplývá, že celkem 83 genů lokalizovaných v 61 transkripčních jednotkách vykazovalo vyšší expresi u delečního kmene ve srovnání s kmenem divokým. Mezi geny s nejvyšší expresí byly zaznamenány geny již dříve publikované jako SigH-dependentní (Ehira *et al.*, 2009b). Tyto výsledky potvrzují stanovený předpoklad, že aktivita sigma faktoru SigH je mnohem vyšší v případě nefunkčního proteinu RshA. Výsledky rovněž potvrzují předpoklad, že protein RshA figuruje jako anti-sigma faktor regulující v *in-vivo* podmínkách aktivitu sigma faktoru SigH. Analýzou DNA Microarray byly rovněž identifikovány nové geny, jejichž exprese je regulovaná systémem SigH-RshA. Mezi tyto geny patří: *uvrA* (*cg1560*) a *uvrC* (*cg1790*) kódující podjednotky exonukleasy ABC, dále pak gen *uvrD3* (*cg1555*) kódující jeden ze tří proteinů DNA helikasy. Systém SigH – RshA se rovněž podílí na regulaci exprese genového shluku *cg0184* - *cg0186*, který se pravděpodobně podílí na opravách DNA. Mezi další nově identifikované geny patří *pup* (*cg1689*) kódující *ubiquitin-like* protein a gen *cg0998* kódující *trypsin-like* proteasu. Poslední dva jmenované geny jsou součástí proteasomového komplexu.

Mezi geny, jejichž exprese byla naopak snížena v delečním kmeni *C. glutamicum ΔrshA* patří překvapivě gen *sigH*. Další geny dříve identifikované jako SigH-dependentní vykazovaly nízké kladné hodnoty poměru *m-value/α-value*, mezi tyto geny patří *dnaJ2*, *clpB*, *clpP1* a *clpP2*. Další geny patřící do operonu *dnaK – grpE*, *clpC*, *sigB* a většina genů patřící do *clusteru suf* vykazovala záporné hodnoty poměru *m-value/α-value*. Tento jev může být dán přítomností dalšího regulačního systému, který negativně ovlivňuje expresi těchto genů v nepřítomnosti stresových podmínek (tepelného šoku).



**Obr. 4.13 - Mapování transkripčního profilu kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ rshA v porovnání s divokým kmenem *C. glutamicum*.** Grafické znázornění poměru hodnot *m*-value (signal intensity ratio) a  $\alpha$ -value (signal intensity) získaných metodou DNA Microarray při porovnání transkripčního profilu delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ rshA s kmenem divokým. Geny se zvýšenou mírou exprese v kmenu *C. glutamicum*  $\Delta$ rshA jsou znázorněny kladnou hodnotou, zatímco zápornými hodnotami jsou znázorněny geny se zvýšenou mírou exprese v divokém kmenu *C. glutamicum*. Pouze hodnoty *m*-value vyšší než +0,6 a nižší než -0,6 byly považovány za významné. U vybraných genů jsou uvedeny názvy (Busche *et al.*, 2012).

#### 4.4. Analýza promotorů rozeznávaných alternativním sigma faktorem SigH

Na základě znalosti genomové sekvence *C. glutamicum* byly identifikovány geny, v jejichž *upstream* oblasti od translačního počátku se nachází hexamery, jejichž sekvence se podobají známým promotorům rozeznávaným alternativními ECF sigma faktory. Pro identifikaci příslušných promotorů byly tyto oblasti naklonovány do vektoru pET2 a vneseny transformací do kmenů *C. glutamicum*. Následně byly měřeny specifické aktivity reportérového enzymu CAT za různých fyziologických podmínek.

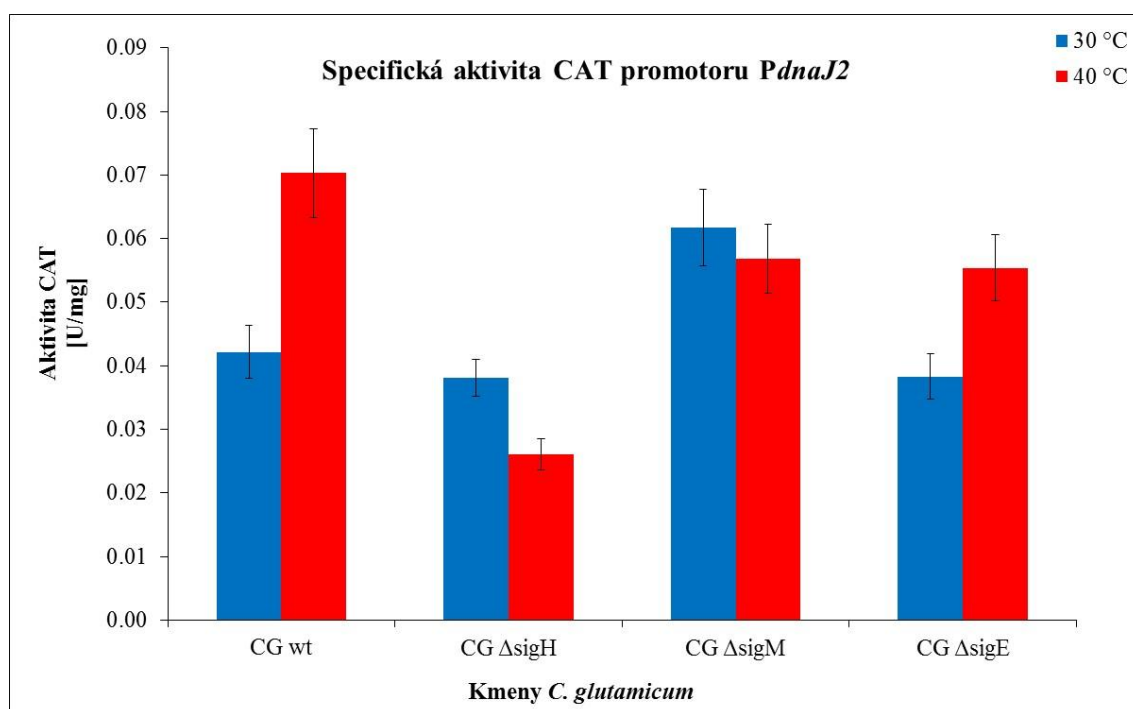
##### 4.4.1 Klonování a stanovení aktivit promotorů genu *dnaJ2* (*cg2515*)

Gen *dnaJ2* kóduje protein typu molekulárního chaperonu, který se účastní buněčné odpovědi na tepelný šok u *C. glutamicum*. Tento gen byl již dříve identifikován jako SigH-dependenční (Ehira *et al.*, 2009b).

Na základě znalosti sekvence DNA genomu *C. glutamicum* byly navrženy dvojice primerů tak, aby výsledné fragmenty DNA použité pro klonování dostatečně pokrývaly

*upstream* oblast vybraných genů v rozsahu, který je běžný pro výskyt promotorových oblastí. Fragменты byly připraveny PCR reakcí s použitím následující kombinace primerů: PDNAJ2F-PDNAJ2R pro syntézu fragmentu *PdnaJ2* o velikosti 550 bp. Získaný fragment byl klonován do *promoter-probe* vektoru pET2 a následně přenesen do buněk divokého kmene *C. glutamicum* a kmenů nesoucích delecí v genu kódujícím příslušný sigma faktor.

Aktivita jednotlivých fragmentů v kmenech *C. glutamicum* byla měřena za různých fyziologických podmínek. Výsledky měření promotorové aktivity CAT konstruktů pET2/*PdnaJ2* jsou znázorněny na Obr. 4.14.

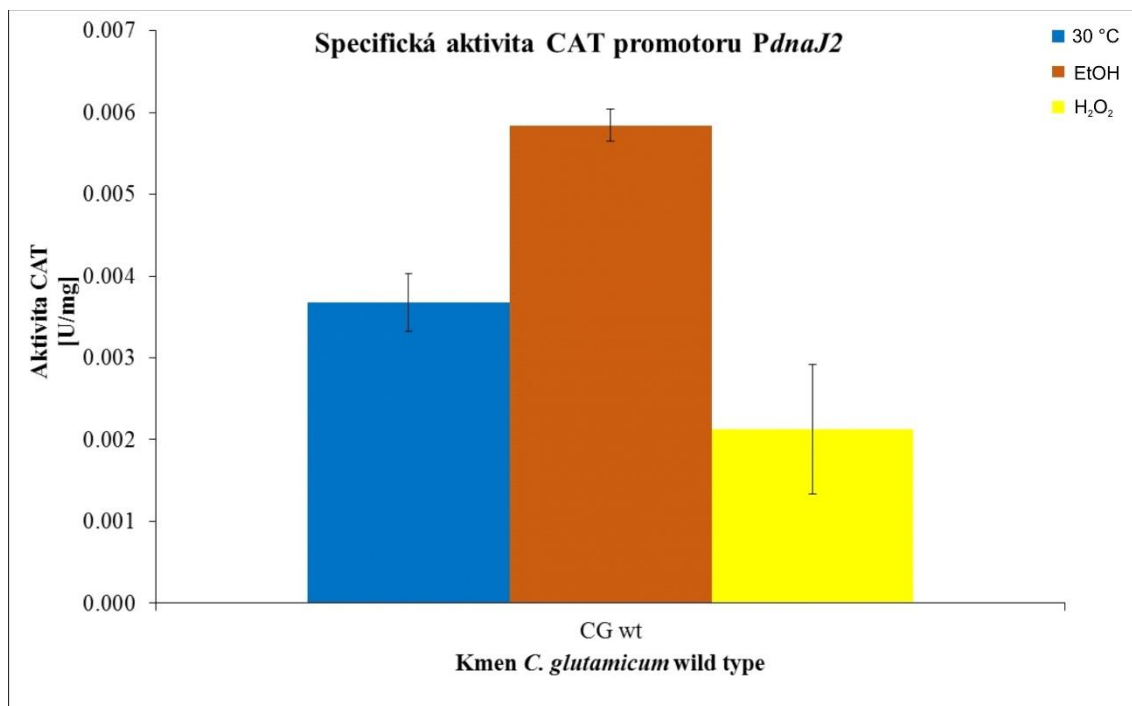


**Obr. 4.14 – Vliv tepelného šoku na aktivitu promotorové oblasti genu *dnaJ2* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40 °C). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze třech nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Hodnoty specifické aktivity CAT u naklonovaného fragmentu *PdnaJ2* jsou zvýšené účinkem tepelného šoku u divokého kmene *C. glutamicum* o 67 % oproti hodnotám naměřených za standardních podmínek. Zvýšení promotorové aktivity bylo rovněž zjištěno u delečního kmene  $\Delta$ sigE, kde došlo k nárůstu aktivity o 32 %. U kmene  $\Delta$ sigM se promotorová aktivita snížila účinkem tepelného šoku o 8 %. Největší rozdíl promotorových aktivit byl naměřen u delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ sigH. Vlivem tepelného šoku došlo ke snížení promotorové aktivity o 45 % oproti hodnotám naměřených za standardních podmínek.

Aktivita promotorové oblasti genu *dnaJ2* byla rovněž testována za podmínek etanolového (10% etanol, 15 min) a oxidativního (1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15 min) stresu. Promotorové aktivity byly měřeny jen u divokého kmene *C. glutamicum*.

Výsledky měření promotorové aktivity CAT jsou zobrazeny na Obr. 4.15.



**Obr. 4.15 – Vliv etanolového a oxidativního stresu na aktivitu promotorové oblasti genu *dnaJ2* u kmene *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek etanolového (hnědý sloupec, 10% etanol, 15 min) a oxidativního (1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15 min) stresu. Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze třech nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Z výsledků měření aktivit promotorové oblasti genu *dnaJ2* je patrné zvýšení účinkem etanolového stresu, kde byla naměřena vyšší aktivita o 57 % oproti hodnotám získaných za standardních podmínek. Nižší aktivita byla naměřena po působení oxidativního stresu, kde byla hodnota promotorové aktivity nižší o 40 % oproti hodnotám získaných za standardních podmínek.

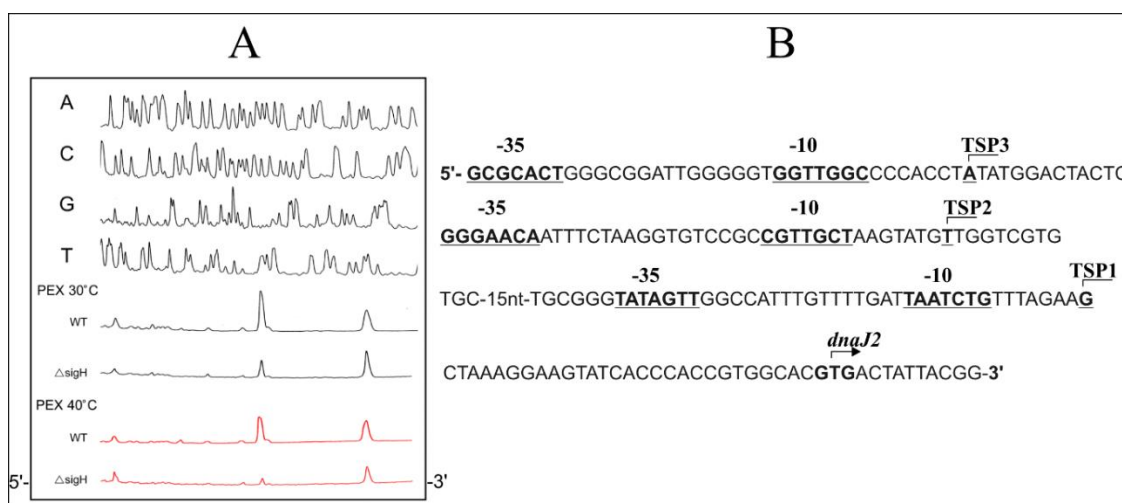
Z dosažených výsledků vyplývá, že aktivita promotorové oblasti genu *dnaJ2* je ovlivněna delecí v genu *sigH*, a tedy že se sigma faktor SigH podílí na regulaci exprese tohoto genu za podmínek tepelného šoku. Dále bylo zjištěno, že exprese genu *dnaJ2* je aktivována etanolovým stresem.



#### 4.4.2 Určení transkripčních startů genu *dnaJ2*

Pro analýzu struktury promotorové oblasti genu *dnaJ2* byla použita výše popsaná metoda *primer-extension*. Konstrukt *C. glutamicum*/pET2/*dnaJ2* byl kultivován za stejných podmínek jako v experimentu pro měření aktivity CAT tedy za standardních podmínek (30 °C) a současně za podmínek tepelného stresu (40 °C, 60 min). Buněčná kultura byla zpracována a pelet byl stočen centrifugací a uchován v -70 °C (dále viz kapitola materiál a metody, 3.2.9.1.).

Identifikované transkripční počátky genu *dnaJ2* metodou *primer-extension* jsou znázorněny na obrázku 4.16 a popsány v textu.



**Obr. 4.16 - Výsledky reakcí *primer-extension* promotorové oblasti genu *dnaJ2*.**

**A** - Dráhy A, C, G, T označují produkty sekvenční reakce DNA sledovaného konstruktů s použitím stejně značeného primeru CM4, dráhy PEX zobrazují identifikované transkripční počátky u kmenů *C. glutamicum* a *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  za standardních podmínek a za podmínek tepelného šoku.

**B** - Nukleotidová sekvence *upstream* oblasti genu *dnaJ2* (sekvence je reverzně komplementární k sekvenci znázorněné v části A) s vyznačenými transkripčními starty (TSP1, TSP2 a TSP3) a iniciačním start kodonem (*gtg*) genu *dnaJ2*.

Výsledky z experimentu *primer-extension* odhalily tři transkripční starty lokalizované na bázích guaninu (TSP1), thyminu (TSP2) a adeninu (TSP3) ve vzdálenostech 12 nt, 92 nt a 143 nt od translačního počátku genu *dnaJ2*. V experimentu byl použit fluoresceinem značený specifický primer CM4. K identifikovaným transkripčním startům byly odvozeny následující sekvence třech promotorových oblastí, pro TSP1 oblast -10 (5'-TAATCT-3') a -35 (5'-TATAGT-3'), TSP2 oblast -10 (5'-CGTTGC-3') a -35 (5'-GGGAAC-3') a TSP3 oblast -10 (5'-GGTTGG-3') a -35 (5'-GCGCAC-3'). Podle sekvencí -10 a -35 lze předpokládat, že promotor P1*dnaJ2* je rozeznáván primárním sigma faktorem SigA, zatímco promotor P2*dnaJ2* alternativním

ECF sigma faktorem SigH. Vzhledem k atypické sekvenci -35 promotoru P3*dnaJ2* je predikce sigma faktoru rozeznávajícího tento promotor obtížná.

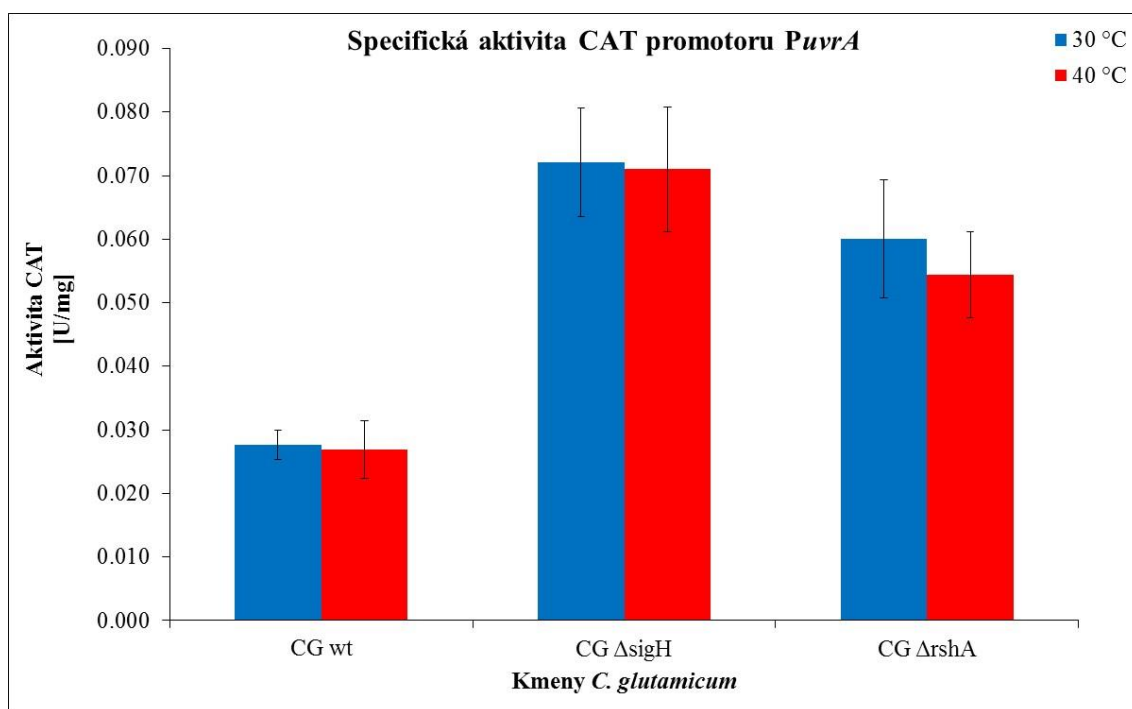
#### 4.4.3 Klonování a stanovení aktivit promotorů genů *uvrA* (*cg1560*) a *uvrD* (*cg1555*)

Gen *uvrA* (*cg1560*) kóduje protein nukleasu UvrA účastnící se excisní opravy DNA. Expresí genu *uvrD* vznikne RNA/DNA helikasa UvrD.

Na základě znalosti sekvence DNA genomu *C. glutamicum* byly navrženy dvojice primerů tak, aby výsledné fragmenty DNA použité pro klonování dostatečně pokrývaly *upstream* oblasti genů *uvrA* a *uvrD* v rozsahu, který je běžný pro výskyt promotorových oblastí. Fragmenty byly připraveny PCR reakcí s použitím následující kombinace primerů: PUVRAF-PUVRAR pro syntézu fragmentu *PuvrA* o velikosti 249 bp, PUVRDF-PUVRDR2 pro syntézu fragmentu *PuvrD* o velikosti 299 bp. Získané fragmenty byly klonovány do *promoter-probe* vektoru pET2 a transformovány do kompetentních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Získané konstrukty pET2/*PuvrA* a pET2/*PuvrD* byly pro kontrolu osekvenovány s použitím primeru CM4 a následně elektroporací přeneseny do divokého kmene *C. glutamicum* a kmenů nesoucích delecí v genu kódujícím příslušný sigma faktor. Klony obsahující naklonované konstrukty pET2/*PuvrA* a pET2/*PuvrD* byly použity pro stanovení promotorové aktivity na základě měření aktivity reportérového enzymu CAT. Aktivita jednotlivých fragmentů v kmenech *C. glutamicum* byla měřena za standardních podmínek (30 °C) a za podmínek tepelného šoku (40 °C, 60 min).

Výsledky měření specifických aktivit CAT jsou zobrazeny na Obr. 4.17.



**Obr. 4.17 – Vliv tepelného šoku na aktivitu promotorové oblasti genu *uvrA* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40 °C). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze třech nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

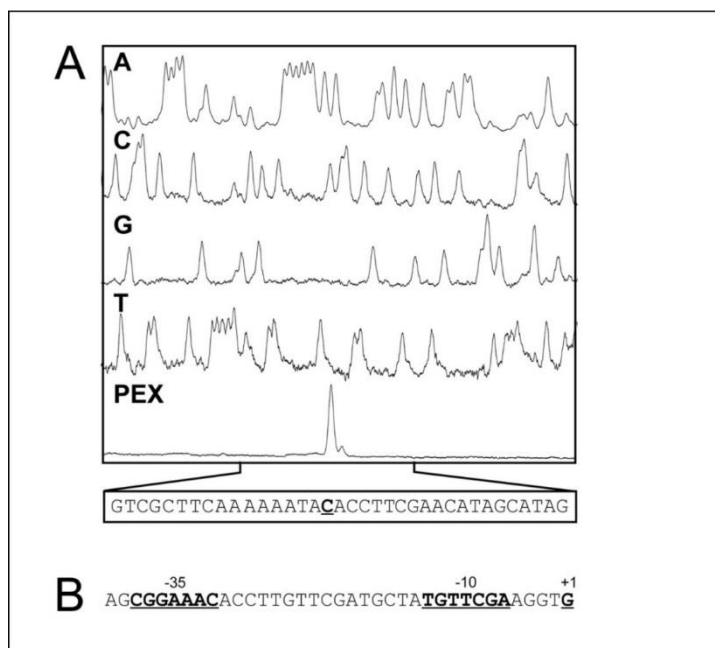
Z výše uvedených výsledků je patrné, že aktivita promotoru *PuvrA* nebyla ovlivněna tepelným šokem.

Specifická aktivita CAT při použití promotoru *PuvrD* dosahovala velmi nízkých hodnot jak při 30 °C ( $0,0049 \pm 0,0012$  U/mg proteinu), tak po tepelném šoku ( $0,0046 \pm 0,0013$  U/mg proteinu). U kmenů  $\Delta$ sigH a  $\Delta$ rshA se nepodařilo získat hodnoty, které by bylo možné statisticky doložit.

#### 4.4.4 Určení transkripčních startů genů *uvrA* a *uvrD*

Pro analýzu struktury promotorových oblastí genů *uvrA* a *uvrD* byla použita výše popsaná metoda *primer-extension*. Konstrukty testované pro měření specifické aktivity CAT byly kultivovány za stejných podmínek tedy za standardních podmínek (30 °C) a současně za podmínek tepelného stresu (40 °C, 60 min). Buněčné kultury byly stočeny centrifugací a buněčné pelety byly uchovány v -70 °C (dále viz kapitola materiál a metody, 3.2.9.1.).

Identifikované transkripční počátky genů *uvrA* a *uvrD* metodou *primer-extension* jsou zobrazeny na Obr. 4.18 a Obr. 4.19 a popsány v textu.



**Obr. 4.18 - Výsledky reakcí *primer-extension* promotorové oblasti genu *uvrA*.**

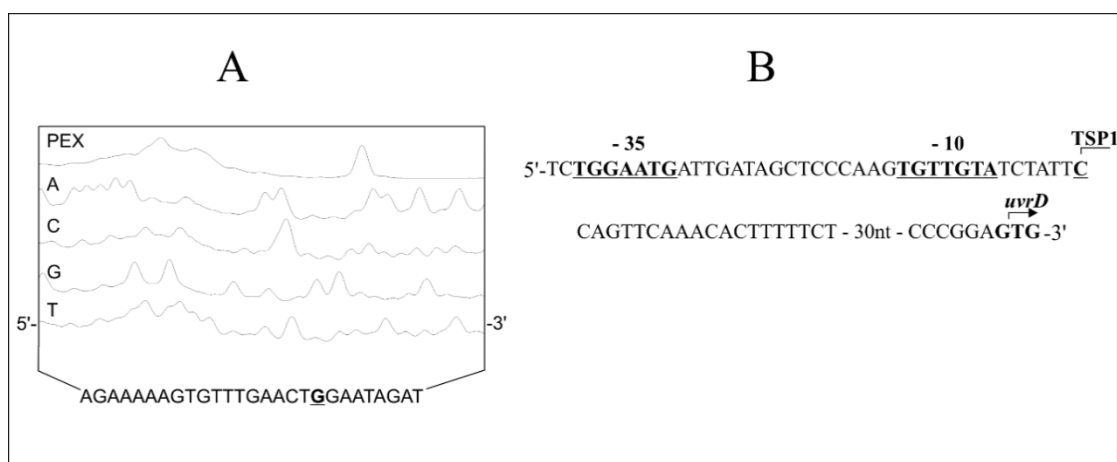
**A** - Dráhy A, C, G, T označují produkty sekvenační reakce DNA sledovaného konstruktů s použitím stejně značeného primeru CM4, dráha PEX zobrazuje identifikovaný transkripční počátek.

**B** - Nukleotidová sekvence *upstream* oblasti genu *uvrA* (sekvence je reverzně komplementární k sekvenci znázorněné v části A) s vyznačeným transkripčním startem a odvozenými promotorovými oblastmi -10 a -35.

Výsledky z experimentu *primer-extension* odhalily jeden transkripční start lokalizovaný na bázi guaninu (TSP1) ve vzdálenosti 46 nt od translačního počátku genu *uvrA*. V experimentu byl použit fluoresceinem značený specifický primer CM4. K identifikovanému transkripčnímu startu byly odvozeny následující sekvence promotorové oblasti -10 (5'-TGTTCGA-3') a -35 (5'-CGGAAAC-3') (Busche *et al.*, 2012).

V promotorové oblasti *PuvrD* byl metodou *primer-extension* identifikován jeden transkripční počátek na bázi cytosinu (TSP1) ve vzdálenosti 56 nt od translačního počátku genu *uvrD*. V experimentu byl rovněž použit fluoresceinem značený specifický primer CM4. K identifikovanému transkripčnímu startu byly odvozeny následující sekvence promotorové oblasti -10 (5'-TGTTGTA-3') a -35 (5'-TGG AATG-3') (Busche *et al.*, 2012).

Podle sekvencí -10 a -35 lze předpokládat, že promotory genů *uvrA* a *uvrD* jsou rozeznávány alternativním ECF sigma faktorem SigH.



**Obr. 4.19 - Výsledky reakcí primer-extension promotorové oblasti genu *uvrD*.**

**A** - Dráhy A, C, G, T označují produkty sekvenční reakce DNA sledovaného konstruktů s použitím stejně značeného primeru CM4, dráha PEX zobrazuje identifikovaný transkripční počátek.

**B** - Nukleotidová sekvence *upstream* oblasti genu *uvrD* (sekvence je reverzně komplementární k sekvenci znázorněné v části A) s vyznačeným transkripčním startem TSP1, promotorovými oblastmi -10 a -35 a iniciačním start kodonem (*gtg*) genu *uvrD*.

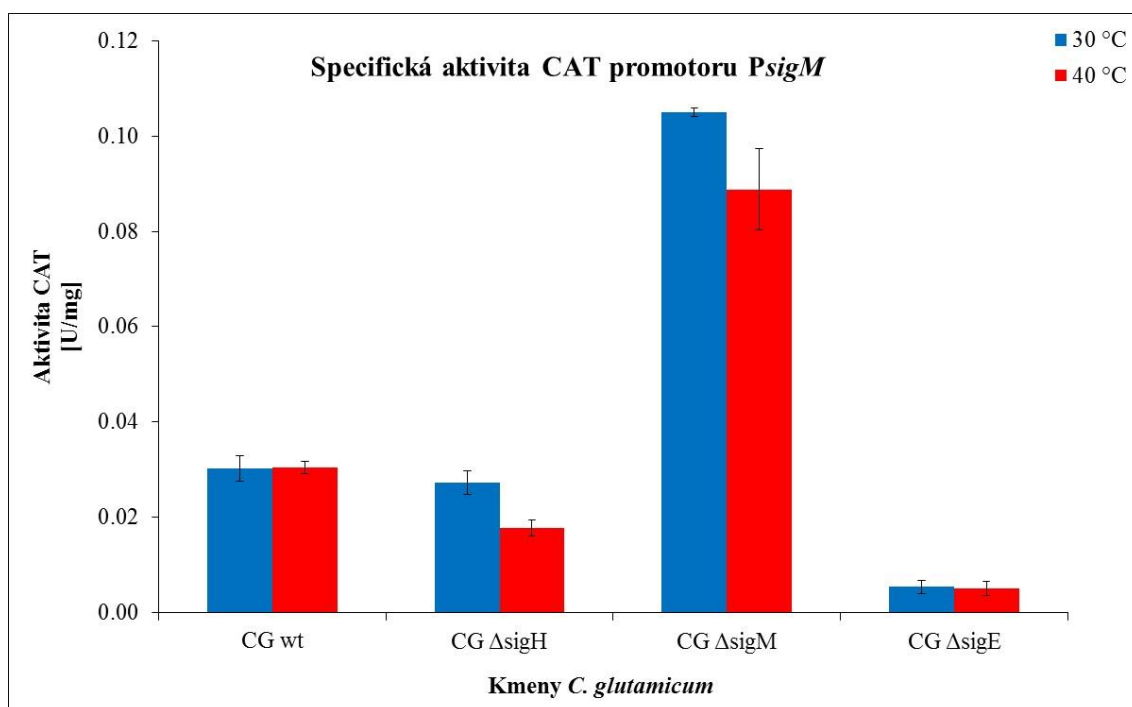
#### 4.4.5 Klonování a stanovení aktivity promotoru genu *sigM*

Gen *sigM* (*cg3420*) kóduje alternativní ECF sigma faktor SigM, který se účastní regulace exprese genů, jejichž produkty se účastní buněčné odpovědi na disulfidový a tepelný stres (Nakunst *et al.*, 2007).

Na základě znalosti sekvence DNA genomu *C. glutamicum* byla navržena dvojice primerů tak, aby výsledný fragment DNA použitý pro klonování dostatečně pokrýval *upstream* oblast genu *sigM* v rozsahu, který je běžný pro výskyt promotorových oblastí. Fragменты byly připraveny PCR reakcí s použitím následující kombinace primerů: PSIGMF-PSIGMR pro syntézu fragmentu *PsigM* o velikosti 543 bp. Získaný fragment byl klonován do *promoter-probe* vektoru pET2 a transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Získaný konstrukt pET2/*PsigM* byl elektroporací přenesen do divokého kmene *C. glutamicum* a kmenů nesoucích delecii v genu kódujícím příslušný sigma faktor. Klony obsahující konstrukt pET2/*PsigM* byly použity pro stanovení aktivity CAT. Aktivita jednotlivých fragmentů v kmenech *C. glutamicum* byla měřena za standardních podmínek (30 °C) a za podmínek tepelného šoku (40 °C, 60 min).

Výsledky měření specifických aktivit CAT jsou znázorněny na Obr. 4.20.



**Obr. 4.20 – Vliv tepelného šoku na aktivitu promotorové oblasti genu *sigM* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40 °C). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze třech nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

Hodnoty naměřených specifických aktivit CAT u všech sledovaných kmenů nevykazují zvýšení účinkem tepelného šoku. U divokého kmene *C. glutamicum* jsou hodnoty aktivity CAT za standardních podmínek a po tepelném šoku srovnatelné. U delečních kmenů *C. glutamicum*  $\Delta$ sigH a *C. glutamicum*  $\Delta$ sigM je patrný pokles promotorových aktivit o 35 % (kmen  $\Delta$ sigH) respektive o 15 % (kmen  $\Delta$ sigM). U delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ sigE jsou hodnoty aktivity CAT za standardních podmínek a po tepelném šoku srovnatelné. Aktivita v kmeni *C. glutamicum*  $\Delta$ sigE byla výrazně snižena v porovnání ostatními sledovanými kmeny. Nejvyšší aktivita CAT byla naměřena u delečního kmene  $\Delta$ sigM. Výsledky měření specifických aktivit CAT ukazují na vliv delece v genech *sigH* a *sigM* na aktivitu promotoru genu *sigM*.

Podrobná analýza promotorové oblasti genu *sigM* a mapování SigM-dependentních promotorů je tématem samostatné disertační práce Mgr. Hany Dostálové, prováděné v Laboratoři molekulární genetiky bakterií v MBÚ.

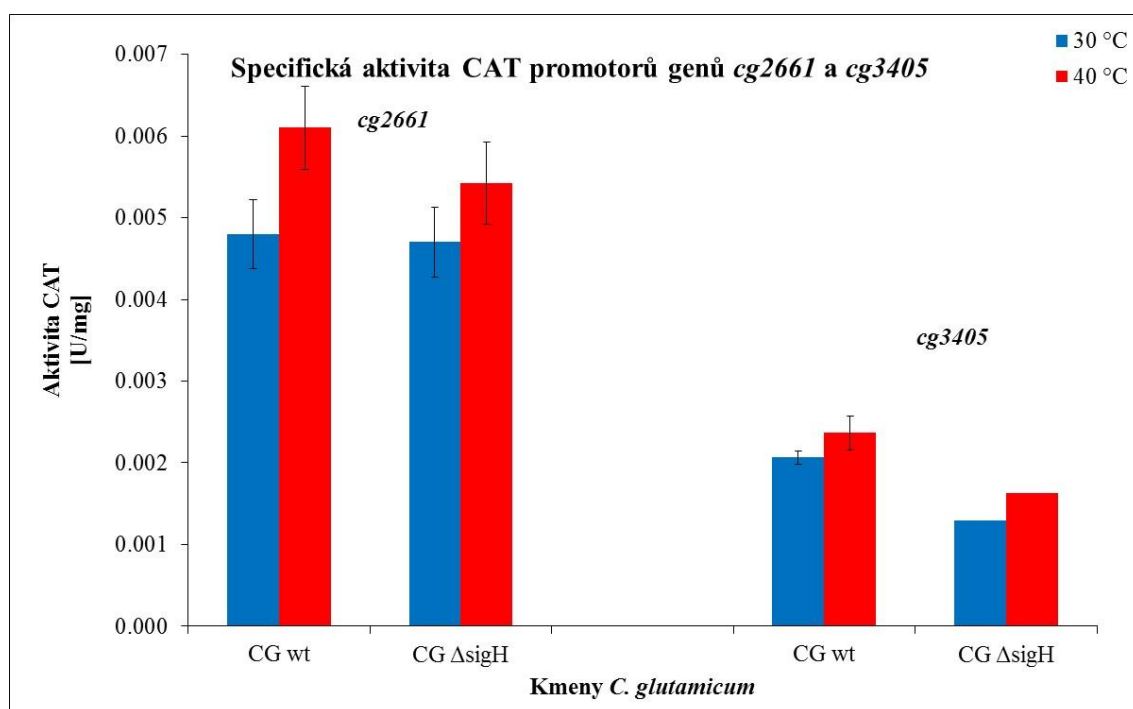
#### 4.4.6 Klonování a stanovení aktivit promotorů genů *cg2661* (DDI) a *cg3405* (ZDO)

Geny kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 *cg2661* a *cg3405* (odpovídající genům *cgR\_2320* a *cgR\_2964* u kmene *C. glutamicum* R) kódují dithiol-disulfidovou isomerasu

(DDI) a Zn-dependentní oxidoreduktasu (ZDO). Oba proteiny se účastní buněčné SOS odpovědi a buněčné reakce na stresové podmínky v kmeni *C. glutamicum R* a současně je jejich exprese je regulována sigma faktorem SigH (Ehira *et al.*, 2009b).

Na základě známé sekvence genomu *C. glutamicum* byly klonovány *upstream* DNA oblasti od translačních začátků genů *cg2661* a *cg3405* do *promotor-probe* vektoru pET2 za použití specifických kombinací primerů PDDIF-PDDIR respektive PZDOF-PZDOR. Získané konstrukty pET2/*Pddi* a pET2/*Pzdo* byly přeneseny do buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  a následně elektroporací vneseny do divokého kmene *C. glutamicum* a deleční mutanty *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigH*.

Specifická aktivita CAT byla měřena za standardních podmínek (30 °C) a za podmínek tepelného stresu (40 °C, 60 min). Naměřené hodnoty specifických CAT jsou znázorněny na Obr. 4.21



**Obr. 4.21 – Vliv tepelného šoku na aktivitu promotorových oblastí genů *cg2661* a *cg3405* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Promotorové aktivity byly měřeny za standardních fyziologických podmínek (modrý sloupec, 30 °C) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40 °C). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze třech nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou. Chybová úsečka není zobrazena u měření aktivity promotorové oblasti genu *cg3405* u kmene  $\Delta$ *sigH* z důvodu nízkých hodnot.

Z naměřených hodnot specifické aktivity CAT je patrné, že obě sledované promotorové oblasti vykazovaly mírné zvýšení aktivity účinkem tepelného šoku v divokém kmeni *C. glutamicum*, tak i v delečním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta$ *sigH*.

Výsledky měření neprokázaly vliv delece v genu *sigH* na aktivitu promotorů genů *cg2661* a *cg3405*.

#### 4.5. Analýza promotorů rozeznávaných dvěma sigma faktory

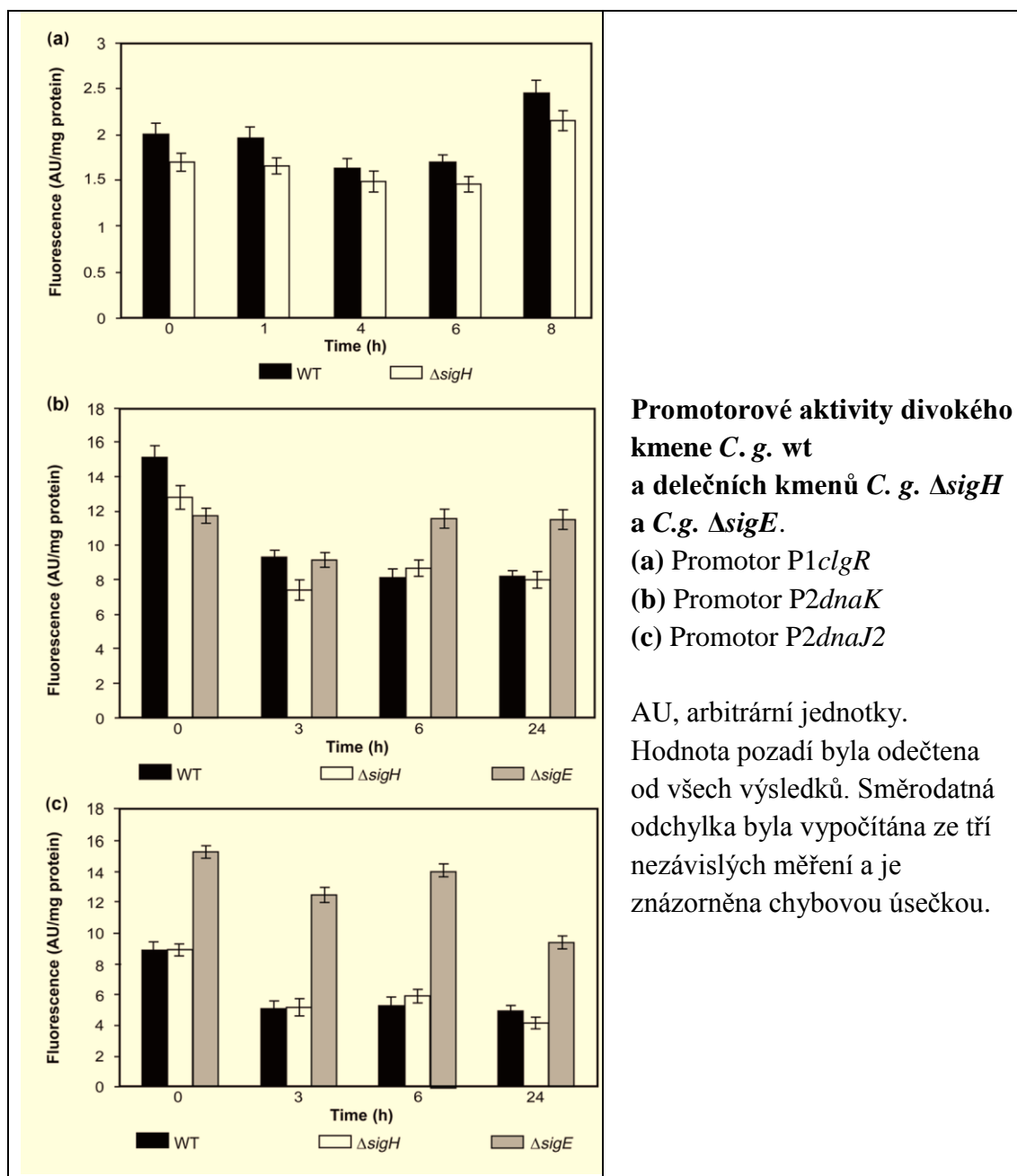
Zjištění existence tří promotorů genu *dnaJ2* (*P1dnaJ2*, *P2dnaJ2* a *P3dnaJ2*) pokazuje na to, že exprese tohoto genu může být regulována jak ECF sigma faktorem (zřejmě SigH), tak primárním sigma faktorem SigA. Přítomnost dvou promotorů, z nichž jeden je SigA-dependenční (*P1dnaK*) a druhý SigH-dependenční (*P2dnaK*), byla již dříve publikována u operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, kódujícího molekulární chaperony účastnící se buněčné odpovědi na tepelný šok (Barreiro *et al.*, 2004). Podobně u genu *clgR*, který kóduje transkripční regulátor, je exprese řízena jak ze SigH-dependenčního promotoru *P1clgR*, tak ze SigA-dependenčního *P2clgR* (Engels *et al.*, 2004).

Pro testování toho, zda SigH-dependenční promotory *P1clgR*, *P2dnaK* a *P2dnaJ2* jsou rozeznávány ještě dalším ECF sigma faktorem, byly tyto promotory klonovány do *promotor-probe* vektoru pEPR1 s reportérovým genem *gfpuv*, kódujícím zelený fluorescenční protein (Gfp). Promotorová aktivita byla stanovena jako intenzita fluorescence proteinu GFP. Příslušné konstrukty byly přeneseny do divokého kmene *C. glutamicum* a do delečních kmenů *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigE$ . U konstruktu pEPR1/*P1clgR* bylo nutné inaktivovat promotor *P2clgR* cílenou mutagenezí promotorové oblasti -10, z důvodu těsné blízkosti obou promotorů (Engels *et al.*, 2004). Aktivity promotorů byly stanoveny za standardních fyziologických podmínek a jsou znázorněny na Obr. 4.22.



### 4.5.1 Měření aktivity promotoru *P1clgR*

Výsledky měření aktivity SigH-dependentního promotoru *P1clgR* jsou zobrazeny na Obr. 4.22 a popsány v textu.



**Obr. 4.22 – Aktivita promotorů *P1clgR*, *P2dnaK* a *P2dnaJ2* v různých kmenech *C. glutamicum*.** Aktivita promotorů byla stanovena jako intenzita fluorescence proteinu Gfp v konstruktu pEPR1/+ příslušný konstrukt za standardních fyziologických podmínek u různých kmenů *C. glutamicum*: divokého wt (černý sloupec), *ΔsigH* (bílý sloupec) a *ΔsigE* (šedivý) (Silar *et al.*, 2016).

Z naměřených výsledků je zřejmé, že aktivita promotoru *P1clgR* se mírně snížila u delečního kmene *C. glutamicum ΔsigH* ve srovnání s divokým kmenem *C. glutamicum*. Tento výsledek potvrzuje přítomnost SigH-dependentního promotoru. Z výsledků je

rovněž patrná reziduální aktivita u delečního kmene. Lze tedy předpokládat, že promotor *P1cIgR* je rozeznáván i dalším ECF sigma faktorem,

#### 4.5.2 Měření aktivity promotoru *P2dnaK*

Z výsledků měření aktivity SigH-dependentního promotoru *P2dnaK* je patrné snížení aktivity pouze v exponencionální fázi růstu u delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigH$ . U kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  nebylo pozorováno snížení aktivity během exponencionální fáze, ale naopak její mírné zvýšení v pozdních fázích růstu.

#### 4.5.3 Měření aktivity promotoru *P2dnaJ2*

Z výsledků je patrné, že aktivita SigH-dependentního promotoru *P2dnaJ2* v kmenech *C. glutamicum* nebyla ovlivněna přítomností delece v genu *sigH*. U delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  je však patrný pozitivní efekt na aktivitu. Testování současného vlivu obou sigma faktorů SigH a SigE na aktivitu promotoru *P2dnaJ2* v jednom kmeni, vyžaduje konstrukci kmene *C. glutamicum*  $\Delta sigHE$  nesoucího delece v obou genech *sigH* a *sigE*. Přes všechny pokusy se doposud nepodařilo sestrojít tento kmen, což může být dáno jeho neživotaschopností.

Ze získaných výsledků měření specifických aktivit CAT a Gfp v delečních kmenech *C. glutamicum* vyplývá, že některé promotory mohou být rozpoznávány více ECF sigma faktory. Pro přímý důkaz vlivu jednotlivých sigma faktorů na expresi genu z konkrétního promotoru byla použita analýza *in-vitro* transkripce.

#### 4.6. *In-vitro* transkripční analýza vybraných promotorů

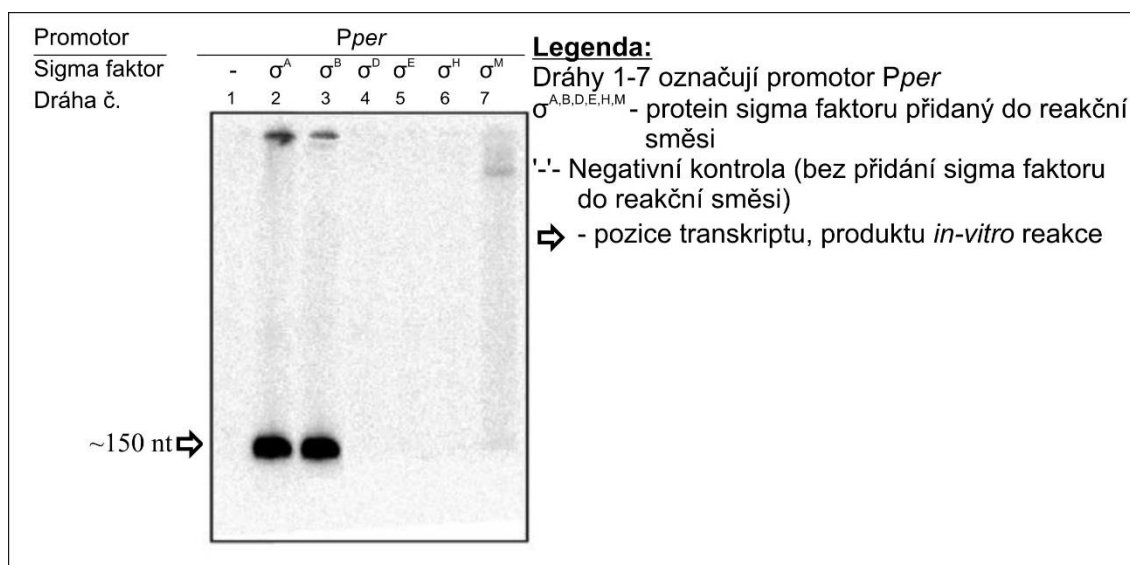
Pro určení promotorové specificity jednotlivých sigma faktorů byl zkonstruován *in-vitro* transkripční systém, umožňující testování jednotlivých sigma faktorů na konkrétní promotorové oblasti v podmínkách *in-vitro*, tedy bez přítomnosti dalších transkripčních faktorů, které mohou pozitivně nebo negativně ovlivnit genovou expresi (Holatko *et al.*, 2012). *In-vitro* transkripční systém se ukázal rovněž jako vhodný systém pro důkaz rozlišování jednoho promotoru dvěma různými sigma faktory.

Pro testování funkce sigma faktorů metodou *in-vitro* transkripce byly vybrané promotorové oblasti klonovány do vektoru pRLG770 a přeneseny do buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ . Následně byla izolována plazmidová DNA (viz Materiál a metody, 3.2.10.) získaného konstruktů, jehož linearizovaná forma byla použita jako templátová DNA pro experimenty *in-vitro* transkripce.

#### 4.6.1 *In-vitro* transkripční analýza promotoru *Pper*

Promotor *Pper* se nachází v přirozeném plazmidu pGA1 *C. glutamicum*. Jedná se o velmi silný promotor obsahující oblasti -10 (5'-TATAAT-3') a -35 (5'-TAGAAT-3') (Nesvera *et al.*, 1997). Hexamery promotorových oblastí jsou velmi podobné konsensus sekvenci promotorů rozeznávaných primárním sigma faktorem SigA, případně alternativním *primary-like* sigma faktorem SigB (Patek & Nesvera, 2011). Pro testování této hypotézy byl použit *in-vitro* transkripční systém. Do reakční směsi obsahující jádro RNA polymerasy (RNAP) byl přidán sigma faktor SigA nebo SigB a linearizovaný pRLG770/*Pper* jako templátová DNA.

Výsledkem *in-vitro* transkripční reakce (Obr. 4.23) jsou dva silné signály v drahách pro SigA a SigB. Žádný signál nebyl patrný v reakčních směsích obsahujících pouze RNAP bez přidaného sigma faktoru (negativní kontrola) a RNAP holoenzymu s přidanými ECF sigma faktory SigD, SigE, SigH nebo SigM.



**Obr. 4.23 - *In-vitro* transkripční analýza silného vegetativního promotoru *Pper* *C. glutamicum*.**

Získaný výsledek potvrdil, že promotor *Pper* je jako typický 'housekeeping' promotor rozeznávaný jak primárním sigma faktorem SigA, tak 'primary-like' sigma faktorem SigB.

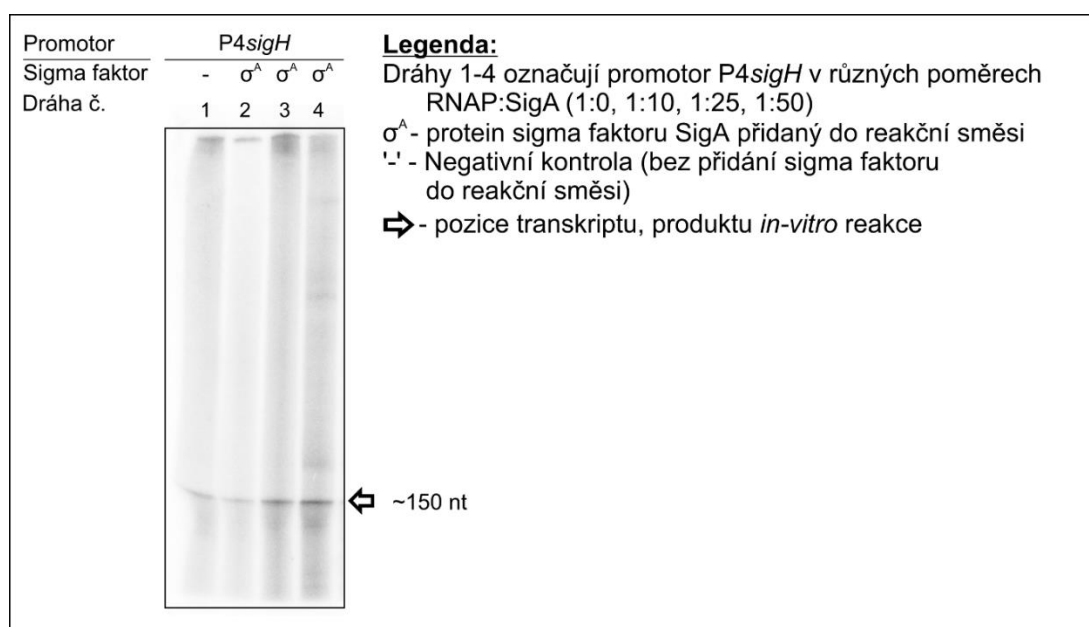
#### 4.6.2 *In-vitro* transkripční analýza promotoru *P4sigH*

V promotorové oblasti genu *sigH* byly v této práci identifikovány 4 transkripční starty a odvozeny 4 promotorové oblasti *P1sigH*, *P2sigH*, *P3sigH* a *P4sigH*. Sekvence hexamerových motivů promotoru *P1sigH*, *P2sigH* a *P3sigH* obsahují konsensus sekvence typické pro SigA-dependentní promotory. U promotorové oblasti *P4sigH* byly určeny následující sekvence hexamerových motivů -10 (5'-TACATA-3') a -35 (5'-TTGTTTT-

3'). Stanovená promotorová oblast nevykazuje konservativní sekvence SigH-dependentních promotorů, avšak v podmínkách *in-vivo* byl patrný vliv delece v genu *sigH* na tuto promotorovou oblast.

Na základě těchto faktů se předpokládalo, že promotorová oblast P4*sigH* obsahuje aktivní promotor, který by mohl být rozeznávaný primárním sigma faktorem SigA případně být SigH-dependentní.

*In-vitro* transkripční analýzou promotoru P4*sigH* vznikl pouze transkript v přítomnosti primárního sigma faktoru SigA (Obr. 4.24). Z výsledků je patrné, že množství získaného transkriptu lineárně rostlo se zvýšeným podílem přidaného sigma faktoru SigA. Přítomnost slabého transkriptu v dráze označené jako negativní kontrola je způsobeno skutečností, že izolovaná RNAP obsahuje malé množství současně izolovaného sigma faktoru SigA. Následné experimenty s použitím alternativních sigma faktorů SigH a SigE nevedly ke vzniku žádného transkriptu.



**Obr. 4.24 - *In-vitro* transkripční analýza promotoru genu *sigH* *C. glutamicum*.**  
 Popis v textu.

Z dosažených výsledků v *in-vitro* podmínkách je zřejmé, že promotor P4*sigH* je rozeznávan primárním sigma faktorem SigA.

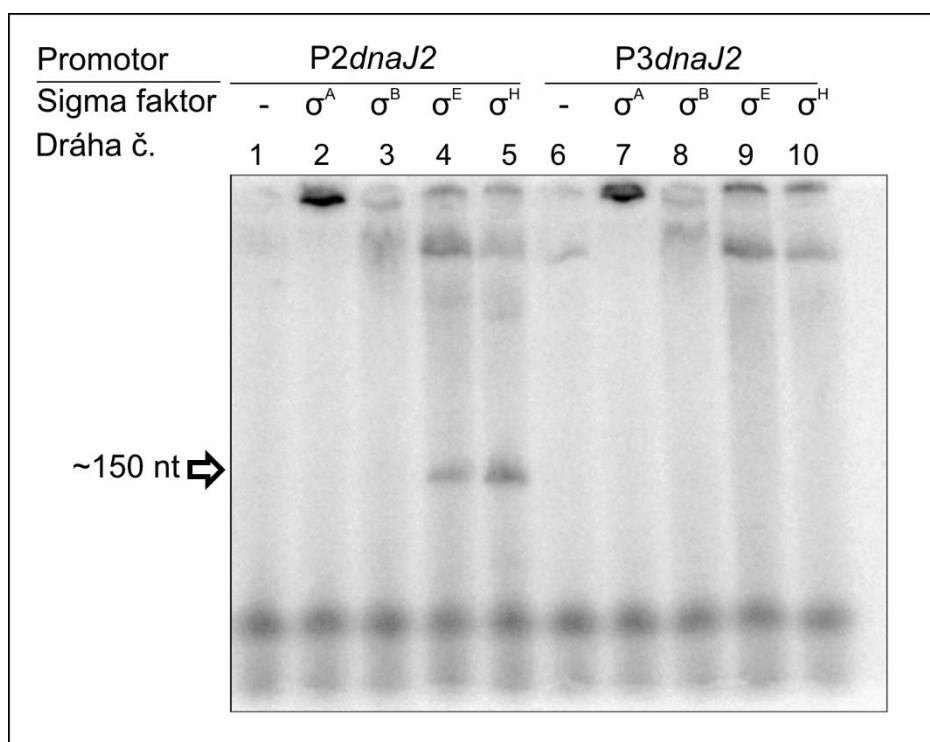
#### 4.6.3 *In-vitro* transkripční analýza promotorů genu *dnaJ2*

V promotorové oblasti genu *dnaJ2* byly v této práci identifikovány 3 transkripční starty a odvozeny 3 promotorové oblasti P1*dnaJ2*, P2*dnaJ2* a P3*dnaJ2*. Sekvence hexamerových motivů promotoru P1*dnaJ2* -10 (5'-TAATCT-3') a -35 (5'-TATAGT-3') jsou typické pro promotory rozeznávané primárním sigma faktorem SigA. U

promotorových oblastí *P2dnaJ2* a *P3dnaJ2* byly určeny sekvence hexamerových motivů -10 (5'-CGTTGC-3') a -35 (5'-GGGAAC-3') respektive -10 (5'-GGTTGG-3') a -35 (5'-GCCGAC-3') pro promotor *P3dnaJ2*. Obě promotorové oblasti vykazují konservativní sekvence SigH-dependentních promotorů (znázorněné tučně) v oblastech -10 a v případě promotoru *P2dnaJ2* i v oblasti -35. Na základě těchto faktů se předpokládalo, že promotor *P2dnaJ2* je rozeznáván alternativním ECF sigma faktorem SigH. Vzhledem k atypické sekvenci -35 promotoru *P3dnaJ2* je predikce sigma faktoru rozeznávajícího tento promotor obtížná.

Z výsledků *in-vitro* transkripce (Obr. 4.25) je zřetelné, že u promotorové oblasti *P2dnaJ2* proběhla transkripce nejen v přítomnosti sigma faktoru SigH, ale i v přítomnosti SigE v reakční směsi. Transkript naopak nevznikl s přidavkem sigma faktorů SigA a SigB. Při použití promotoru *P3dnaJ2* k transkripci *in-vitro* nedošlo.

Z výsledku je tedy patrné, že promotor *P2dnaJ2* je v podmínkách *in-vitro* rozeznáván alternativními ECF sigma faktory SigH a SigE. U promotoru *P3dnaJ2* se metodou *in-vitro* transkripce nepodařilo prokázat vazbu žádného z testovaných sigma faktorů.



**Obr. 4.25 - *In-vitro* transkripční analýza promotorů genu *dnaJ2* *C. glutamicum*.**

Legenda:

dráhy 1-5 označují promotor *P2dnaJ2*, dráhy 6-10 označují promotor *P3dnaJ2*.

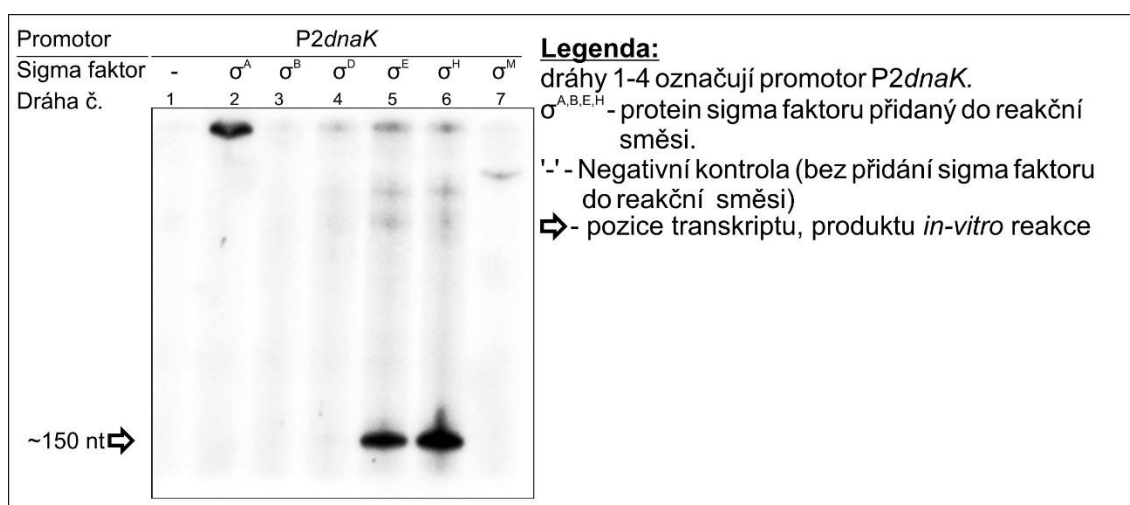
$\sigma^{A,B,E,H}$  - protein sigma faktoru přidáný do reakční směsi

'-' - Negativní kontrola (bez přidání sigma faktoru do reakční směsi)

⇒ - pozice transkriptu, produktu *in-vitro* reakce

#### 4.6.4 *In-vitro* transkripční analýza promotoru P2*dnaK*

Promotorová oblast genu *dnaK* byla již v minulosti testována a z publikovaných výsledků je viditelný vliv sigma faktoru SigH na genovou expresi (Barreiro *et al.*, 2004; Ehira *et al.*, 2009b). Metodou *primer-extension* byly identifikovány dva transkripční počátky a následně odvozeny 2 promotorové oblasti P1*dnaK* (SigA-dependenční promotor) a P2*dnaK*, jehož konsensus sekvence -10 (5'-CGTTGTC-3') a -35 (5'-GGGAACA-3') je typická pro SigH-dependenční promotory (Barreiro *et al.*, 2004). Na základě získaných výsledků měření promotorových aktivit CAT v různých kmenech *C. glutamicum* (Šilar, 2007) se dá usuzovat na možnost regulace exprese promotoru P2*dnaK* několika ECF-dependenčními sigma faktory.



Obr. 4.26 - *In-vitro* transkripční analýza promotoru P2*dnaK* *C. glutamicum*.

Ze získaných výsledků uvedených na Obr. 4.26 jsou patrné dva primární transkripty, v dráze s přidáním sigma faktorem SigE a v dráze s přidáním sigma faktorem SigH. Žádný transkript naopak nevznikl v reakčních směsích s primárním sigma faktorem SigA, *primary-like* sigma faktorem SigB a s ECF sigma faktory SigD a SigM.

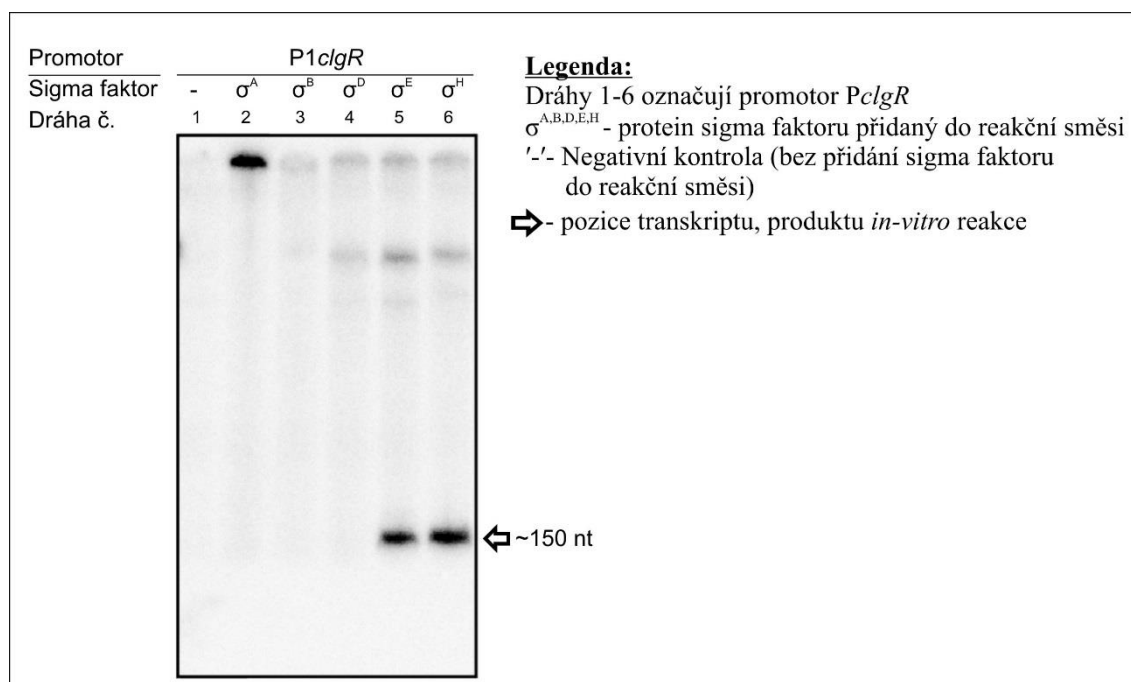
Z výsledků vyplývá, že promotor P2*dnaK* je v podmínkách *in-vitro* specificky rozeznáván sigma faktorem SigH i sigma faktorem SigE.

#### 4.6.5 *In-vitro* transkripční analýza promotoru P1*clgR*

Hexamerové sekvence promotoru P1*clgR* -10 (5'-AGTTGAA-3') a -35 (5'-GGGAACA-3') vykazují konsensus sekvence typické pro SigH-dependenční promotory (znázorněny tučně).

*In-vitro* transkripce z promotoru prokázala (Obr. 4.27) dva primární transkripty, jeden v dráze s přidáním sigma faktorem SigE, druhý v dráze s přidáním sigma faktorem

SigH. Žádný transkript naopak nevznikl v reakční směsi se sigma faktory SigA, SigB nebo SigD.



**Obr. 4.27 - *In-vitro* transkripční analýza promotoru genu *clgR* *C. glutamicum*.**

Z výsledků vyplývá, že promotor P1*clgR* je v podmínkách *in-vitro* specificky rozeznáván dvěma sigma faktory SigH a SigE.

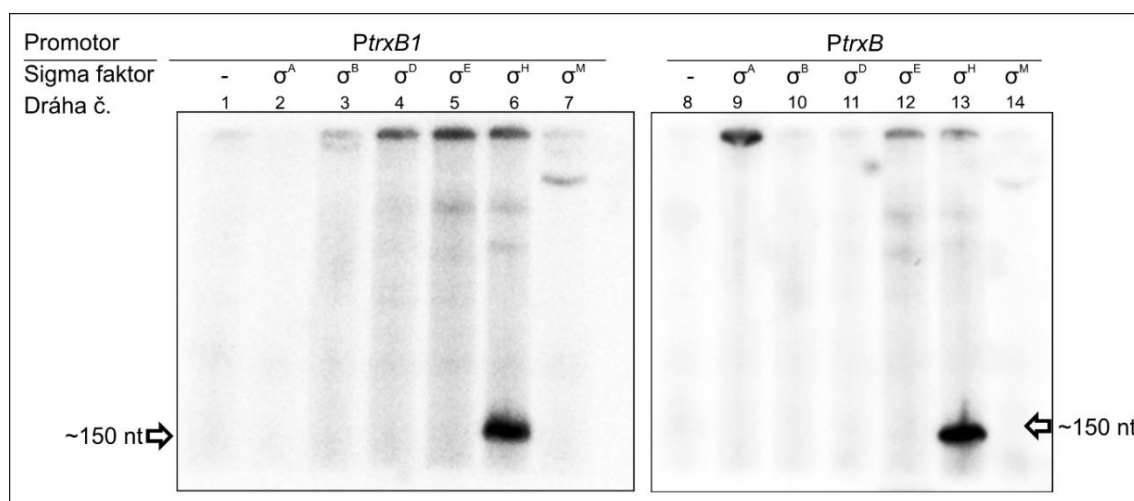
#### 4.6.6 *In-vitro* transkripční analýza promotorů *PtxB* a *PtxB1*

Gen *trxB* kóduje protein thioredoxinovou reduktasu a je součástí operonu *sigM-trxB-trxC-cwIM*. Z publikovaných výsledků byl metodou 5' RACE identifikován jeden transkripční počátek na bázi guaninu ve vzdálenosti 68 nt od translačního počátku. Následně byla odvozena promotorová oblast *PtxB* s příslušnými sekvencemi hexamerů -10 (5'-CGTTGAA-3') a -35 (5'-TGGAAGT-3') (Nakunst *et al.*, 2007). V práci Nakunst *et al.* (2007) bylo experimentálně prokázáno (metodou RT-PCR), že promotor *PtxB* je SigM-dependentní.

Gen *trxB1* kóduje protein thioredoxin. Z dostupných publikovaných výsledků byl metodou 5' RACE identifikován jeden transkripční počátek na bázi guaninu ve vzdálenosti 29 nt od translačního počátku. Následně byla odvozena promotorová oblast *PtxB1* s příslušnými sekvencemi hexamerů -10 (5'-AGTTGGT-3') a -35 (5'-GGGAAT-3') (Nakunst *et al.*, 2007). V práci Nakunst *et al.* (2007) bylo experimentálně prokázáno, že také promotor *PtxB1* je SigM-dependentní.

Na základě dosažených výsledků v experimentu srovnání transkripčních profilů kmene s divokým kmenem *C. glutamicum* metodou DNA Microarray (viz Výsledky, 4.6.6.) vyplývá, že promotory *PtrxB* a *PtrxB1* by mohly být SigH-dependentní, protože hladina exprese těchto příslušných genů byla zvýšená v delečním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  v porovnání s divokým kmenem *C. glutamicum*. Z těchto důvodů byly obě výše zmíněné promotorové oblasti klonovány do vektoru pRLG770 a testovány metodou *in-vitro* transkripce v přítomnosti různých ECF sigma faktorů.

Výsledky *in-vitro* transkripce jsou zobrazeny na Obr. 4.28. Z nich je patrný primární transkript, který vznikl pouze v reakční směsi s přidáním sigma faktoru SigH a to u obou testovaných promotorových oblastí *PtrxB* a *PtrxB1*.



**Obr. 4.28 - *In-vitro* transkripční analýza promotorů genů *trxB* a *trxB1* *C. glutamicum*.**

**Legenda:**

Dráhy 1-7 označují promotor *PtrxB1*, dráhy 8-14 promotor *PtrxB*

$\sigma^{A,B,E,H}$  - protein sigma faktoru přidáný do reakční směsi

'-' - Negativní kontrola (bez přidání sigma faktoru do reakční směsi)

⇒ - pozice transkriptu, produktu *in-vitro* reakce

Výsledky analýzy *in-vitro* transkripce prokázaly, že promotorové oblasti u *C. glutamicum* mohou být rozeznávány více než jedním alternativním sigma faktorem, a to v případě promotorů *P2dnaK*, *P2dnaJ2* a *P1clgR*, kde tyto promotory jsou v podmínkách *in-vitro* specificky rozeznávány sigma faktory SigH a SigE.

Naproti tomu bylo prokázáno, že promotory *PtrxB* a *PtrxB1*, považované za SigM-dependentní (Nakunst *et al.*, 2007) jsou v podmínkách *in-vitro* rozeznávány sigma pouze faktorem SigH.



## 5. Diskuze

Cílem této disertační práce byla identifikace genů *Corynebacterium glutamicum*, jejichž produkty se účastní buněčné odpovědi vyvolané vnějšími stresovými faktory a jejichž promotorové oblasti jsou rozeznávány alternativními sigma faktory, zejména pak sigma faktorem SigH. Dalším cílem bylo stanovení aktivit promotorů, identifikace transkripčních počátků těchto genů a určení promotorových oblastí -10 a -35.

Geny *C. glutamicum*, jejichž exprese je řízena sigma faktorem SigH byly identifikovány metodou *DNA Microarray hybridisation*. Transkripční profil kmene *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  s delecí v genu kódujícím anti-sigma faktor RshA byl porovnán s divokým kmenem *C. glutamicum* wt za standardních podmínek. Bylo identifikováno celkem 83 genů lokalizovaných v 61 transkripčních jednotkách, které měly zvýšenou transkripční aktivitu v nepřítomnosti anti-sigma faktoru RshA a lze tedy předpokládat účast sigma faktoru při regulaci jejich exprese (Busche *et al.*, 2012). U vybraných nově identifikovaných SigH-dependenčních genů byla klonována jejich *upstream* DNA oblast (ve které se nachází aktivní promotorové oblasti) do *promoter-probe* vektoru pET2 před (*upstream*) bezpromotorový reportérový gen *cat* (kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu). U vzniklých klonů byla stanovena aktivita promotorů jako specifická aktivita reportérového enzymu CAT v kompletním médiu a následně určeny transkripční počátky (mapování 5' konce mRNA) metodami *primer-extension* a 5'RACE.

Metodou *Microarray hybridisation*, stanovením aktivit promotorů a určením transkripčních počátků metodami *primer-extension* a 5'RACE byly definovány geny a jejich příslušné promotorové oblasti rozeznávány alternativním sigma faktorem SigH. Nicméně přímý důkaz vazby sigma faktoru SigH na danou promotorovou oblast nebyl doposud publikován. Z tohoto důvodu byl vyvinut *in-vitro* transkripční systém imitující proces transkripce v *in-vitro* podmínkách za specifických podmínek. Tato metoda umožňuje navíc identifikovat promotory rozeznávány více sigma faktory nezávisle na okolních podmínkách a umožnit tak prvně přiřadit sigma faktor ke konkrétní promotorové oblasti genů *C. glutamicum*.

Výsledky měření specifických promotorových aktivit a *in-vitro* transkripční analýza odhalily promotor genu *dnaJ2*, který je specificky rozeznáván dvěma ECF sigma faktory, SigH a SigE. Promotorová oblast P2*dnaJ2* byla klonována do *promoter-probe* vektoru pEPR1 a byla stanovena její aktivita na základě měření fluorescence zeleného proteinu Gfp. Společně s tímto promotorem byly testovány SigH-dependenční promotor

*P2dnaK* (Barreiro *et al.*, 2004); (Ehira *et al.*, 2009b) a SigA-dependentní promotor *Pper* (Nesvera *et al.*, 1997).

Kapitola diskuze je dále členěna do pododdílů 5.1 – 5.4.

### 5.1. Identifikace SigH-dependentních genů

V této práci byl použit kmen *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  nesoucí chromosomální delecii v genu *rshA* kódující hypotetický anti-sigma faktor RshA, který se reverzibilně váže na sigma faktor SigH a tím ho udržuje v neaktivní formě. Komplex SigH-RshA blokuje transkripci do té doby, než dojde ke stimulaci stresovým signálem z vnějšího prostředí. Protein SigH je následně uvolněn a může se účastnit procesu transkripce. Gen *rshA* byl anotován pouze v publikaci (Kalinowski *et al.*, 2003) zabývající se sekvenační analýzou genomu *C. glutamicum* ATCC 13032. Aminokyselinová sekvence proteinu RshA je velmi podobná sekvencím anti-sigma faktoru RshA u *Mycobacterium tuberculosis* (Song *et al.*, 2003) a RsrA u *Streptomyces coelicolor* (Kang *et al.*, 1999). Produkty obou zmíněných anti-sigma faktorů se reverzibilně vážou na sigma faktory SigH (*M. tuberculosis*), respektive SigR (*S. coelicolor*).

Již dříve byly identifikovány a publikovány geny, jejichž exprese je řízena alternativním sigma faktorem SigH za podmínek tepelného šoku u kmene *C. glutamicum* R. V experimentech byl použit kmen nesoucí chromosomální delecii v genu *sigH* a současně kmen s nadprodukcí proteinu SigH (Ehira *et al.*, 2009b).

V mé práci, kterou jsem prováděl během pracovní stáže na Bielefeld University, byl použit kmen *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  a metodou *DNA Microarray hybridisation* byl porovnán jeho transkripční profil s divokým kmenem *C. glutamicum* za standardních podmínek, tedy bez aplikování stresových podmínek. Výsledkem byla identifikace celkem 83 genů se zvýšenou transkripční aktivitou u delečního kmene v porovnání s kmenem divokým. Přehled genů, jejichž exprese byla zvýšená v nepřítomnosti anti-sigma faktoru RshA je uveden v kapitole Výsledky v Tabulce 4.8.

Geny, které byly Ehira *et al* (2009) identifikovány jako SigH-dependentní (snížená exprese v delečním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigH$ ) měly zvýšenou míru exprese i v kmeni *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  v porovnání s kmenem divokým. Metodou *Microarray hybridisation* v tomto kmeni však nebyly potvrzeny geny *clpC* (molekulární chaperon), *sigB* (sigma faktor), operon *dnaK-grpE* (molekulární chaperony) a většina genů z klastru *suf* kódující Fe-S proteiny (*sufB*, *sufD*, *sufC*, *sufS*, *sufU*). Tato skutečnost může být dána nepřítomností stresových podmínek, které jsou nutné pro aktivaci transkripce působením SigH.

Mezi nově identifikované SigH-dependentní geny patří geny *uvrA*, *uvrC* a *uvrD* (kódující proteiny účastníci se excisní opravy DNA), *mshC* a *mca* (syntéza mykothiolů) (Feng *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 1996) a *pup* (ubiquitin-like protein) (Newton *et al.*, 2008; Newton & Fahey, 2008). Dosažené výsledky jsou v souladu s předpokladem, že protein RshA plní funkci anti-sigma faktoru k alternativnímu sigma faktoru SigH (Busche *et al.*, 2012).

## 5.2. Analýza promotorů operonu *sigH-rshA*

Geny *rshA* a *sigH* jsou přepisovány do společného transkriptu. *In-vivo* transkripční analýzou genu *sigH* byly identifikovány 4 transkripční počátky TSP1, TSP2, TSP3 a TSP4 a od nich odvozeny jednotlivé promotory P1*sigH*, P2*sigH*, P3*sigH* a P4*sigH* (Obr. 5.1) a dále interní SigH-dependentní promotor *PrshA* před (*upstream*) genem *rshA* (Obr. 5.3).

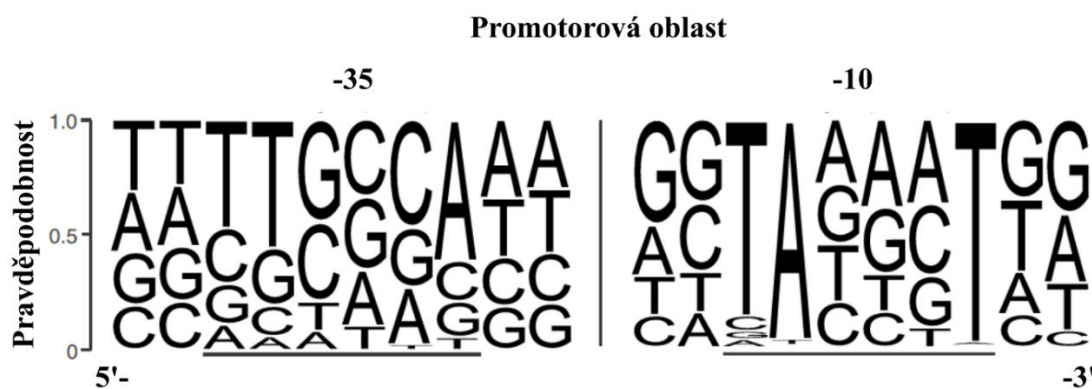
Bylo zjištěno, že operon *sigH-rshA* obsahuje 4 funkční vegetativní promotory (P1*sigH*, P2*sigH*, P3*sigH* a P4*sigH*) pro přepis genu *sigH* a dále interní SigH-dependentní promotor *PrshA* před genem *rshA*.

Promotorové oblasti genů *sigH* a *rshA* byly klonovány v *promotor-probe* vektoru pET2 před (*upstream*) reportérový gen *cat* (kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu) a přeneseny do divokého kmene *C. glutamicum* a delečních kmenů nesoucích chromosomální delece v genech kódujících alternativní sigma faktory ( $\Delta sigH$ ,  $\Delta rshA$ ,  $\Delta sigE$ ,  $\Delta sigM$ ). Byly stanoveny aktivity obou promotorových oblastí v kompletním médiu za standardních a stresových podmínek. U obou promotorových oblastí bylo prokázáno, že jsou aktivovány tepelným šokem. Promotorová oblast genu *sigH* byla kromě tepelného šoku aktivována též etanolovým, oxidativním a disulfidovým stresem. Aktivita promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA* byla dále ovlivněna přítomností chromosomální delece v genu kódujícím alternativní sigma faktor SigH. Ze získaných výsledků vyplývá, že sigma faktor SigH se podílí na regulaci exprese genu *rshA* a současně je zapojen i do regulace exprese vlastního genu. Toto zjištění je v souladu s již dříve publikovanými výsledky (Kim *et al.*, 2005a).

Promotorová oblast genu *sigH* (*cg0876*) u *C. glutamicum*

**Obr. 5.1 – Mezigenová oblast genů *cg0875* a *cg0876*.** Transkripční počátky TSP1, TSP2 a TSP3 identifikované metodou *primer-extension* jsou znázorněny modře, stejně jako jejich příslušné promotorové oblasti -10 a -35 (P1, P2 a P3). Promotorové oblasti P2 a P3 se vzájemně překrývají, příslušné hexamery jsou podtrženy. TSP4 identifikovaný metodou *primer-extension* a současně i metodou 5' RACE je znázorněn červenou barvou stejně tak i jeho odvozené promotorové oblasti -10 a -35. Vzdálenost transkripčního počátku od start kodonu (*atg*, znázorněn modře) genu *sigH* v nukleotidech je uvedena v závorce. DNA vazebné místo pro protein LexA je znázorněno fialovým obdélníkem. Start kodon genu *cg0875* je znázorněn zeleně (*atg*).

Nově odvozené oblasti -10 promotorů *P1sigH*, *P2sigH* a *P3sigH* si jsou sekvenčně velmi podobné a odpovídají stanovené konsensus sekvenci 5'-TAnnnT-3' (Obr. 5.2), která je typická pro promotory rozeznávané primárním sigma faktorem SigA (Pfeifer-Sancar *et al.*). Písmeno „n“ značí, že dané místo v promotorové oblasti může obsahovat jakýkoliv nukleotid, malé písmeno nukleotidu značí 40-70% pravděpodobnost výskytu a velké písmeno více než 70% pravděpodobnost výskytu. Odvozené oblasti -35 promotorů *P1sigH*, *P2sigH* a *P3sigH* vykazují malou podobnost ve svých konvenčních sekvencích, což je typický jev pro *C. glutamicum* (Patek & Nesvera, 2011). Konsensus sekvence -35 oblasti SigA-dependenčních promotorů *C. glutamicum* je méně konservovaná a její sekvence byla stanovena 5'-ttgnca-3' (Patek & Nesvera, 2011; Pfeifer-Sancar *et al.*).



**Obr. 5.2** – Frekvence výskytu jednotlivých nukleotidů v promotorových oblastech -10 a -35 u SigA-dependentních promotorů *C. glutamicum*. Velikost písmen je přímo úměrná k frekvenci výskytu daného nukleotidu na konkrétním místě v dané promotorové oblasti. Promotorové oblasti -10 a -35 jsou znázorněny s rozšířenými oblastmi, klíčová sekvence hexameru je podtržená. Stanovená konsensus sekvence pro oblast -10 (5'-TAnnnT-3') a -35 (5'-ttgnc-3') (Pfeifer-Sancar *et al.*).

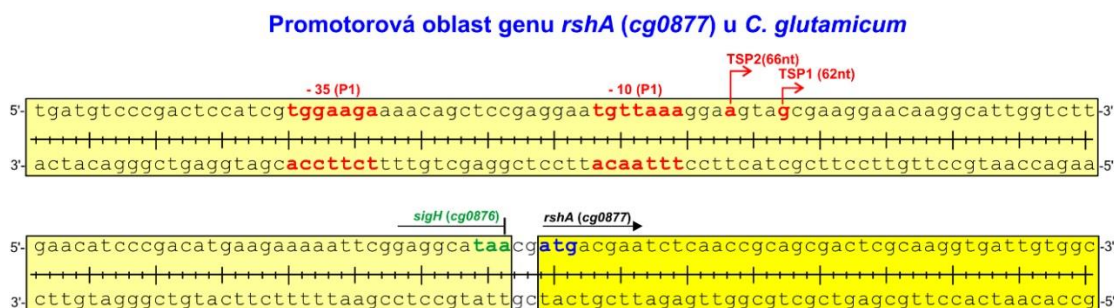
Transkripční analýzou promotorové oblasti genu *sigH* byl rovněž identifikován čtvrtý transkripční počátek TSP4 a následně i odvozena promotorová oblast P4*sigH* a sekvence oblastí -10 (5'-tacata-3') a -35 (5'-ttgtt-3'). Z výsledků měření aktivit CAT je patrné, že promotor P4*sigH* je aktivován tepelným šokem a disulfidovým stresem. Bylo zjištěno, že chromosomální delece v genech *sigH* a *rshA* měly vliv na aktivitu promotoru P4*sigH*. U obou kmenů došlo ke snížení promotorové aktivity po působení disulfidového stresu. Stanovená konsensus sekvence promotoru P4*sigH* je však spíše podobná konsensus sekvenci SigA-dependentních promotorů nežli promotorům rozeznávaných sigma faktorem SigH. Rozeznávání promotoru P4*sigH* primárním sigma faktorem SigH bylo prokázáno metodou transkripce *in-vitro*.

Vzhledem k tomu, že všechny 4 promotory genu *sigH* odpovídají svými oblastmi -10 a -35 vegetativním promotorům *C. glutamicum* (rozeznávaným zřejmě primárním sigma faktorem SigA), pozorovaný negativní vliv delece genu *sigH* na jejich aktivitu poukazuje na to, že exprese genu *sigH* je ovlivněna působením dalších regulačních proteinů, jejichž tvorba je pravděpodobně řízena sigma faktorem SigH. Podobně je tomu u *E. coli*, kde sigma faktor RpoH ovlivňuje expresi genů nezbytných pro správnou funkci organismu v exponenciální fázi růstu a jejichž exprese je primárně řízena sigma faktorem RpoD (Maeda *et al.*, 2000).

V mezigenové oblasti před genem *sigH* (*cg0876*) byl na základě znalosti genomové sekvence identifikován tzv. 'SOS box', tedy úsek DNA kam se specificky váže protein LexA (Obr. 5.1) (Jochmann *et al.*, 2009). SOS buněčná odpověď je řízena globální regulační sítí a umožňuje bakteriím přežít v podmínkách poškození DNA (Walker, 1984). Protein LexA se v tomto případě váže do promotorové oblasti genu

*cg0875*, který kóduje endonukleasu s HNHc doménou a je přepisován v opačném směru než gen *sigH* (*cg0876*). HNH endonukleasy představují jednu ze čtyř rodin tzv. *homing endonukleas* s ubikvitinační aktivitou, kde HNH představuje konservovaný aminokyselinový zbytek s aktivním místem enzymu (Stoddard, 2005). Protein LexA funguje jako transkripční represor, a to za podmínek, kdy není navozena buněčná SOS odpověď. SOS box překrývá rovněž promotorovou oblast -10 *P4sigH*, čímž je za standardních podmínek zřejmě blokována exprese genu *sigH* z tohoto promotoru důsledkem vazby proteinu LexA v této oblasti DNA (Busche *et al.*, 2012; Jochmann *et al.*, 2009). Přímá vazba proteinu LexA do promotorové oblasti -10 *P4sigH* byla testována metodou DNA-afinitní chromatografie, ale nebyla prokázána (nepublikovaná data).

Transkripční analýzou genu *rshA* byly identifikovány 2 transkripční počátky (TSP1 a TSP2). K oběma transkripčním počátkům byla stanovena jediná prodloužená promotorová oblast (Obr. 5.3) s motivy -10 (5'-tggtaaa-3') respektive -35 (5'-tggaaga-3') (Busche *et al.*, 2012) a jedná se tedy o jediný promotor (*PrshA*). Určené motivy -10 a -35 promotoru *PrshA* se shodují s publikovanou konsensus promotorovou sekvencí SigH-dependentních promotorů -10 (5'-C/TGTTGAA-3) respektive -35 (5'-GGGAAGA-3') (Ehira *et al.*, 2009b).



**Obr. 5.3 – Promotorová oblast genu *rshA* (*cg0877*).** Transkripční počátky TSP1 a TSP2 identifikované metodou *primer-extension* jsou znázorněny červeně, stejně jako jejich příslušná prodloužená promotorová oblast P1 s motivy -10 a -35. SigH-dependentní promotor genu *rshA* se nachází uvnitř genu *sigH* jehož stop kodon (*taa*) je znázorněn zeleně. Start kodon genu *rshA* (*atg*) je znázorněn modrou barvou. Vzdálenost transkripčního počátku od start kodonu příslušného genu v nukleotidech je uvedena v závorce.

Bylo prokázáno, že aktivita promotoru *PrshA* je zvýšena po tepelném šoku a přítomnost delece v genu *sigH* vede ke snížení promotorové aktivity. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že genová exprese z promotoru *PrshA* je regulována sigma faktorem SigH.

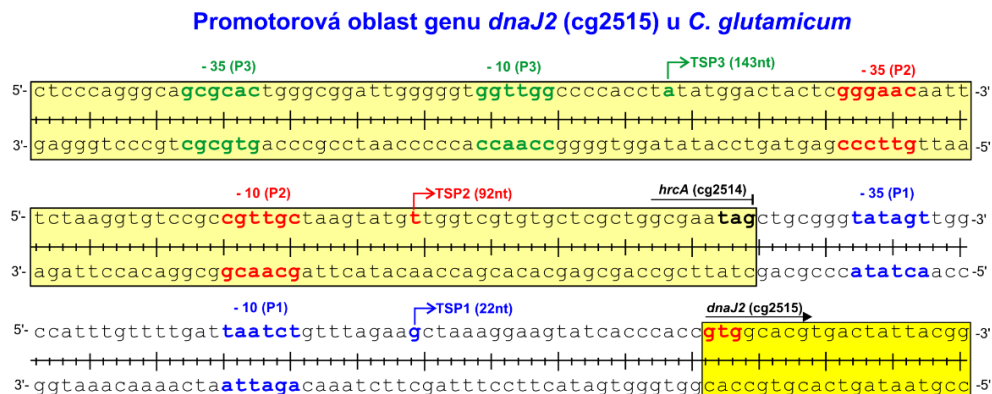
### 5.3. Analýza promotorů SigH-dependentních genů

V této práci bylo identifikováno 83 genů, jejichž transkripční aktivita byla zvýšená v delečním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  ve srovnání s divokým kmenem *C. glutamicum*. Byly určeny promotorové -10 a -35 motivy u celkem 45 SigH-dependentních promotorů (Busche *et al.*, 2012). Z těchto SigH-dependentních promotorů jsem ve své práci analyzoval promotory genů *dnaJ2* (*cg2515*, molekulární chaperon), *uvrA* (*cg1560*, protein nukleasy účastníci se excisní opravy DNA), *uvrD* (*cg1555*, RNA/DNA helikasa), *sigM* (*cg3420*, ECF sigma faktor), *ddi* (*cg2661*, dithiol-disulfidová isomerasa) a *zdo* (*cg3405*, Zn-dependentní oxidoreduktasa). Příslušné promotorové oblasti byly klonovány do *promotor-probe* vektoru pET2, transformovány do buněk *E. coli* a následně i do buněk divokého kmene *C. glutamicum* a do kmenů *C. glutamicum* nesoucích různé chromosomální delece v genech kódujících alternativní sigma faktory ( $\Delta sigH$ ,  $\Delta rshA$ ,  $\Delta sigE$ ,  $\Delta sigM$ ). Vybrané konstrukty byly rovněž transformovány do kmenů *C. glutamicum*  $\Delta sigHM$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigEM$  nesoucích dvojité delece v genech pro sigma faktory.

Byly stanoveny promotorové aktivity CAT a identifikovány transkripční počátky, od kterých byly následně určeny promotorové oblasti s konvenčními sekvencemi motivů -10 a -35.

Gen *dnaJ2* kóduje molekulární chaperon účastníci se buněčné odpovědi na tepelný šok, jehož exprese je regulována alternativním sigma faktorem SigH (Busche *et al.*, 2012; Ehira *et al.*, 2009b). Z výsledků měření specifických aktivit CAT bylo prokázáno, že promotor *PdnaJ2* je aktivován tepelným šokem a etanolovým stresem a rovněž, že sigma faktor SigH se podílí na regulaci exprese genu *dnaJ2*. Transkripční analýzou byly identifikovány tři transkripční počátky (TSP1, TSP2 a TSP3) od kterých byly následně odvozeny tři promotorové oblasti (Obr 5.4), *P1dnaJ2* s konvenčními motivy -10 (5'-taatct-3') a -35 (5'-tatagt-3'), *P2dnaJ2* s konvenčními motivy -10 (5'-cgttgc-3') a -35 (5'-gggaac-3') a *P3dnaJ2* s konvenčními motivy -10 (5'-ggttgg-3') a -35 (5'-gcgact-3'). Promotorová oblast *P1dnaJ2* je svými konvenčními sekvencemi v oblastech -10 a -35 podobná SigA-dependentním promotorům. Promotorová oblast *P2dnaJ2* obsahuje ve svých promotorových motivech -35 a -10 typické nukleotidové sekvence SigH-dependentních promotorů. Třetí identifikovaná promotorová oblast *P3dnaJ2* nevykazuje typické sekvence SigH případně SigA-dependentního promotoru. Z těchto výsledků bylo proto možné předpokládat, že tento promotor je rozeznáván jiným alternativním sigma faktorem.

Transkripční počátky TSP2 a TSP3 a jejich odvozené promotorové oblasti P2*dnaJ2* a P3*dnaJ2* byly lokalizovány uvnitř genu *hrcA*, kódujícího transkripční represor HrcA, který se specificky váže na úseky DNA označované jako CIRCE (Control Inverted Repeat of Chaperone Expression) (Buttner *et al.*, 2001).



**Obr. 5.4 – Promotorová oblast genu *dnaJ2* (cg2515).** Transkripční počátky TSP1, TSP2 a TSP3 a jejich odvozené hexamery -10 a -35 byly identifikované metodou *primer-extension*. Start kodon genu *dnaJ2* (*gtg*) je znázorněn červenou barvou. Transkripční počátky TSP2 a TSP3 a jejich odvozené hexamery se nachází ve vnitřní oblasti genu *hrcA*, jehož stop kodon *tag* je znázorněn černou barvou. Vzdálenost transkripčního počátku od start kodonu příslušného genu v nukleotidech je uvedena v závorce.

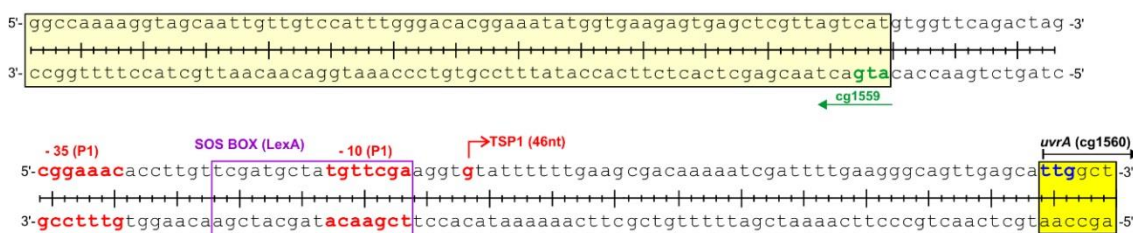
*In-vitro* transkripční analýza promotoru P2*dnaJ2* prokázala, že tento promotor je specificky rozeznáván sigma faktory SigH a SigE. Jedná se tedy o první promotor *C. glutamicum*, u kterého bylo dokázáno, že je rozeznáván více než jedním alternativním sigma faktorem. Naproti tomu u promotoru P3*dnaJ2* se metodou *in-vitro* transkripce nepodařilo prokázat vazbu žádného z testovaných sigma faktorů. Funkčnost potenciálního promotoru P3*dnaJ2* je tedy stále nejasná.

Gen *uvrA* (cg1560) kóduje protein nukleasu UvrA účastníci se SOS odpovědi a opravy DNA (Brune *et al.*, 2006). Na základě porovnání transkripčního profilu delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA* s divokým kmenem *C. glutamicum* metodou *DNA Microarray* za standardních podmínek bylo zjištěno, že exprese genu *uvrA* je zvýšená u delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA* a podléhá tak regulaci SigH-RshA (Busche *et al.*, 2012). Měření specifických aktivit CAT neprokázalo vliv stresových faktorů na aktivitu promotoru *PuvrA*. Transkripční analýzou byl identifikován jeden transkripční počátek (TSP1) od kterého byla následně odvozena promotorová oblast P1*uvrA* (Obr 5.5) s konvenčními motivy -10 (5'-tggtcga-3') a -35 (5'-cggaac-3'). Odvozená promotorová



oblast *P1<sub>uvrA</sub>* obsahuje v oblastech -10 a -35 konvenční sekvence typické pro SigH-dependentní promotory (Patek & Nesvera, 2011).

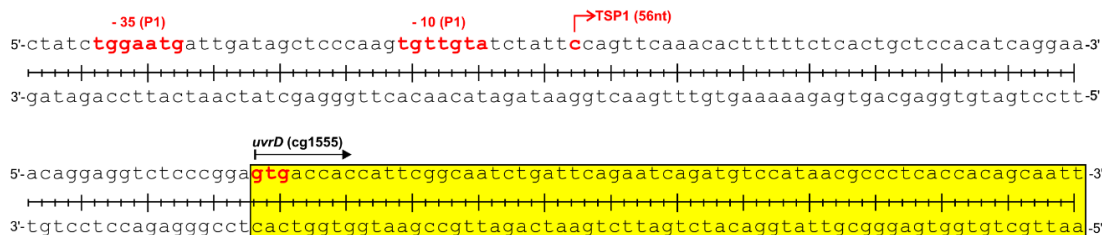
#### Promotorová oblast genu *uvrA* (*cg1560*) u *C. glutamicum*



**Obr. 5.5 – Promotorová oblast genu *uvrA* (*cg1560*).** Transkripční počátek TSP1 identifikovaný metodou *primer-extension* je znázorněn červeně, stejně jako jejich příslušná promotorová oblast P1 s motivy -10 a -35. Start kodon genu *uvrA* (*ttg*) je znázorněn modrou barvou. Stop kodon genu *cg1559* (*atg*) je znázorněn zelenou barvou. Vzdálenost transkripčního počátku od start kodonu v nukleotidech je uvedena v závorce. DNA vazebné místo pro protein LexA je znázorněno fialovým obdélníkem.

V mezigenové oblasti genů *cg1559* a *cg1560* byl na základě znalosti genomové sekvence identifikován tzv. 'SOS box', tedy úsek DNA kam se specificky váže protein LexA (Obr. 5.5) (Jochmann *et al.*, 2009). Gen *cg1559* kóduje předpokládanou n-dependentní hydrolasu vyznačující se konservovanou HNHc oblastí. SOS box i v tomto případě překrývá promotorovou oblast -10 *P1<sub>uvrA</sub>*. Lze tedy předpokládat, že za standardních podmínek je exprese genu *uvrA* negativně regulována důsledkem vazby proteinu LexA v této oblasti DNA.

Gen *uvrD* (*cg1555*) kóduje protein DNA/RNA helikasu účastnící se SOS odpovědi a opravy DNA (Brune *et al.*, 2006). Na základě porovnání transkripčního profilu delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA* s divokým kmenem *C. glutamicum* metodou *DNA Microarray* za standardních podmínek bylo zjištěno, že exprese genu *uvrD* je zvýšená u delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta$ *rshA* a podléhá tak regulaci SigH-RshA (Busche *et al.*, 2012). Výsledky měření specifických promotorových aktivit nebylo možné statisticky vyhodnotit z důvodu velmi nízkých hodnot, a tudíž nebylo možné prokázat vliv stresových faktorů na aktivitu promotorové oblasti *P<sub>uvrD</sub>*. Transkripční analýzou byl identifikován jeden transkripční počátek (TSP1) od kterého byla následně odvozena promotorová oblast *P1<sub>uvrD</sub>* (Obr 5.6) s konvenčními motivy -10 (5'-tggtgta-3') a -35 (5'-tggaatg-3'). Odvozená promotorová oblast *P1<sub>uvrD</sub>* obsahuje v oblastech -10 a -35 konvenční sekvence typické pro SigH-dependentní promotory (Patek & Nesvera, 2011).

Promotorová oblast genu *uvrD* (*cg1555*) u *C. glutamicum*

**Obr. 5.6 – Promotorová oblast genu *uvrD* (*cg1555*).** Transkripční počátek TSP1 identifikovaný metodou *primer-extension* je znázorněn červeně, stejně jako jeho příslušná promotorová oblast P1 s motivy -10 a -35. Start kodon genu *uvrD* (*gtg*) je znázorněn červenou barvou. Vzdálenost transkripčního počátku od start kodonu v nukleotidech je uvedena v závorce.

V promotorové oblasti genu *sigM*, který kóduje další alternativní ECF sigma faktor, byl identifikován jeden transkripční počátek a od něj následně odvozeny motivy -10 (5'-CGTTC-3') a -35 (5'-TGGTGAT-3') (Nakunst *et al.*, 2007). Tito autoři předpokládají, že promotor *PsigM* je SigH-dependentní. Naše výsledky měření specifických aktivit potvrdily, že v promotorové oblasti genu *sigM* se nachází aktivní promotor. Snížená aktivita tohoto promotoru v kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  poukazuje na to, že promotor *PsigM* může být specificky rozpoznáván i sigma faktorem SigE

Bylo zjištěno, že alternativní sigma faktor SigM rozeznává promotorové sekvence genů, jejichž produkty se účastní buněčné odpovědi na tepelný šok a oxidativní a disulfidový stres (Nakunst *et al.*, 2007). Jako SigM-dependentní promotory byly označeny promotory genů *trxB* a *trxB1*, které kódují thioredoxin reduktasu a thioredoxin (Nakunst *et al.*, 2007). Pro potvrzení tohoto výsledku byly promotory obou genů naklonovány do vektoru pRLG770 a testovány metodou *in-vitro* transkripce. Dosažené výsledky prokázaly, že promotory obou genů jsou specificky rozeznávané sigma faktorem SigH, avšak žádný produkt nevznikl s použitím sigma faktoru SigM. Problematika SigM-dependentních promotorů *C. glutamicum* je tak stále otevřená a je tématem další práce v Laboratoře molekulární genetiky MBÚ AV ČR.

Geny *cg2661* a *cg3405* kódují dithiol-disulfidovou isomerasu (DDI) a Zn-dependentní oxidoreduktasu (ZDO) (Kalinowski *et al.*, 2003). Oba proteiny účastníci se buněčné SOS odpovědi mají své orthology v kmeni *C. glutamicum* R (*cgR\_2320* a *cgR\_2964*), kde byl u obou těchto genů identifikován SigH-dependentní promotor (Ehira *et al.*, 2009b). Promotorové oblasti byly klonovány do *promotor-probe* vektoru pET2 a byla stanovena jejich promotorová aktivita CAT za standardních podmínek a po tepelném šoku. Dosažené výsledky však nepotvrdily přítomnost SigH-dependentního promotoru.

#### 5.4 Analýza promotorů rozeznávaných dvěma sigma faktory

Transkripce jednoho genu z různých promotorů specificky rozeznávaných různými sigma faktory byla již v minulosti popsána u řady mikroorganismů. U bakterie *E. coli* byly publikovány promotory rozeznávané primárním sigma faktorem  $\sigma^{70}$  a současně sigma faktory  $\sigma^{32}$  (Wade *et al.*, 2006) a  $\sigma^{38}$  (Olvera *et al.*, 2009). Podobně u *Bacillus subtilis* byly identifikovány duální promotory rozeznávané sigma faktory  $\sigma^X$  a  $\sigma^M$  (Luo & Helmann, 2009) respektive  $\sigma^X$  a  $\sigma^W$  (Qiu & Helmann, 2001). U *Mycobacterium tuberculosis* bylo zjištěno, že promotor genu *sigB* (kódující alternativní sigma faktor) je specificky rozeznáván třemi různými sigma faktory  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^L$  (Dainese *et al.*, 2006). Zdá se tedy, že u bakterií je překryv sigma faktorů na specificitu promotorů běžnou strategií.

U *C. glutamicum* byly již dříve identifikovány geny, jejichž exprese je řízena více jak jedním sigma faktorem, např. u operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, kódujícího molekulární chaperony účastníci se buněčné odpovědi na tepelný šok, kde byl identifikován SigA-dependenční promotor P1*dnaK* a SigH-dependenční promotor P2*dnaK* (Barreiro *et al.*, 2004). Dalším takovým genem je *clgR*, kódující transkripční regulátor, kde byl identifikován SigH-dependenční promotor P1*clgR* a SigA-dependenční promotor P2*clgR* (Engels *et al.*, 2004).

Ve své práci jsem testoval další možnost regulace exprese genů na úrovni transkripce, a sice rozeznávání jednoho promotoru několika sigma faktory. Vybrané promotory byly klonovány do *promotor-probe* vektorů pET2 a pEPR1 a aktivity promotorů byla měřeny v divokém kmeni *C. glutamicum* a (Barreiro *et al.*, 2004; Barriuso-Iglesias *et al.*, 2012; Busche *et al.*, 2012; Ehira *et al.*, 2009b; Kim *et al.*, 2005a) jeho mutantách s delecemi v genech kódujících různé sigma faktory. Snížení aktivity v kmeni s delecí v genu pro příslušný sigma faktor poukazovalo na rozeznávání testovaného promotoru tímto sigma faktorem. Reziduální promotorová aktivita v tomto kmeni pak vedla k závěru, že příslušný promotor je rozeznáván ještě dalším sigma faktorem. Přímé důkazy pro rozlišení jednoho promotoru dvěma různými sigma faktory pak byly získány použitím metody *in-vitro* transkripce.

Bylo zjištěno, že aktivita promotoru P1*clgR* byla v delečním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  mírně snížena ve srovnání s divokým kmenem. Tento výsledek potvrdil přítomnost SigH-dependenčního promotoru, který byl již dříve publikován (Engels *et al.*, 2004). Zjištěná vysoká reziduální aktivita tohoto promotoru v *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  poukázala na možnost, že promotor P1*clgR* může být rozeznáván i jiným ECF sigma faktorem. *In-*

*in vitro* transkripční analýza pak potvrdila, že promotor P1*clgR* je rozeznáván dvěma ECF sigma faktory SigH a SigE.

*In-vitro* transkripční analýzou bylo prokázáno, že také promotory P2*dnaK* a P2*dnaJ2* jsou rozeznávány dvěma ECF sigma faktory SigH a SigE. Z těchto výsledků vyplývá, že sigma faktor SigE, jehož funkce u *C. glutamicum* dosud nebyla detailně studována, rozeznává stejné nebo velmi podobné promotorové sekvence jako detailně popsany sigma faktor SigH (Barreiro *et al.*, 2004; Barriuso-Iglesias *et al.*, 2012; Busche *et al.*, 2012; Ehira *et al.*, 2009b; Choi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005a; Kormanec & Sevcikova, 2002; Raman *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2003; Taniguchi & Wendisch, 2015; Toyoda *et al.*, 2015). I když *in-vitro* transkripční analýza jednoznačně prokázala, že promotory P2*dnaK* a P2*dnaJ2* jsou rozeznávány jak sigma faktorem SigH, tak sigma faktorem SigE, výsledky testování aktivity těchto promotorů v kmenech *C. glutamicum*  $\Delta sigH$  a *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  tento jev přímo neprokázaly. Vysoká aktivita promotorů P2*dnaK* a P2*dnaJ2* v obou testovaných delečních kmenech může být vysvětlena tím, že sigma faktory SigH a SigE se při rozeznávání příslušných promotorů vzájemně účinně zastupují. Přímým důkazem vzájemného zastupování těchto sigma faktorů by bylo zjištění nulové promotorové aktivity v kmeni *C. glutamicum*  $\Delta sigHE$ . Tento kmen se však přes všechny snahy nepodařilo sestavit, velmi pravděpodobně z důvodu letálního efektu současné delece obou genů *sigH* a *sigE*. Zjištění, že aktivita promotorů P2*dnaK* a P2*dnaJ2* v *C. glutamicum*  $\Delta sigE$  je dokonce vyšší než v divokém kmeni může být vysvětlena chybějící kompeticí méně aktivního sigma faktoru SigE s aktivnějším sigma faktorem SigH o jádro RNAP, což se může projevit vyšší transkripční aktivitou čistého holoenzymu RNAP + SigH v buňce.

*In-vitro* transkripční analýza rovněž potvrdila, že silný vegetativní promotor P*per* je rozeznáván sigma faktory SigA a SigB. Tento výsledek je v souladu s již dříve publikovanými promotorovými analýzami sigma faktorů SigA a SigB, které odhalily vysokou podobnost jejich promotorové specificity v oblasti promotorového motivu -10 (Ehira *et al.*, 2008; Larisch *et al.*, 2007; Patek & Nesvera, 2011; Patek *et al.*, 2013) a tedy případný překryv obou sigma faktorů.

Prezentované výsledky prokazují, že pro získání spolehlivých údajů o regulaci transkripce působením sigma faktorů je nutné použití kombinace metod *in-vivo* i *in-vitro*.

## 6. Závěr

Ve své disertační práci s názvem „Účast alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při regulaci exprese genů *Corynebacterium glutamicum*“ jsem se zabýval studiem exprese genů, jejichž produkty se účastní buněčné odpovědi na stres vyvolaný vnějšími podmínkami. Dílčími cíli práce byly: (1) transkripční analýza operonu *sigH-rshA* kódujícího alternativní sigma faktor SigH a jeho předpokládaný anti-sigma faktor RshA; (2) identifikace genů, jejichž exprese je řízena systémem SigH-RshA; (3) analýza promotorových oblastí těchto genů, tj. stanovení promotorových aktivit za různých fyziologických podmínek, identifikace transkripčních počátků a určení promotorových motivů -10 a -35; (4) sestavení *in-vitro* transkripčního systému a jeho použití při analýze vybraných promotorů.

V disertační práci bylo dosaženo těchto výsledků:

1) Stanovením aktivit promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA* byla prokázána u obou genů přítomnost aktivních promotorů reagujících na vnější stresové podmínky a bylo zjištěno, že delece v genu *sigH* měla negativní vliv na aktivitu promotorů obou genů. U genu *sigH* byly identifikovány 4 transkripční počátky a odvozeny 4 promotory, které byly podle svých -10 a -35 sekvencí určeny jako SigA-dependentní. Exprese genu *sigH* je tedy zřejmě řízena primárním sigma faktorem SigA a pravděpodobně nepřímou regulována i alternativním sigma faktorem SigH, který se tak podílí i na regulaci exprese vlastního genu. Transkripční analýzou genu *rshA* byly identifikovány 2 transkripční počátky odpovídající jednomu promotoru, který obsahuje konservované motivy SigH-dependentních promotorů (GGAA (-35) a GTT (-10)), což dokazuje, že exprese genu *rshA*, kódujícího anti-sigma faktor, je řízena sigma faktorem SigH.

2) Identifikace SigH-dependentních genů byla provedena stanovením transkripčního profilu analýzou DNA Microarray u delečního kmene *C. glutamicum*  $\Delta rshA$ . s nefunkčním anti-sigma faktorem RshA. Celkem bylo identifikováno 83 genů, jejichž exprese byla zvýšená v delečním kmeni *C. glutamicum*  $\Delta rshA$  a jsou tedy zřejmě SigH-dependentní. Mezi nově identifikované SigH-dependentní geny patří např. geny *uvrA*, *uvrC*, *uvrD*, *mshC* a *mca*. Dosažené výsledky potvrdily předpoklad funkce proteinu RshA jako anti-sigma faktoru k SigH.

3) U nově identifikovaných SigH-dependentních promotorů genů *uvrA* a *uvrD* a rovněž u promotorů genu *dnaJ2* byly stanoveny jejich aktivity, identifikovány transkripční počátky a následně odvozeny promotorové motivy -10 a -35. U genů *uvrA*

a *uvrD* byl identifikován vždy 1 transkripční počátek a následně odvozen jeden SigH-dependentní promotor. U genu *dnaJ2* byly identifikovány 3 transkripční počátky a odvozeny 3 promotory (P1*dnaJ2*, P2*dnaJ2* a P3*dnaJ2*). Na základě sekvencí oblastí -10 a -35 promotorů P1*dnaJ2* a P2*dnaJ2* bylo navrženo, že P1*dnaJ2*, je rozeznáván primárním sigma faktorem SigA, zatímco P2*dnaJ2* alternativním sigma faktorem SigH. Promotor P3*dnaJ2* neobsahuje -10 a -35 sekvence typické pro SigA- nebo SigH-dependentní promotor a jeho funkce a regulace je nejasná.

4) Analýzou promotorů SigH-dependentních genů byly identifikovány transkripční počátky a následně odvozeny oblasti -10 a -35 těchto genů. Z výsledků získaných stanovením promotorových aktivit v kmenech *C. glutamicum* s delecí v genech kódujících různé sigma faktory bylo možné usuzovat, že tyto promotory mohou být specificky rozeznávány více než jedním ECF sigma faktorem. K potvrzení tohoto předpokladu byl sestrojen *in-vitro* transkripční systém, založený na použití jádra RNA polymerasy a určitého sigma faktoru. Tento systém umožňuje testovat schopnost sigma faktoru rozpoznat a iniciovat transkripci z promotorové oblasti naklonovaného do vektoru pRLG770. Výsledky *in-vitro* transkripční analýzy dokázaly, že promotory P2*dnaJ2*, P1*clgR* a P2*dnaK* jsou specificky rozeznávány sigma faktorem SigH i sigma faktorem SigE. Jedná se tak o první přímý důkaz, že jeden promotor *C. glutamicum* je specificky rozeznáván dvěma rozdílnými sigma faktory. U vegetativního promotoru *Pper* bylo prokázáno, že jeho exprese může být řízena jak primárním sigma faktorem SigA, tak sigma faktorem SigB (*primary like sigma factor*).

Na základě dosažených výsledků byly zmapovány geny, jejichž aktivita je regulována různými typy stresů vnějšího prostředí, hlavně pak účinkem zvýšené teploty. U těchto genů byly identifikovány transkripční počátky a odvozeny příslušné promotorové oblasti. K promotorové analýze byly použity *in-vivo* metody a současně byl zkonstruován *in-vitro* transkripční systém umožňující přímé testování vlivu konkrétního sigma faktoru na daný promotor. Kombinací *in-vivo* a *in-vitro* metod bylo tak vůbec poprvé experimentálně prokázáno, že transkripce genu z konkrétního promotoru je u *C. glutamicum* řízena více než jedním sigma faktorem. Bakterie *C. glutamicum* se řadí mezi významné producenty aminokyselin. Pochopení aktivace genové exprese za podmínek zvýšené teploty může být využito např. při konstrukci produkčních kmenů klonováním tepelně aktivovaných promotorů před geny kódující enzymy biosyntézy. Tímto způsobem bude možné získat bezplazmidové producenty aminokyselin navíc s nechemickou indukci, která bude šetrnější k životnímu prostředí.

## 7. Seznam použité literatury

**Artsimovitch, I. & Henkin, T. M. (2009).** In vitro approaches to analysis of transcription termination. *Methods* **47**, 37-43.

**Barik, S., Sureka, K., Mukherjee, P., Basu, J. & Kundu, M. (2010).** RseA, the SigE specific anti-sigma factor of *Mycobacterium tuberculosis*, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis. *Mol Microbiol* **75**, 592-606.

**Barreiro, C., Gonzalez-Lavado, E., Patek, M. & Martin, J. F. (2004).** Transcriptional analysis of the groES-groEL1, groEL2, and dnaK genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *J Bacteriol* **186**, 4813-4817.

**Barreiro, C., Nakunst, D., Huser, A. T., de Paz, H. D., Kalinowski, J. & Martin, J. F. (2009).** Microarray studies reveal a 'differential response' to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **155**, 359-372.

**Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Sola-Landa, A. & Martin, J. F. (2012).** Transcriptional control of the FOF1-ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microb Biotechnol* **6**, 178-188.

**Bashyam, M. D. & Hasnain, S. E. (2004).** The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect Genet Evol* **4**, 301-308.

**Blombach, B. & Eikmanns, B. J. (2011).** Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Bioeng Bugs* **2**, 346-350.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

**Brinkrolf, K., Brune, I. & Tauch, A. (2007).** The transcriptional regulatory network of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **129**, 191-211.

**Brinkrolf, K., Schroder, J., Puhler, A. & Tauch, A. (2010).** The transcriptional regulatory repertoire of *Corynebacterium glutamicum*: reconstruction of the network controlling pathways involved in lysine and glutamate production. *J Biotechnol* **149**, 173-182.

**Brockmann-Gretza, O. & Kalinowski, J. (2006).** Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in presence and absence of the rel gene encoding (p)ppGpp synthase. *BMC Genomics* **7**, 230.

**Brown, K. L. & Hughes, K. T. (1995).** The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* **16**, 397-404.

**Browning, D. F. & Busby, S. J. (2004).** The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**, 57-65.

**Brune, I., Brinkrolf, K., Kalinowski, J., Puhler, A. & Tauch, A. (2005).** The individual and common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. *BMC Genomics* **6**, 86.

- Brune, I., Werner, H., Huser, A. T., Kalinowski, J., Puhler, A. & Tauch, A. (2006).** The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **7**, 21.
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y. & Gralla, J. D. (2000).** The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol* **182**, 4129-4136.
- Busche, T., Silar, R., Picmanova, M., Patek, M. & Kalinowski, J. (2012).** Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **13**, 445.
- Butala, M., Zgur-Bertok, D. & Busby, S. J. (2009).** The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci* **66**, 82-93.
- Buttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C. & other authors (2001).** A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **22**, 2908-2935.
- Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M. L. & Darst, S. A. (2002).** Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* **9**, 527-539.
- Carmona, M., Claverie-Martin, F. & Magasanik, B. (1997).** DNA bending and the initiation of transcription at sigma54-dependent bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9568-9572.
- Casonato, S., Proveddi, R., Dainese, E., Palu, G. & Manganelli, R. (2014).** *Mycobacterium tuberculosis* requires the ECF sigma factor SigE to arrest phagosome maturation. *PLoS One* **9**, e108893.
- Craig, E. A. (1985).** The stress response: changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. *Science* **230**, 800-801.
- Dainese, E., Rodrigue, S., Delogu, G. & other authors (2006).** Posttranslational regulation of *Mycobacterium tuberculosis* extracytoplasmic-function sigma factor sigma L and roles in virulence and in global regulation of gene expression. *Infect Immun* **74**, 2457-2461.
- Davis, E. O., Dullaghan, E. M. & Rand, L. (2002).** Definition of the mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **184**, 3287-3295.
- Debarbouille, M., Martin-Verstraete, I., Kunst, F. & Rapoport, G. (1991).** The *Bacillus subtilis* sigL gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9092-9096.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T. & other authors (1998).** The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**, 353-358.
- den Hengst, C. D. & Buttner, M. J. (2008).** Redox control in actinobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1201-1216.
- Deutscher, M. P. (2003).** Degradation of stable RNA in bacteria. *J Biol Chem* **278**, 45041-45044.



- Dona, V., Rodrigue, S., Dainese, E., Palu, G., Gaudreau, L., Manganelli, R. & Provvedi, R. (2008).** Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **190**, 5963-5971.
- Dondrup, M., Albaum, S. P., Griebel, T. & other authors (2009).** EMMA 2--a MAGe-compliant system for the collaborative analysis and integration of microarray data. *BMC Bioinformatics* **10**, 50.
- Ebright, R. H. (2000).** RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* **304**, 687-698.
- Ehira, S., Shirai, T., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2008).** Group 2 sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation. *Appl Environ Microbiol* **74**, 5146-5152.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2009).** Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *J Bacteriol* **191**, 2964-2972.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M. & Schaffer, S. (2004).** clpC and clpP1P2 gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH. *Mol Microbiol* **52**, 285-302.
- Erill, I., Campoy, S. & Barbe, J. (2007).** Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 637-656.
- Fassler, J. S. & Gussin, G. N. (1996).** Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies. *Methods Enzymol* **273**, 3-29.
- Feklistov, A. & Darst, S. A. (2011).** Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit. *Cell* **147**, 1257-1269.
- Feng, J., Che, Y., Milse, J. & other authors (2006).** The gene ncgI2918 encodes a novel maleylpyruvate isomerase that needs mycothiol as cofactor and links mycothiol biosynthesis and gentisate assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **281**, 10778-10785.
- Follmann, M., Becker, M., Ochrombel, I., Ott, V., Kramer, R. & Marin, K. (2009).** Potassium transport in *Corynebacterium glutamicum* is facilitated by the putative channel protein CglK, which is essential for pH homeostasis and growth at acidic pH. *J Bacteriol* **191**, 2944-2952.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M. & other authors (1997).** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**, 580-586.
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M. & other authors (1998).** Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**, 375-388.
- Fujita, M., Sagara, Y. & Aramaki, H. (2000).** In vitro transcription system using reconstituted RNA polymerase (E sigma(70), E sigma(H), E sigma(E) and E sigma(S)) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fems Microbiology Letters* **183**, 253-257.

- Gamulin, V., Cetkovic, H. & Ahel, I. (2004).** Identification of a promoter motif regulating the major DNA damage response mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 57-63.
- Gardan, R., Rapoport, G. & Debarbouille, M. (1997).** Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **24**, 825-837.
- Giacomini, E., Sotolongo, A., Iona, E. & other authors (2006).** Infection of human dendritic cells with a *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant stimulates production of high levels of interleukin-10 but low levels of CXCL10: impact on the T-cell response. *Infect Immun* **74**, 3296-3304.
- Gopinath, V., Murali, A., Dhar, K. S. & Nampoothiri, K. M. (2012).** *Corynebacterium glutamicum* as a potent biocatalyst for the bioconversion of pentose sugars to value-added products. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 95-106.
- Gottesman, S., Storz, G., Rosenow, C., Majdalani, N., Repoila, F. & Wassarman, K. M. (2001).** Small RNA regulators of translation: mechanisms of action and approaches for identifying new small RNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**, 353-362.
- Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J. & Young, B. (1998).** The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 141-155.
- Gruber, T. M. & Gross, C. A. (2003).** Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**, 441-466.
- Halgasova, N., Bukovska, G., Timko, J. & Kormanec, J. (2001).** Cloning and transcriptional characterization of two sigma factor genes, sigA and sigB, from *Brevibacterium flavum*. *Curr Microbiol* **43**, 249-254.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- He, H., Hovey, R., Kane, J., Singh, V. & Zahrt, T. C. (2006).** MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **188**, 2134-2143.
- Helmann, J. D. (2002).** The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**, 47-110.
- Hengge-Aronis, R. (2002).** Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 373-395, table of contents.
- Hermann, T. (2003).** Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* **104**, 155-172.
- Hernandez Pando, R., Aguilar, L. D., Smith, I. & Manganelli, R. (2010).** Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* **78**, 3168-3176.

- Hinton, J. C., Hautefort, I., Eriksson, S., Thompson, A. & Rhen, M. (2004).** Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr Opin Microbiol* **7**, 277-282.
- Holatko, J., Elisakova, V., Prouza, M., Sobotka, M., Nesvera, J. & Patek, M. (2008).** Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *J Biotechnol* **139**, 203-210.
- Holatko, J., Silar, R., Rabatinova, A., Sanderova, H., Halada, P., Nesvera, J., Krasny, L. & Patek, M. (2012).** Construction of in vitro transcription system for *Corynebacterium glutamicum* and its use in the recognition of promoters of different classes. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 521-529.
- Huser, A. T., Becker, A., Brune, I., Dondrup, M., Kalinowski, J., Plassmeier, J., Puhler, A., Wiegrabe, I. & Tauch, A. (2003).** Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J Biotechnol* **106**, 269-286.
- Huser, A. T., Chassagnole, C., Lindley, N. D. & other authors (2005).** Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3255-3268.
- Chatterji, D. & Ojha, A. K. (2001).** Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**, 160-165.
- Choi, W. W., Park, S. D., Lee, S. M., Kim, H. B., Kim, Y. & Lee, H. S. (2008).** The whcA gene plays a negative role in oxidative stress response of *Corynebacterium glutamicum*. *Fems Microbiology Letters* **290**, 32-38.
- Ikeda, M. & Nakagawa, S. (2003).** The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 99-109.
- Ikeda, M., Baba, M., Tsukamoto, N., Komatsu, T., Mitsuhashi, S. & Takeno, S. (2009).** Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 2806-2808.
- Ishige, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V. F. & Sahm, H. (2003).** The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol* **185**, 4519-4529.
- Jackman, P. J. & Pelczynska, S. (1986).** Characterization of *Corynebacterium* group JK by whole-cell protein patterns. *J Gen Microbiol* **132**, 1911-1915.
- Jacques, J. F., Rodrigue, S., Brzezinski, R. & Gaudreau, L. (2006).** A recombinant *Mycobacterium tuberculosis* in vitro transcription system. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 140-147.
- Jager, W., Schafer, A., Puhler, A., Labes, G. & Wohlleben, W. (1992).** Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**, 5462-5465.

- Jakob, K., Satorhelyi, P., Lange, C., Wendisch, V. F., Silakowski, B., Scherer, S. & Neuhaus, K. (2007).** Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *J Bacteriol* **189**, 5582-5590.
- Jochmann, N., Kurze, A. K., Czaja, L. F. & other authors (2009).** Genetic makeup of the *Corynebacterium glutamicum* LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and in vitro DNA band shift assays. *Microbiology* **155**, 1459-1477.
- Jung, Y. G., Cho, Y. B., Kim, M. S., Yoo, J. S., Hong, S. H. & Roe, J. H. (2011).** Determinants of redox sensitivity in RsrA, a zinc-containing anti-sigma factor for regulating thiol oxidative stress response. *Nucleic Acids Res* **39**, 7586-7597.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D. & other authors (2003).** The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**, 5-25.
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R. & other authors (1999).** Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* **21**, 385-389.
- Kang, J. G., Paget, M. S., Seok, Y. J., Hahn, M. Y., Bae, J. B., Hahn, J. S., Kleanthous, C., Buttner, M. J. & Roe, J. H. (1999).** RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J* **18**, 4292-4298.
- Kaushal, D., Schroeder, B. G., Tyagi, S. & other authors (2002).** Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8330-8335.
- Khamis, A., Raoult, D. & La Scola, B. (2004).** rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* **42**, 3925-3931.
- Kim, M. S., Hahn, M. Y., Cho, Y., Cho, S. N. & Roe, J. H. (2009).** Positive and negative feedback regulatory loops of thiol-oxidative stress response mediated by an unstable isoform of sigmaR in actinomycetes. *Mol Microbiol* **73**, 815-825.
- Kim, T. H., Kim, H. J., Park, J. S., Kim, Y., Kim, P. & Lee, H. S. (2005a).** Functional analysis of sigH expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 1542-1547.
- Kim, T. H., Park, J. S., Kim, H. J., Kim, Y., Kim, P. & Lee, H. S. (2005b).** The whcE gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 757-764.
- Knoppova, M., Phensajjai, M., Vesely, M., Zemanova, M., Nesvera, J. & Patek, M. (2007).** Plasmid vectors for testing in vivo promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. *Curr Microbiol* **55**, 234-239.
- Kormanec, J. & Sevcikova, B. (2002).** Stress-response sigma factor sigma(H) directs expression of the gltB gene encoding glutamate synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1577**, 149-154.
- Krasny, L. & Gourse, R. L. (2004).** An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J* **23**, 4473-4483.

- Larisch, C., Nakunst, D., Huser, A. T., Tauch, A. & Kalinowski, J. (2007).** The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Genomics* **8**, 4.
- Lee, J., Saddler, J. N., Um, Y. & Woo, H. M. (2016).** Adaptive evolution and metabolic engineering of a cellobiose- and xylose- negative *Corynebacterium glutamicum* that co-utilizes cellobiose and xylose. *Microb Cell Fact* **15**, 20.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. & Drauz, K. (2005).** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 1-8.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. & Schleifer, K. H. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett* **53**, 299-303.
- Loewen, P. C. & Hengge-Aronis, R. (1994).** The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* **48**, 53-80.
- Lonetto, M., Gribskov, M. & Gross, C. A. (1992).** The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**, 3843-3849.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E. & Buttner, M. J. (1994).** Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7573-7577.
- Luo, Y. & Helmann, J. D. (2009).** Extracytoplasmic function sigma factors with overlapping promoter specificity regulate sublancin production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **191**, 4951-4958.
- Maeda, H., Fujita, N. & Ishihama, A. (2000).** Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **28**, 3497-3503.
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., Dubnau, E., Gomez, M. & Smith, I. (2002).** Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol* **45**, 365-374.
- Manganelli, R., Provvedi, R., Rodrigue, S., Beaucher, J., Gaudreau, L. & Smith, I. (2004).** Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **186**, 895-902.
- Mathew, R. & Chatterji, D. (2006).** The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol* **14**, 450-455.
- Matsoso, L. G., Kana, B. D., Crellin, P. K. & other authors (2005).** Function of the cytochrome bc1-aa3 branch of the respiratory network in mycobacteria and network adaptation occurring in response to its disruption. *J Bacteriol* **187**, 6300-6308.
- Mentz, A., Neshat, A., Pfeifer-Sancar, K., Puhler, A., Ruckert, C. & Kalinowski, J. (2013).** Comprehensive discovery and characterization of small RNAs in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics* **14**, 714.
- Merrick, M. J. (1993).** In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* **10**, 903-909.

- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H. & Severinov, K. (2001).** Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 892-897.
- Mishra, A. K., Alderwick, L. J., Rittmann, D., Tatituri, R. V., Nigou, J., Gilleron, M., Eggeling, L. & Besra, G. S. (2007).** Identification of an alpha(1->6) mannopyranosyltransferase (MptA), involved in *Corynebacterium glutamicum* lipomanann biosynthesis, and identification of its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **65**, 1503-1517.
- Moker, N., Brocker, M., Schaffer, S., Kramer, R., Morbach, S. & Bott, M. (2004).** Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol* **54**, 420-438.
- Muffler, A., Bettermann, S., Haushalter, M., Horlein, A., Neveling, U., Schramm, M. & Sorgenfrei, O. (2002).** Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J Biotechnol* **98**, 255-268.
- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O. & Darst, S. A. (2002a).** Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **296**, 1285-1290.
- Murakami, K. S., Masuda, S. & Darst, S. A. (2002b).** Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**, 1280-1284.
- Nakahigashi, K., Ron, E. Z., Yanagi, H. & Yura, T. (1999).** Differential and independent roles of a sigma(32) homolog (RpoH) and an HrcA repressor in the heat shock response of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **181**, 7509-7515.
- Nakunst, D., Larisch, C., Huser, A. T., Tauch, A., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2007).** The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J Bacteriol* **189**, 4696-4707.
- Nesvera, J., Patek, M., Hochmannova, J., Abrhamova, Z., Becvarova, V., Jelinkova, M. & Vohradsky, J. (1997).** Plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum* codes for a gene product that positively influences plasmid copy number. *J Bacteriol* **179**, 1525-1532.
- Newton, G. L., Arnold, K., Price, M. S. & other authors (1996).** Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J Bacteriol* **178**, 1990-1995.
- Newton, G. L., Buchmeier, N. & Fahey, R. C. (2008).** Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 471-494.
- Newton, G. L. & Fahey, R. C. (2008).** Regulation of mycothiol metabolism by sigma(R) and the thiol redox sensor anti-sigma factor RsrA. *Mol Microbiol* **68**, 805-809.
- Nishimura, T., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2011).** Gene expression profiling of *Corynebacterium glutamicum* during Anaerobic nitrate respiration: induction of the SOS response for cell survival. *J Bacteriol* **193**, 1327-1333.

- Oguiza, J. A., Marcos, A. T. & Martin, J. F. (1997).** Transcriptional analysis of the sigA and sigB genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 111-117.
- Oide, S., Gunji, W., Moteki, Y., Yamamoto, S., Suda, M., Jojima, T., Yukawa, H. & Inui, M. (2015).** Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Appl Environ Microbiol* **81**, 2284-2298.
- Olvera, L., Mendoza-Vargas, A., Flores, N., Olvera, M., Sigala, J. C., Gosset, G., Morett, E. & Bolivar, F. (2009).** Transcription analysis of central metabolism genes in *Escherichia coli*. Possible roles of sigma38 in their expression, as a response to carbon limitation. *PLoS One* **4**, e7466.
- Paget, M. S., Molle, V., Cohen, G., Aharonowitz, Y. & Buttner, M. J. (2001).** Defining the disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the sigmaR regulon. *Mol Microbiol* **42**, 1007-1020.
- Paget, M. S. (2015).** Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* **5**, 1245-1265.
- Park, S. D., Youn, J. W., Kim, Y. J., Lee, S. M., Kim, Y. & Lee, H. S. (2008).** *Corynebacterium glutamicum* sigmaE is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE. *Microbiology* **154**, 915-923.
- Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A., Gimenez, M. N. & Collins, M. D. (1995).** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 724-728.
- Patek, M. & Nesvera, J. (2011).** Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **154**, 101-113.
- Patek, M., Holatko, J., Busche, T., Kalinowski, J. & Nesvera, J. (2013).** *Corynebacterium glutamicum* promoters: a practical approach. *Microb Biotechnol*.
- Pauling, J., Rottger, R., Tauch, A., Azevedo, V. & Baumbach, J. (2012).** CoryneRegNet 6.0--Updated database content, new analysis methods and novel features focusing on community demands. *Nucleic Acids Res* **40**, D610-614.
- Pfeifer-Sancar, K., Mentz, A., Ruckert, C. & Kalinowski, J. (2013).** Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *BMC Genomics* **14**, 888.
- Price, M. N., Huang, K. H., Alm, E. J. & Arkin, A. P. (2005).** A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**, 880-892.
- Provvedi, R., Boldrin, F., Falciani, F., Palu, G. & Manganeli, R. (2009).** Global transcriptional response to vancomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **155**, 1093-1102.
- Qiu, J. & Helmann, J. D. (2001).** The -10 region is a key promoter specificity determinant for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigma factors sigma(X) and sigma(W). *J Bacteriol* **183**, 1921-1927.
- Raivio, T. L. & Silhavy, T. J. (2001).** Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **55**, 591-624.

- Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W. R., Jr. & Husson, R. N. (2001).** The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **183**, 6119-6125.
- Raman, S., Hazra, R., Dascher, C. C. & Husson, R. N. (2004).** Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence. *J Bacteriol* **186**, 6605-6616.
- Rand, L., Hinds, J., Springer, B., Sander, P., Buxton, R. S. & Davis, E. O. (2003).** The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. *Mol Microbiol* **50**, 1031-1042.
- Rodrigue, S., Provvedi, R., Jacques, P. E., Gaudreau, L. & Manganelli, R. (2006).** The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 926-941.
- Rodrigue, S., Brodeur, J., Jacques, P. E., Gervais, A. L., Brzezinski, R. & Gaudreau, L. (2007).** Identification of mycobacterial sigma factor binding sites by chromatin immunoprecipitation assays. *J Bacteriol* **189**, 1505-1513.
- Rosen, R. & Ron, E. Z. (2002).** Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. *Mass Spectrom Rev* **21**, 244-265.
- Ruckert, C., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2003).** Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *J Biotechnol* **104**, 213-228.
- Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A. K. & Singh, Y. (2010).** The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J* **277**, 605-626.
- Sambrook, J. a D. V. Russel (2001):** Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sassanfar, M. & Roberts, J. W. (1990).** Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* **212**, 79-96.
- Sawada, K., Kato, Y., Imai, K., Li, L., Wada, M., Matsushita, K. & Yokota, A. (2012).** Mechanism of increased respiration in an H<sup>+</sup>-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biosci Bioeng* **113**, 467-473.
- Seshasayee, A. S., Bertone, P., Fraser, G. M. & Luscombe, N. M. (2006).** Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr Opin Microbiol* **9**, 511-519.
- Shaw, W. V. (1975).** Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* **43**, 737-755.
- Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B. & other authors (2005).** Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* **309**, 1728-1732.
- Shultzaberger, R. K., Chen, Z., Lewis, K. A. & Schneider, T. D. (2007).** Anatomy of *Escherichia coli* sigma70 promoters. *Nucleic Acids Res* **35**, 771-788.



- Schroder, J. & Tauch, A. (2010).** Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 685-737.
- Si, M., Xu, Y., Wang, T. & other authors (2015).** Functional characterization of a mycothiol peroxidase in *Corynebacterium glutamicum* that uses both mycoferredoxin and thioredoxin reducing systems in the response to oxidative stress. *Biochem J* **469**, 45-57.
- Silar, R., Holatko, J., Rucka, L., Rapoport, A., Dostalova, H., Kaderabkova, P., Nesvera, J. & Patek, M. (2016).** Use of in vitro transcription system for analysis of *Corynebacterium glutamicum* promoters recognized by two sigma factors. *Curr Microbiol*.
- Silberbach, M., Huser, A., Kalinowski, J., Puhler, A., Walter, B., Kramer, R. & Burkovski, A. (2005a).** DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **119**, 357-367.
- Silberbach, M., Schafer, M., Huser, A. T., Kalinowski, J., Puhler, A., Kramer, R. & Burkovski, A. (2005b).** Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2391-2402.
- Small, J. L., Park, S. W., Kana, B. D., Ioerger, T. R., Sacchettini, J. C. & Ehrt, S. (2013).** Perturbation of cytochrome c maturation reveals adaptability of the respiratory chain in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio* **4**, e00475-00413.
- Song, T., Dove, S. L., Lee, K. H. & Husson, R. N. (2003).** RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. *Mol Microbiol* **50**, 949-959.
- Song, Y., Matsumoto, K., Yamada, M., Gohda, A., Brigham, C. J., Sinskey, A. J. & Taguchi, S. (2012).** Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 1917-1925.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & WardRainey, N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 479-491.
- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C. & other authors (1998).** Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**, 754-759.
- Stoddard, B. L. (2005).** Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys* **38**, 49-95.
- Studholme, D. J. & Buck, M. (2000).** The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 1-9.
- Studholme, D. J., Wigneshwereraj, S. R., Gallegos, M. T. & Buck, M. (2000).** Functionality of purified sigma(N) (sigma(54)) and a NifA-like protein from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus*. *J Bacteriol* **182**, 1616-1623.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sun, R., Converse, P. J., Ko, C., Tyagi, S., Morrison, N. E. & Bishai, W. R. (2004).** *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Mol Microbiol* **52**, 25-38.

**Šilar, R. (2007).** Promotory *Corynebacterium glutamicum* regulované alternativními sigma faktory RNA polymerasy.

**t Hoen, P. A., Ariyurek, Y., Thygesen, H. H., Vreugdenhil, E., Vossen, R. H., de Menezes, R. X., Boer, J. M., van Ommen, G. J. & den Dunnen, J. T. (2008).** Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic Acids Res* **36**, e141.

**Taniguchi, H. & Wendisch, V. F. (2015).** Exploring the role of sigma factor gene expression on production by *Corynebacterium glutamicum*: sigma factor H and FMN as example. *Front Microbiol* **6**, 740.

**Tauch, A., Kaiser, O., Hain, T. & other authors (2005).** Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J Bacteriol* **187**, 4671-4682.

**Toyoda, K. & Inui, M.** The extracytoplasmic function sigma factor sigma(C) regulates expression of a branched quinol oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **100**, 486-509.

**Toyoda, K. & Inui, M.** Regulons of global transcription factors in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 45-60.

**Toyoda, K., Teramoto, H., Yukawa, H. & Inui, M. (2015).** Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor sigmaH in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **197**, 483-496.

**van der Rest, M. E., Lange, C. & Molenaar, D. (1999).** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 541-545.

**van Vliet, A. H. (2009).** Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiol Lett* **302**, 1-7.

**Vanderpool, C. K., Balasubramanian, D. & Lloyd, C. R. (2011).** Dual-function RNA regulators in bacteria. *Biochimie* **93**, 1943-1949.

**VanOrsdel, C. E., Bhatt, S., Allen, R. J., Brenner, E. P., Hobson, J. J., Jamil, A., Haynes, B. M., Genson, A. M. & Hemm, M. R. (2013).** The *Escherichia coli* CydX protein is a member of the CydAB cytochrome bd oxidase complex and is required for cytochrome bd oxidase activity. *J Bacteriol* **195**, 3640-3650.

**Vašicová, P., Z. Abrahámová, J. Nešvera, M. Pátek, H. Sahn a B. Eikmanns (1998):** Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Tech*, 12 (10): 743-6.

**Vassilyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S. & Yokoyama, S. (2002).** Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **417**, 712-719.

- Veit, A., Rittmann, D., Georgi, T., Youn, J. W., Eikmanns, B. J. & Wendisch, V. F. (2009).** Pathway identification combining metabolic flux and functional genomics analyses: acetate and propionate activation by *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **140**, 75-83.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D. (2006).** How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 734-759.
- Vertes, A. A., Inui, M. & Yukawa, H. (2012).** Postgenomic approaches to using corynebacteria as biocatalysts. *Annu Rev Microbiol* **66**, 521-550.
- Wade, J. T., Castro Roa, D., Grainger, D. C., Hurd, D., Busby, S. J., Struhl, K. & Nudler, E. (2006).** Extensive functional overlap between sigma factors in *Escherichia coli*. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 806-814.
- Wagner, E. G., Altuvia, S. & Romby, P. (2002).** Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet* **46**, 361-398.
- Walker, G. C. (1984).** Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**, 60-93.
- Wang, T., Gao, F., Kang, Y., Zhao, C., Su, T., Li, M., Si, M. & Shen, X. (2016).** Mycothiol peroxidase MPx protects *Corynebacterium glutamicum* against acid stress by scavenging ROS. *Biotechnol Lett* **38**, 1221-1228.
- Wassarman, K. M. & Storz, G. (2000).** 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* **101**, 613-623.
- Watanabe, K., Teramoto, H., Suzuki, N., Inui, M. & Yukawa, H. (2013).** Influence of SigB inactivation on *Corynebacterium glutamicum* protein secretion. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4917-4926.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005).** Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**, 1591-1603.
- Wendisch, V. F., Bott, M. & Eikmanns, B. J. (2006).** Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol* **9**, 268-274.
- Wieschalka, S., Blombach, B. & Eikmanns, B. J. (2012).** Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**, 449-459.
- Wilson, C. & Dombroski, A. J. (1997).** Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **267**, 60-74.
- Wosten, M. M. (1998).** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 127-150.
- Yukawa, H., Omumasaba, C. A., Nonaka, H. & other authors (2007).** Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* **153**, 1042-1058.

**Yura, T. & Nakahigashi, K. (1999).** Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **2**, 153-158.

**Zemanova, M., Kaderabkova, P., Patek, M., Knoppova, M., Silar, R. & Nesvera, J. (2008).** Chromosomally encoded small antisense RNA in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **279**, 195-201.