

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

**Charles University in Prague
Faculty of Science
Department of Genetics and Microbiology**

**Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie
Ph.D. study program: Molecular and cell biology, genetics and virology**



Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

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

**The role of alternative sigma factors of RNA polymerase on regulation of gene
expression in *Corynebacterium glutamicum***

Mgr. Radoslav Šilar

Školitel / Supervisor: RNDr. Jan Nešvera, CSc.

Prague, 2016

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř molekulární genetiky bakterií
Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Autor: Mgr. Radoslav Šilar

Školitel: RNDr. Jan Nešvera, CSc.

Konzultant: Ing. Miroslav Pátek, CSc.

S touto disertační prací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod.....	6
2. Cíle práce a hypotézy	7
3. Materiál a metody.....	7
4. Výsledky a diskuze.....	7
5. Závěry.....	24
6. Introduction	27
7. Aims and the hypothesis	28
8. Materials and Methods	28
9. Results and discussion.....	28
10. Conclusions	45
Seznam použité literatury	48
Životopis / <i>Curriculum Vitae</i>	51
Seznam publikací / <i>List of publications</i>	52

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-dependentní 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-dependentní. Některé z těchto genů byly již dříve identifikovány jako SigH-dependentní 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-dependentních 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 *Pper* interaguje jak s primárním sigma faktorem SigA, tak se sigma faktorem SigB. U SigH-dependentních 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. 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*.

2. Cíle práce a hypotézy

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

3. Materiál a metody

Veškerý materiál a metody, použité v této práci, byly v zásadě stejné jako ty, které jsou publikovány v pracích Zemanova *et al.* (2008), Busche *et al.* (2012), Holatko *et al.* (2012), Silar *et al.* (2016).

4. Výsledky a diskuze

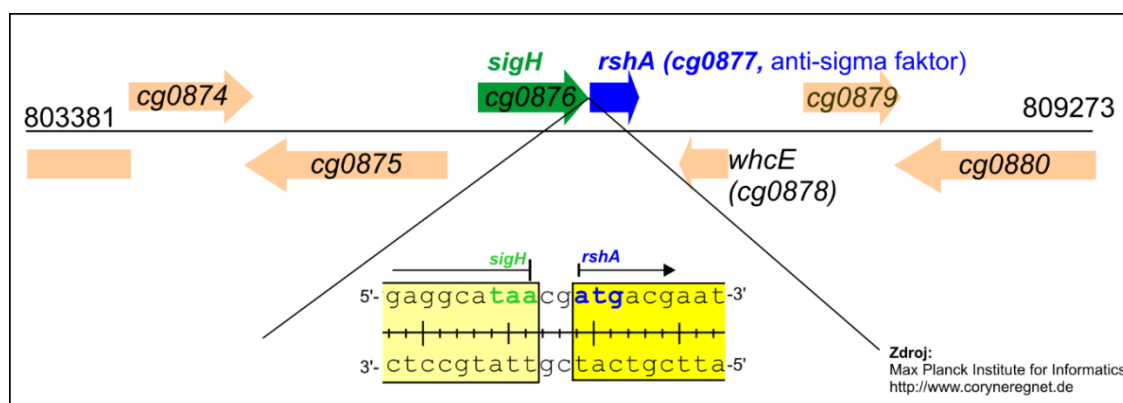
Hlavním cílem této disertační práce byla analýza regulace exprese genů *sigH* a *rshA*, kódujících stresový sigma faktor RNA polymerasy a jeho příslušný anti-sigma faktor u *Corynebacterium glutamicum*. Za různých fyziologických podmínek byla měřena aktivita promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA*, 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 aktivit promotorů pomocí reportérových systémů

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.*, 2012).

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. 1. Lze tedy předpokládat, že gen *sigH* tvoří s genem *rshA*, kódujícím jeho potenciální anti-sigma faktor, společný operon.



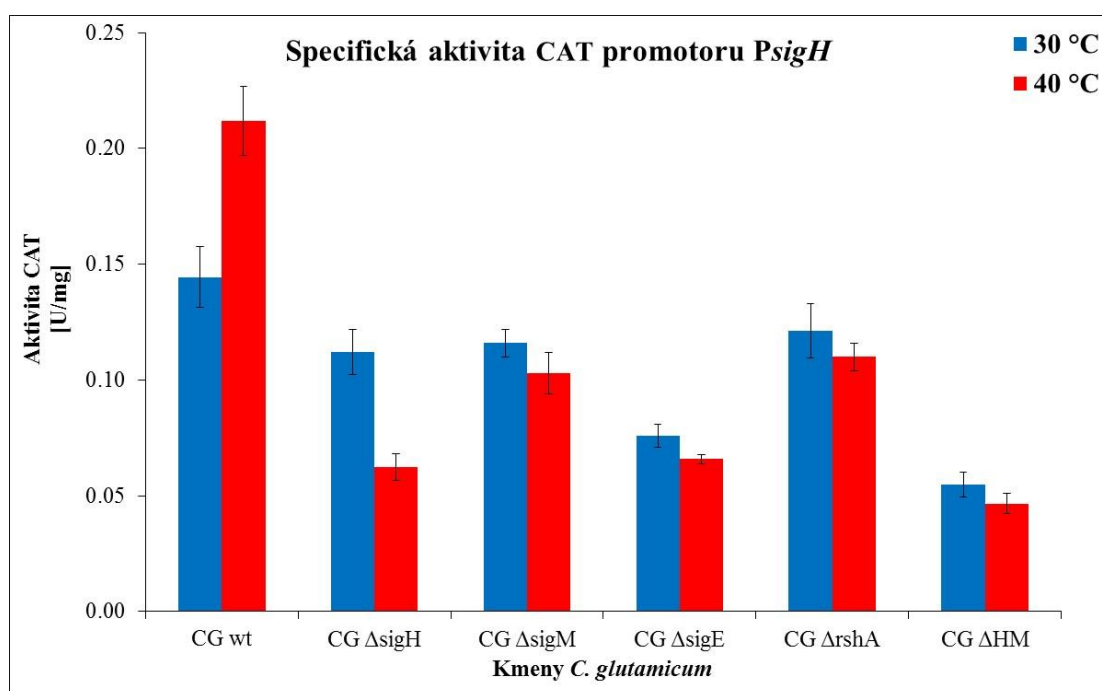
Obr. 1 - Lokalizace genů *sigH* a *rshA* v genomu *C. glutamicum* (genomový úsek 803381-809273 nt). Oba geny se nachází v těsné blízkosti a jsou od sebe odděleny dvojicí nukleotidů cytosinem a guaninem. Stop kodon (*taa*) genu *sigH* je označen zelenou barvou, iniciační kodon (*atg*) genu *rshA* je označen barvou modrou. Schéma bylo pořízeno na základě znalosti sekvence genomu *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003).

K identifikaci promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA*, byly *upstream* oblasti těchto genů klonovány do *promoter-probe* vektoru pET2 obsahujícího bezpromotorový reportérový gen *cat* kódující chloramfenikolacetyltransferasu (CAT). Získané konstrukty byly přeneseny do různých kmenů *C. glutamicum* a použity pro měření promotorových aktivit za fyziologických (30 °C) a 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.

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 °C) a za podmínek tepelného šoku (40 °C po dobu 60

minut). Výsledky měření specifických aktivit CAT promotorové oblasti genu *sigH* (*PsigH*) jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2 – 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 °C) a za podmínek tepelného šoku (červený sloupec, 40 °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 naměřeným 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 chromozomální delecí v genu *sigH*.

Následující experimenty byly zaměřeny na sledování vlivu dalších stresových faktorů na aktivitu promotorové oblasti *PsigH*. Byly testovány tyto stresy: etanolový (10% etanol v médiu), disulfidový (2mM diamid v médiu) a oxidativní (1% H_2O_2 v médiu). Buňky byly vystaveny výše zmíněným stresům po dobu 15 min.

U divokého kmene *C. glutamicum* bylo zjištěno zvýšení aktivity promotoru *PsigH* působením etanolového stresu (o 51 %), působením H_2O_2 (o 10 %) i účinkem disulfidového stresu (o 27 %) oproti hodnotám naměřeným za standardních podmínek. U

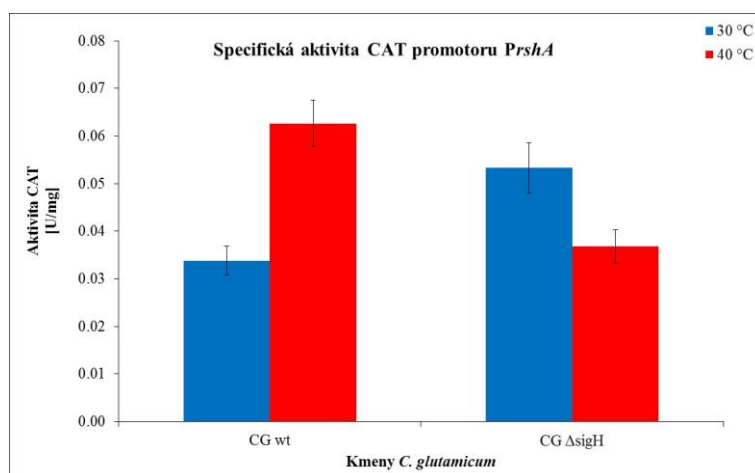
kmene $\Delta rshA$ došlo po disulfidovém stresu ke zvýšení promotorové aktivity, zatímco u delečního kmene $\Delta sigH$ došlo za těchto podmínek k mírnému snížení aktivity.

Z naměřených výsledků aktivit CAT promotorové oblasti P_{sigH} 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. Tyto výsledky jsou v souladu s uveřejněnou prací autora Kim *et al.* (2005), kde bylo zjištěno, že k aktivaci exprese genu $sigH$ je potřeba proteinu SigH.

Měření aktivity promotoru genu $rshA$

U divokého kmene *C. glutamicum* došlo u promotoru $PrshA$ ke zvýšení promotorové aktivity po tepelném šoku o 85 % oproti hodnotám naměřeným za standardních podmínek. U delečního kmene $\Delta sigH$ došlo naopak účinkem tepelného šoku ke snížení promotorové aktivity oproti hodnotám naměřeným za standardních podmínek (Obr. 3). Promotorová aktivita $PrshA$ se výrazně zvýšila účinkem disulfidového stresu ve srovnání s hodnotami naměřených za standardních podmínek pouze divokého kmene. U delečních kmenů $\Delta sigH$ a $\Delta rshA$ došlo naopak účinkem diamidu ke snížení aktivit promotoru $PrshA$ v porovnání s divokým kmenem. Aktivita promotoru genu $rshA$ byla za tepelného stresu výrazně snížena za přítomnosti delecí v genu kódujícím alternativní sigma faktor SigH.

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 $rshA$.



Obr. 3 – 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

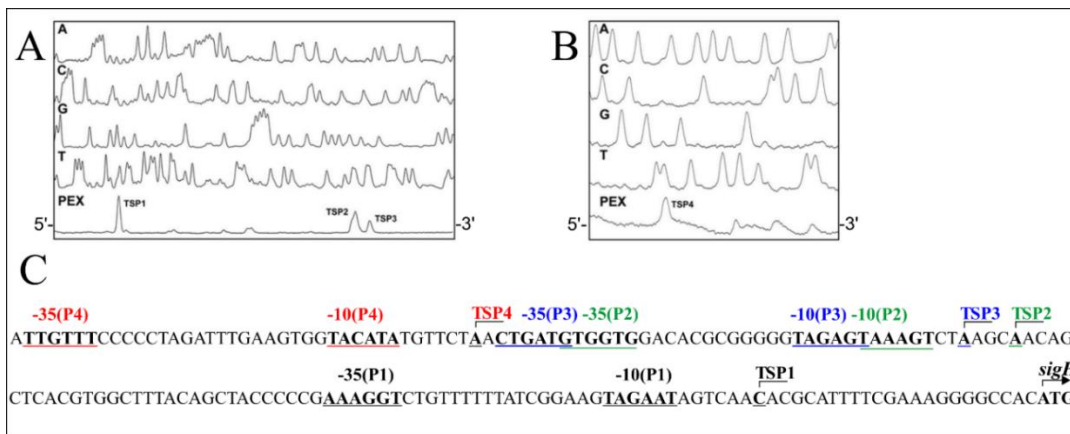
°C, 60 min). Znázorněné výsledky jsou aritmetické průměry ze čtyř nezávislých měření jednotlivých vzorků, směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.

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. Tyto výsledky jsou v souladu s uveřejněnou prací autora Kim *et al.* (2005), kde bylo zjištěno, že k aktivaci exprese genu *sigH* je potřeba proteinu SigH.

Určení transkripčních startů genu *sigH*

Pro přesné určení 5' konců příslušných mRNA, a tedy transkripčních startů (TSP) genu *sigH*, byla použita neradioaktivní metoda *primer-extension* (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. 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 analýza promotorové oblasti *PsigH* metodou *primer-extension* je znázorněna na Obr. 4.



Obr. 4. – Výsledky reakcí *primer-extension* promotorové oblasti genu *sigH*. (Busche *et al.*, 2012)

- 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).

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*. 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 (Busche *et al.*, 2012).

Výsledky experimentů PEX ukázaly na přítomnost dalšího transkripčního startu TSP4, který byl lokalizován 131 nt od translačního počátku genu *sigH*. Pro jeho přesné

určení byl zkonstruován konstrukt P4*sigH* o velikosti 348 bp, který byl klonován do vektoru pET2. Transkripční počátek TSP4 byl ověřen metodou 5' RACE (viz kapitola Materiál a Metody v disertační práci, 3.2.9.1). Na základě získaných výsledků byly odvozeny promotorové motivy -10 o sekvenci 5'-TACATA-3' a -35 o sekvenci 5'-TTGTTT-3'.

Z výsledků měření aktivit CAT promotoru P4*sigH* bylo patrné, že promotor P4*sigH* je aktivován tepelným šokem a disulfidovým stresem. Bylo zjištěno, že chromozomální 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 (Patek & Nesvera, 2011). Rozeznávání promotoru P4*sigH* primárním sigma faktorem SigH bylo opravdu prokázáno metodou transkripce *in-vitro*.

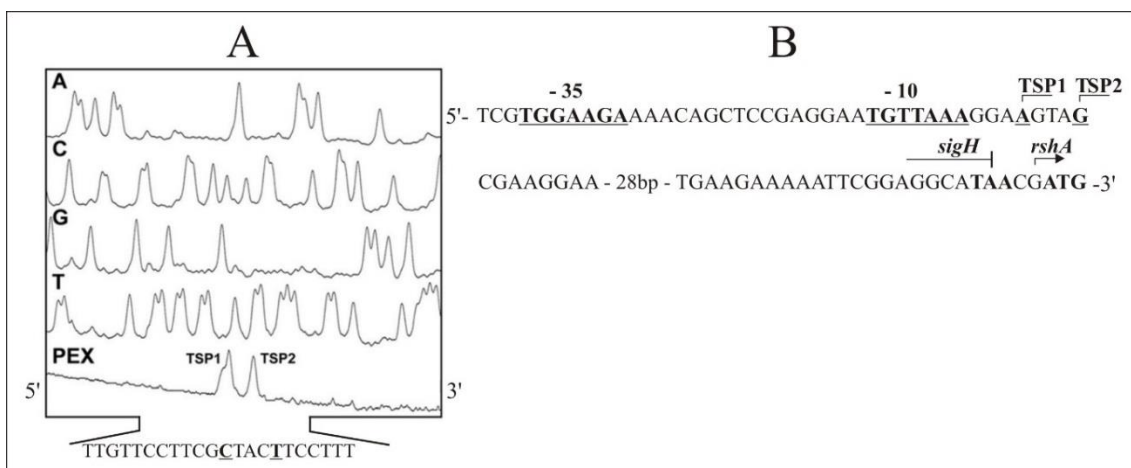
Vzhledem k tomu, že všechny 4 promotory genu *sigH* odpovídají svými oblastmi -10 a -35 vegetativním promotorům *C. glutamicum* (rozeznávaným zřejmě primárním sigma faktorem SigA), pozorovaný negativní vliv delece genu *sigH* na jejich aktivitu poukazuje na to, že exprese genu *sigH* je ovlivněna působením 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) (Patek & Nesvera, 2011).

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 (Jochmann *et al.*, 2009) (Kalinowski *et al.*, 2003). SOS buněčná odpověď je řízena globální regulační sítí a umožňuje bakteriím přežít v podmínkách poškození DNA (Walker, 1984). Protein LexA funguje jako transkripční represor, a to za podmínek, kdy není navozena buněčná SOS odpověď. SOS box překrývá promotorovou oblast -10 promotoru P4*sigH*, 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).

Určení transkripčních startů genu *rshA*

Pro analýzu struktury promotorové oblasti genu *rshA* byla použita výše popsaná metoda *primer-extension* a použit konstrukt *C. glutamicum*/pET2/*rshA* který byl kultivován za stejných podmínek jako v experimentu pro měření aktivity CAT tedy za

standardních podmínek (30 °C). Identifikované transkripční počátky genu *rshA* metodou *primer-extension* jsou znázorněny na Obr. 5 a popsány v textu.



Obr. 5 - Výsledky reakcí *primer-extension* promotorové oblasti genu *rshA*. (Busche *et al.*, 2012)

A - Dráhy A, C, G, T označují produkty sekvenační 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).

Transkripční analýzou genu *rshA* byly identifikovány 2 transkripční počátky (TSP1 a TSP2). K oběma transkripčním počátkům byla stanovena jediná prodloužená promotorová oblast s motivy -10 (5'-tgtaa-3') respektive -35 (5'-tggaaga-3') (Busche, Silar *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 oblastí -35 a -10 u *M. tuberculosis* (5'-G/TGGAAC/TA-16nt-C/GGTT-3') (Raman *et al.*, 2001).

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

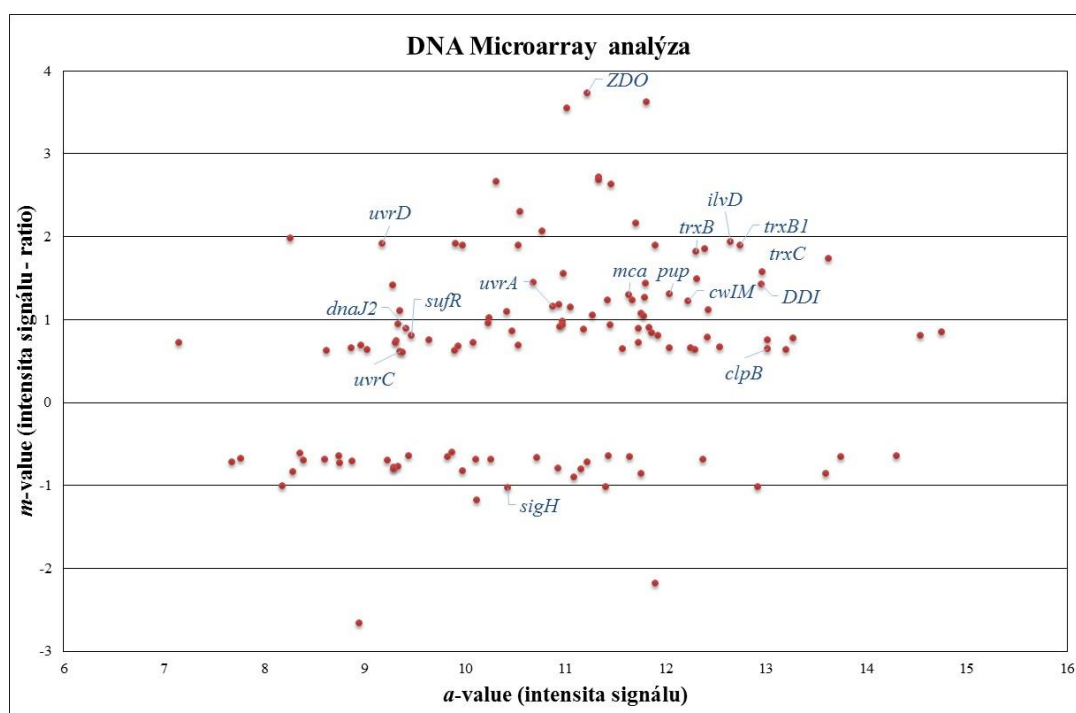
Sigma faktor SigH je za standardních podmínek vázán s anti-sigma faktorem RshA, což způsobuje jeho inaktivaci. Za podmínek buněčného stresu je tato reverzibilní vazba zrušena a sigma faktor SigH je uvolněn. Komplex sigma faktor - anti-sigma faktor byl již u *C. glutamicum* identifikován a to v případě sigma faktoru SigE, jehož aktivita je regulována anti-sigma faktorem CseE (Park *et al.*, 2008). U příbuzné bakterie *Mycobacterium tuberculosis* je sigma faktor SigH (ortholog sigma faktoru SigH u *C. glutamicum*) regulován anti-sigma faktorem RshA nebo u *Streptomyces coelicolor*, kde sigma faktor SigR je regulován anti-sigma faktorem RsrA (Kang *et al.*, 1999) (Song *et al.*, 2003). Lze proto předpokládat, že trvalé uvolnění vazby SigH-RshA by u *C. glutamicum* 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 delecí v genu *rshA* kódujícím anti-sigma faktor RshA.

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. Izolována celková RNA z obou kmenů respektive jejich cDNA byla použita pro mapování transkripčních profilů metodou DNA Microarray.

Tento experiment byl proveden během mé stáže na pracovišti s laboratoří Microbial Genomics and Biotechnology, Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, SRN.

Výsledky experimentu DNA Microarray jsou zobrazeny na Obr. 6.



Obr. 6 - 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 *a-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, obrázek upraven pro účely této práce (Busche *et al.*, 2012).

Výsledkem experimentu DNA Microarray byla identifikace celkem 83 genů se zvýšenou transkripční aktivitou u delečního kmene v porovnání s kmenem divokým. Některé geny, které byly v práci (Ehira *et al.*, 2009c) 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 (Busche *et al.*, 2012).

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

Analýza promotorů rozeznávaných alternativním sigma faktorem SigH

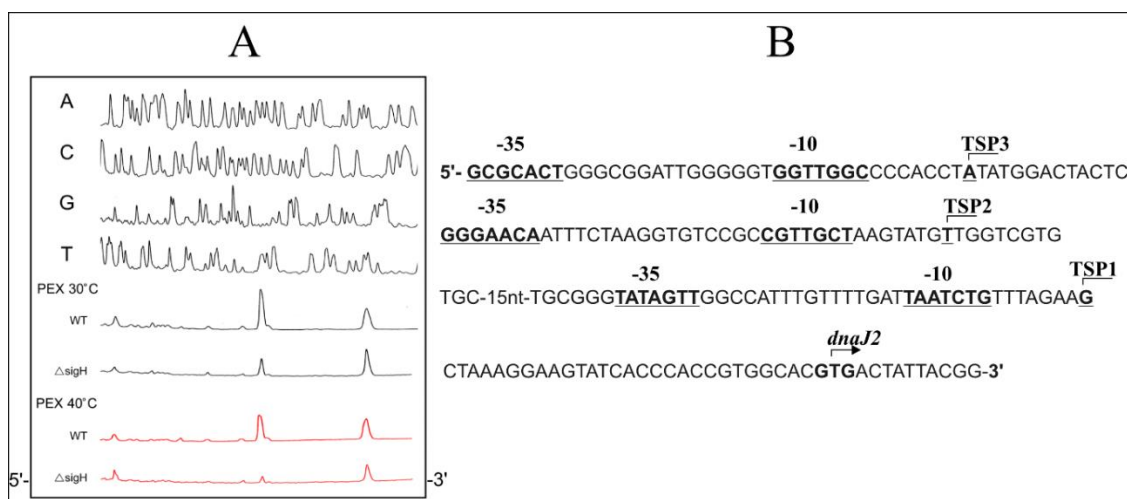
V této práci bylo identifikováno 83 genů, jejichž transkripční aktivita byla zvýšená v delečním kmeni *C. glutamicum* $\Delta rshA$ ve srovnání s divokým kmenem *C. glutamicum*. Byly určeny promotorové -10 a -35 motivy u celkem 45 SigH-dependentních promotorů (Busche, Silar *et al.* 2012). Z těchto SigH-dependentních promotorů byly v této práci analyzovány 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 *promoter-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.

Stanovení aktivit a určení transkripčních startů promotorů genu *dnaJ2* (*cg2515*)

Gen *dnaJ2* kóduje molekulární chaperon účastníci se buněčné odpovědi na tepelný šok, jehož exprese je regulována alternativním sigma faktorem SigH (Ehira *et al.*, 2009b; Busche *et al.*, 2012). 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 (Obr. 7) byly identifikovány tři transkripční počátky (TSP1, TSP2 a TSP3) od kterých byly následně odvozeny tři promotorové oblasti, *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'-gcgcact-3'). Promotorová oblast *P1dnaJ2* je svými konvenčními sekvencemi v oblastech -10 a -35 podobná SigA-dependentním promotorům. (Larisch *et al.*, 2007; Patek & Nesvera, 2011). 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. Bylo proto možné předpokládat, že tento promotor je rozeznáván jiným alternativním sigma faktorem.



Obr. 7 - Výsledky reakcí primer-extension promotorové oblasti genu *dnaJ2*.

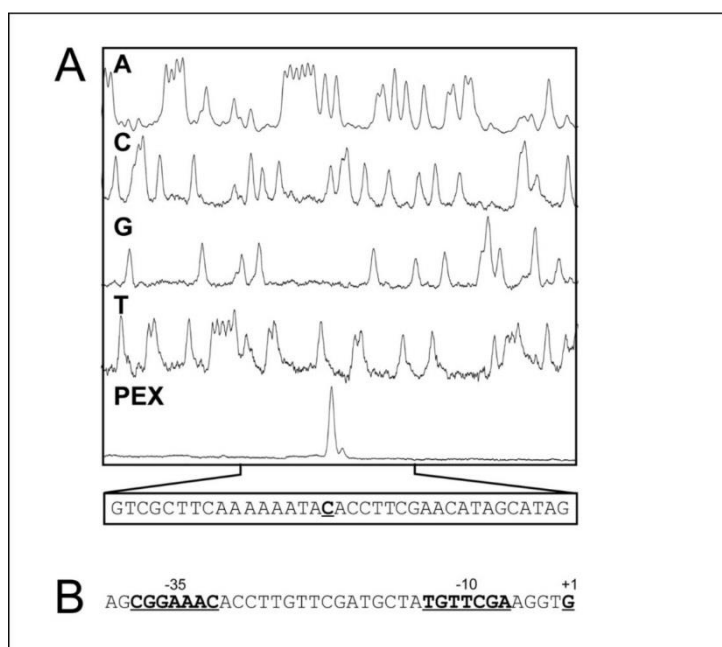
A - Dráhy A, C, G, T označují produkty sekvenační reakce DNA sledovaného konstruktů s použitím stejně značeného primeru CM4, dráhy PEX zobrazují identifikované transkripční počátky u kmenů *C. glutamicum* a *C. glutamicum* Δ*sigH* za standardních podmínek a za podmínek tepelného šoku.

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*.

Transkripční počátky TSP2 a TSP3 a jejich odvozené promotorové oblasti *P2dnaJ2* a *P3dnaJ2* 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).

Stanovení aktivit a určení transkripčních startů promotorů genu *uvrA* (*cg1560*)

Gen *uvrA* (*cg1560*) kóduje protein nukleasu UvrA účastnící se SOS odpovědi a opravy DNA. Na základě porovnání transkripčního profilu delečního kmene *C. glutamicum* Δ *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* Δ *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 *PuvrA* (Obr. 8) s konvenčními motivy -10 (5'-tggtcga-3') a -35 (5'-cggaac-3'). Odvozená promotorová oblast *PuvrA* obsahuje v oblastech -10 a -35 konvenční sekvence typické pro SigH-dependentní promotory (Patek & Nesvera, 2011).



Obr. 8 - 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 (Busche *et al.*, 2012).

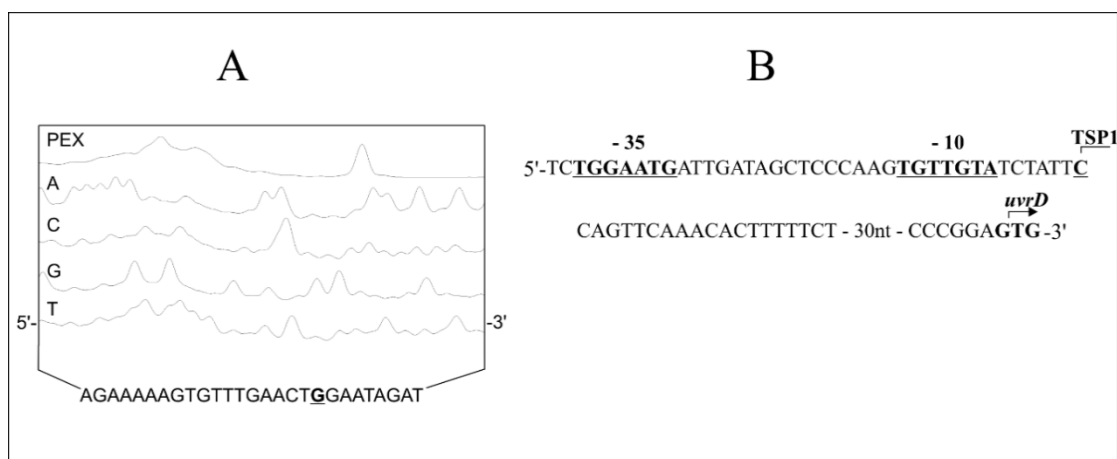
V mezigenové oblasti genů před genem *uvrA* byl na základě znalosti genomové sekvence identifikován tzv. 'SOS box', tedy úsek DNA kam se specificky váže protein LexA (Jochmann *et al.*, 2009). Lze tedy předpokládat, že za standardních podmínek je exprese genu *uvrA* negativně regulována důsledkem vazby proteinu LexA v této oblasti DNA.

Stanovení aktivit a určení transkripčních startů promotorů genu *uvrD* (*cg1555*)

Gen *uvrD* (*cg1555*) kóduje protein DNA/RNA helikasu účastnící se SOS odpovědi a opravy DNA. Na základě porovnání transkripčního profilu delečního kmene *C. glutamicum* Δ *rshA* s divokým kmenem metodou DNA Microarray bylo zjištěno, že exprese genu *uvrD* je zvýšená u delečního kmene Δ *rshA* a podléhá tak regulaci SigH-RshA.

Specifická aktivita CAT při použití promotoru *PuvrD* dosahovala velmi nízkých hodnot jak při 30 °C, tak po tepelném šoku. U kmenů Δ *sigH* a Δ *rshA* se nepodařilo získat hodnoty, které by bylo možné statisticky doložit.

Transkripční analýzou byl identifikován jeden transkripční počátek (Obr. 9) ve vzdálenosti 56 nt od translačního počátku genu *uvrD*, od kterého byla následně odvozena promotorová oblast *P1uvrD* s konvenčními motivy -10 (5'-tgttgta-3') a -35 (5'-tggaatg-3'). Odvozená promotorová oblast *P1uvrD* obsahuje v oblastech -10 a -35 konvenční sekvence typické pro SigH-dependentní promotory (Patek & Nesvera, 2011).



Obr. 9 - 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*.

Z dosažených výsledků vyplývá, že exprese genů *uvrC* a *uvrD* je řízena alternativním sigma faktorem SigH (Busche *et al.*, 2012). Identifikovaný transkripční počátek a od něj odvozená promotorová oblast odpovídá publikovaným SigH-dependentním promotorům (Patek & Nesvera, 2011).

Stanovení aktivity promotoru genu *sigM*

Hodnoty naměřených specifických aktivit promotorové oblasti *PsigM* u všech sledovaných kmenů nevykazovaly zvýšení účinkem tepelného šoku. U delečních kmenů byl po tepelném šoku patrný pokles promotorových aktivit o 35 % (kmen $\Delta sigH$) respektive o 15 % (kmen $\Delta sigM$). Aktivita v kmeni $\Delta sigE$ byla výrazně snížena v porovnání ostatními sledovanými kmeny. Výsledky měření specifických aktivit CAT ukazují na vliv delece v genech *sigH* a *sigM* na aktivitu promotoru genu *sigM* po tepelném šoku.

V promotorové oblasti genu *sigM* byl již dříve 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 této promotorové oblasti se nachází aktivní promotor. Snížená aktivita tohoto promotoru v kmeni $\Delta sigE$ poukazuje na to, že promotor *PsigM* může být specificky rozpoznáván i sigma faktorem SigE.

Stanovení aktivity promotoru genů *cg2661* (DDI) a *cg3405* (ZDO)

Geny *cg2661* a *cg3405* kódují dithiol-disulfidovou isomerasu (DDI) a Zn-dependentní oxidoreduktasu (ZDO). 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.*, 2009a).

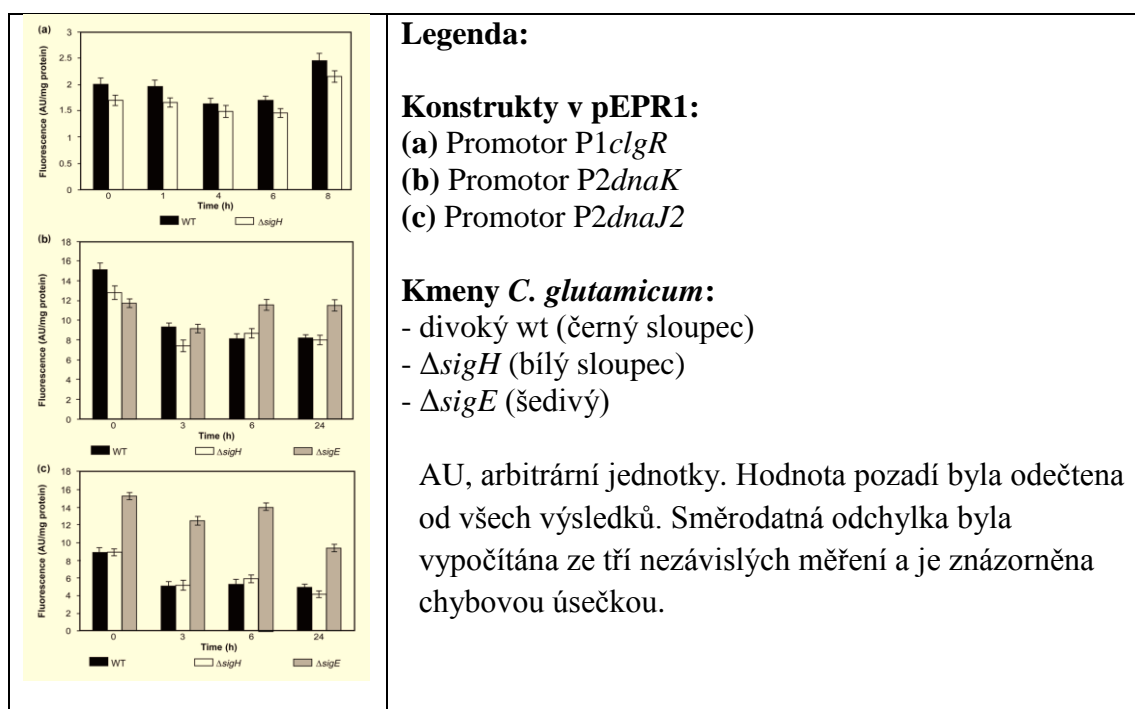
U obou promotorů byla stanovena jejich aktivita CAT za standardních podmínek a po tepelném šoku. Obě sledované promotorové oblasti vykazovaly mírné zvýšení aktivity účinkem tepelného šoku v divokém kmeni *C. glutamicum*, tak i v delečním kmeni $\Delta sigH$. Přítomnost SigH-dependentního promotoru však nebyla dokázána.

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-dependentní (*P1dnaK*) a druhý SigH-dependentní (*P2dnaK*), byla již dříve publikována u operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, kódujícího molekulární chaperony účastníci se buněčné odpovědi na tepelný šok (Barreiro *et al.*, 2004). Podobně u genu *clgR*, který kóduje transkripční regulátor, je exprese řízena jak ze SigH-

dependentního promotoru *P1clgR*, tak ze SigA-dependentního *P2clgR* (Engels *et al.*, 2004).

Pro testování toho, zda SigH-dependentní 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. 10.



Obr. 10 - Aktivita promotorů *P1clgR*, *P2dnaK* a *P2dnaJ2* v různých kmenech *C. glutamicum* za standardních podmínek (30 °C). (Silar *et al.*, 2016)

Z Obr. 10 je zřejmé, že aktivita promotoru *P1clgR* se mírně snížila u delečního kmene *C. glutamicum* $\Delta sigH$ 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 *P1clgR* je rozeznáván i dalším ECF sigma faktorem.

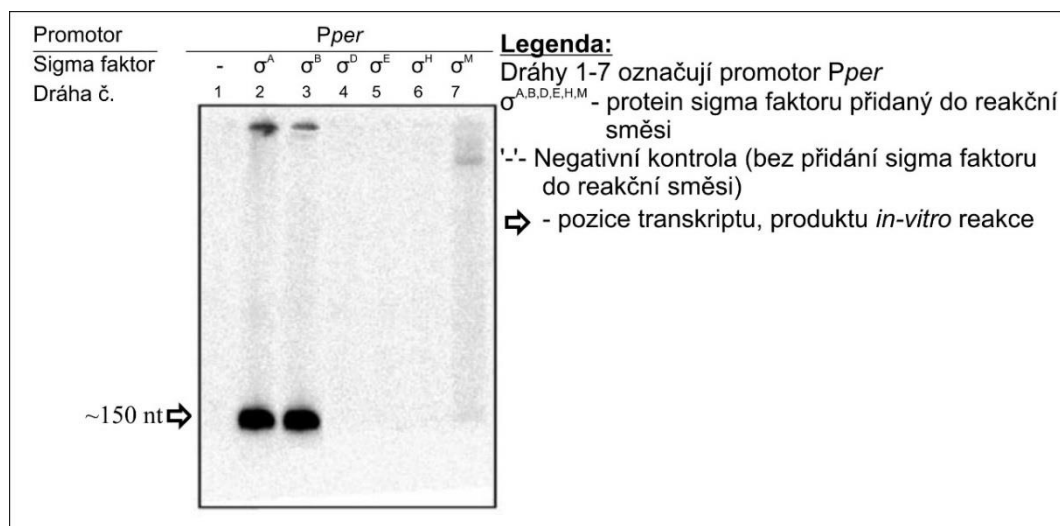
U promotoru *P2dnaK* bylo zjištěno snížení aktivity jenom v exponenční fázi růstu u delečního kmene $\Delta sigH$. U kmene $\Delta sigE$ nebylo pozorováno snížení aktivity během exponenční fáze, ale naopak její mírné zvýšení v pozdních fázích růstu.

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

In-vitro transkripční analýza vybraných promotorů

Pro určení promotorové specifity jednotlivých sigma faktorů byl zkonstruován *in-vitro* transkripční systém, umožňující testování vazby jednotlivých sigma faktorů na konkrétní promotory 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.

V této disertační práci byly postupně testovány následující promotory: *Pper* (silný vegetativní promotor vektoru pGA1) (Nesvera *et al.*, 1997), *P4sigH*, *P2dnaJ2*, *P3dnaJ2*, *P2dnaK*, *P1clgR*, *PtrxB* (gen kódující thioredoxinovou reduktasu) a *PtrxB1* (gen kódující thioredoxin).



Obr. 11 - In-vitro transkripční analýza vegetativního promotoru *Pper C. glutamicum*.

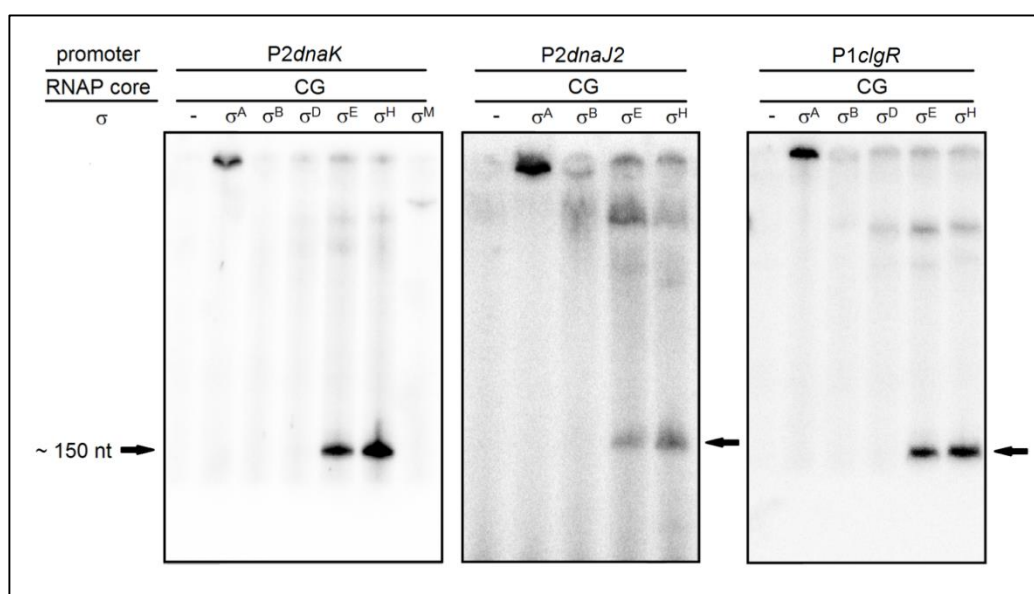
Výsledkem *in-vitro* transkripční reakce u promotoru *Pper* (Obr. 11) jsou dva silné signály v drahách pro SigA a SigB. Žádný signál nebyl patrný v reakčních směsích obsahující pouze RNAP bez přidání sigma faktoru (negativní kontrola) a RNAP holoenzymu s přidáním ECF sigma faktory SigD, SigE, SigH nebo SigM. Získaný výsledek prokázal, že typický *housekeeping* promotor *Pper* (TAGAAT and TATAAT) je

rozeznáván jak primárním sigma faktorem SigA, tak *primary-like* sigma faktorem SigB (Silar *et al.*, 2016).

In-vitro transkripční analýzou promotoru P4sigH vznikl pouze transkript v přítomnosti primárního sigma faktoru SigA. Následné experimenty s použitím alternativních sigma faktorů SigH a SigE nevedly ke vzniku žádného transkriptu.

Ze získaných výsledků promotoru P2dnaJ2 jsou patrné dva primární transkripty, v dráze s přidaným sigma faktorem SigE a v dráze s přidaným sigma faktorem SigH. Žádný transkript naopak nevznikl v reakčních směsích s primárním sigma faktorem SigA, SigB a s ECF sigma faktory SigD a SigM. Při použití promotoru P3dnaJ2 k transkripci *in-vitro* nedošlo (Obr. 12).

Ze získaných výsledků promotoru P2dnaK jsou patrné dva primární transkripty, v dráze s přidaným sigma faktorem SigE a v dráze s přidaným sigma faktorem SigH. Žádný transkript naopak nevznikl v reakčních směsích s primárním sigma faktorem SigA, SigB a s ECF sigma faktory SigD a SigM (Obr. 12).



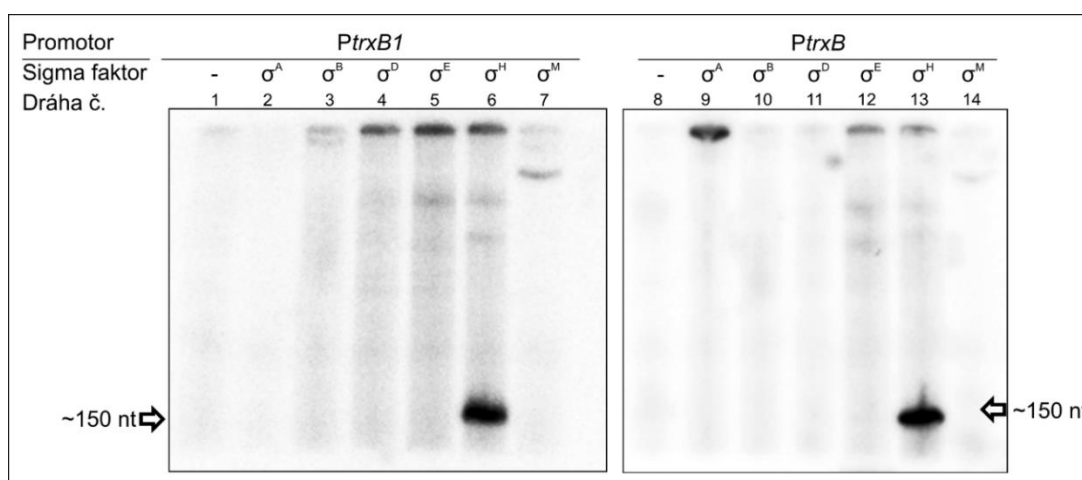
Obr. 12 - *In-vitro* transkripční analýza promotorů P2dnaK, P2dnaJ2 and P1clgR rozeznávaných sigma faktory SigH a SigE u *C. glutamicum*. Promotory použité jako DNA templát a přidané sigma faktory jsou znázorněny v horním řádku. Specifický transkript o velikosti 150 nt je znázorněn šipkou. Viditelné pásy v horní části obrázku zobrazují pravděpodobně nespecifický transkript z vektoru (Silar *et al.*, 2016).

In-vitro transkripci z promotoru P1clgR byly získány dva primární transkripty, jeden v dráze s přidaným sigma faktorem SigE, druhý v dráze s přidaným sigma faktorem SigH. Žádný transkript naopak nevznikl v reakční směsi se sigma faktory SigA, SigB nebo SigD (Obr. 12).

Primární transkript u promotorů *PtrxB* a *PtrxB1* vznikl pouze v reakční směsi v přidavkem sigma faktoru SigH.

Výsledky analýzy *in-vitro* transkripce prokázaly, že promotory *C. glutamicum* mohou být rozeznávány více než jedním alternativním ECF 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 (Silar *et al.*, 2016).

Naproti tomu bylo prokázáno, že promotory *PtrxB* a *PtrxB1*, považované za SigM-dependntní (Nakunst *et al.*, 2007) jsou v podmínkách *in-vitro* rozeznávány sigma pouze faktorem SigH (Obr. 13).



Obr. 13 - *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

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

5. Závěry

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 nepřímo regulována i alternativním sigma faktorem SigH, který se tak podílí i na regulaci exprese vlastního genu. Transkripční analýzou genu *rshA* byly identifikovány 2 možné transkripční počátky odpovídající jednomu promotoru, který obsahuje konzervované 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 fragmentu naklonovaného do vektoru pRLG770. Výsledky *in-vitro* transkripční analýzy dokázaly, že promotory P2dnaJ2, P1clgR a P2dnaK 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 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 a dalších průmyslově využitelných biosloučenin. Výsledky této přispěly k detailnímu popisu komplexních regulačních vztahů na všech úrovních genové exprese u této bakterie. Pochopení těchto komplexních vztahů může být u produkčních kmenů prakticky využito např. k určení vlivu globálních regulačních mechanismů při odpovědi na různé typy stresu na expresi genů kódujících enzymy biosyntézy aminokyselin a dalších látek. Cílem je tento efekt ovlivnit ve směru zvýšené produkce.

6. Introduction

Corynebacterium glutamicum is a non-pathogenic, gram-positive bacterium that was isolated as a glutamate-producing organism in 1950s and has been used for large scale production of amino acids (Gopinath *et al.*, 2012; Hermann, 2003; Leuchtenberger *et al.*, 2005) and other industry used substances, vitamins (Huser *et al.*, 2005), oligonucleotides (Vertes *et al.*, 2012), organic acids (Wieschalka *et al.*, 2012) and others (Blombach & Eikmanns, 2011; Song *et al.*, 2012). Besides this, it is of increasing importance as a model organism for other corynebacteria with biotechnological or medical significance, as well as for the species of related genera (Brune *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2007; Moker *et al.*, 2004). The genes coding for proteins involved in the variety of cellular stress response have been intensively studied in the recent years (Jung *et al.*, 2011; Larisch *et al.*, 2007; Muffler *et al.*, 2002; Oide *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016). The heat-shock response is one of the most studied regulatory networks present in all organisms (Yura & Nakahigashi, 1999). The other factors which activate the cellular cell response include ethanol, disulfide and oxidative stresses, which are also studied in *C. glutamicum*. Transcription initiation is a major point for the regulation of gene expression, and the RNA polymerase (RNAP) is the central enzyme of transcription. The other key part is the sigma factor, which is responsible for promoter-specificity (Murakami *et al.*, 2002). *C. glutamicum* possesses seven sigma factors regulating transcription on a global scale, recognizing the specific promoter signals (Patek & Nesvera, 2011). Five sigma factors (SigC, SigD, SigE, SigH and SigM) are often involved in responses to external stresses and have also been designated extracytoplasmic function (ECF) sigma factors (Engels *et al.*, 2004). It has been shown that SigH is involved in responses to heat shock (Ehira *et al.*, 2009c) oxidative / disulfide stress (Kim *et al.*, 2005b), (Ehira *et al.*, 2008), (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2012). Therefore, the SigH was found to be a major player in cell stress response in *C. glutamicum*. The activity of the SigH ortholog in *Mycobacterium tuberculosis* is controlled by anti-sigma factor RshA that binds to its cognate sigma factor and keep it in the inactive form (Song *et al.*, 2003). After the applying of the stress conditions, the sigma factor is released and can bind with RNAP. In *C. glutamicum* genome, the genes *sigH* and *rshA* are close to each other separated only by 2bp. It's assumed that the role of RshA protein is the anti-sigma factor to SigH.

The main aims of this thesis were the analysis of the operon *sigH-rshA*, the role of sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA in the expression of genes involved in the cellular stress response in *C. glutamicum* and the identification of SigH-dependent promoters and their

transcriptional analysis. The final aim was the construction of in-vitro transcriptional system in *C. glutamicum*.

7. Aims and the hypothesis

This PhD thesis is focused on the role of alternative sigma factors of RNA polymerase on the regulation of transcription of genes involved in the cellular stress response to environmental stress conditions in *Corynebacterium glutamicum*. The main aim of this thesis was to discover the involvement of alternative sigma factor SigH in the gene expression and also the transcriptional regulation of its gene *sigH*. The recent published data suggested that the SigH plays a pivotal role in the cellular response to environmental stress conditions. Its activity is driven by putative anti-sigma factor RshA which gene *rshA* is located 2 nucleotides downstream from the SigH gene.

The thesis had the following aims:

- 1) Transcriptional analysis of operon *sigH-rshA*
- 2) Identification of genes with SigH-dependent promoter
- 3) Transcriptional analysis of genes with SigH-dependent promoter
- 4) Construction of *in-vitro* transcriptional system and its use in promoter analysis

8. Materials and Methods

All material and methods, used in this work, were essentially the same as published in Zemanova *et al.* (2008) , Busche *et al.* (2012), Holatko *et al.* (2012), Silar *et al.* (2016).

9. Results and discussion

The main goal of this thesis was the analysis of the gene expression of genes *sigH* and *rshA* coding the sigma factor SigH and its putative anti-sigma factor RshA in *C. glutamicum*. The specific promoter activity of genes *rshA* and *sigH* were measured under the various stress conditions, then the transcriptional start points were identified and the respective promoter regions were proposed.

The other aim of the thesis was the identification and the transcriptional analysis of genes with the SigH-dependent promoter. The *in-vivo* techniques (chloramphenicol-acetyltransferase (CAT) assay and Gfp assay), DNA Microarray, *primer-extension*, 5' RACE

were used for this analysis. The *in-vitro* transcriptional system was developed in the Laboratory of molecular genetics of bacteria in Microbiology institute, Academy of sciences (Holatko *et al.*, 2012) and used in the promoter analysis.

The *sigH-rshA* operon analysis

The *sigH* gene codes for alternative sigma factor SigH is located near to *rshA* gene separated only by 2 bp (Fig. 1). It was suggested that *sigH* gene forms an operon with the *rshA* gene, coding its potential anti-sigma factor.

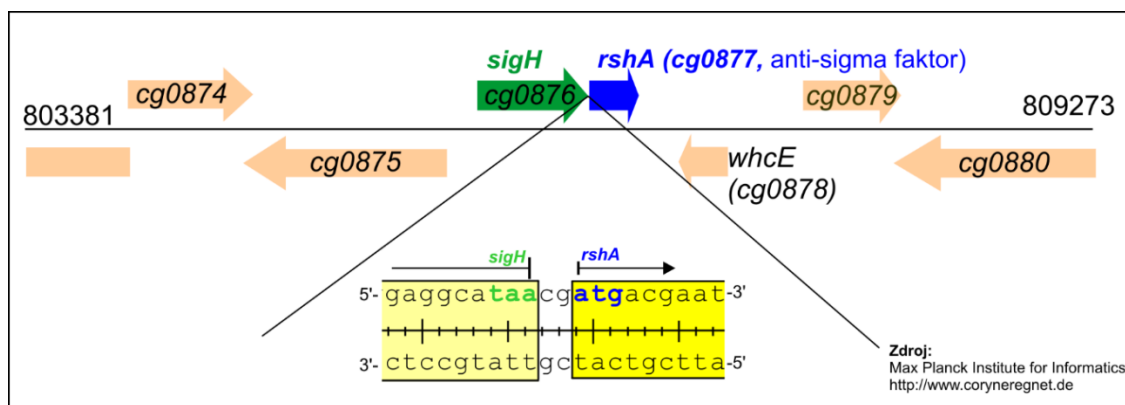


Fig. 1 - Localization of *sigH* and *rshA* genes in the genome of *C. glutamicum* (genomic segment 803381-809273 nt). Both genes are located in close proximity and are separated by a pair of nucleotides cytosine and guanine. Stop codon (*taa*) of *sigH* gene is highlighted by the green colour, the initiation codon (*atg*) of the *rshA* gene is indicated by the in blue. The scheme was made based on the knowledge of *C. glutamicum* genome sequence (Kalinowski *et al.*, 2003).

To analyse the promoter regions of the *sigH-rshA* operon, the promoter regions of *sigH* and *rshA* genes were cloned into the promoter-probe vector pET2 upstream of the promoterless *cat* reporter gene coding for chloramphenicol acetyltransferase (CAT). The promoter activity was assayed as activity of reporter enzyme CAT during normal cell growth at 30 °C and after stress conditions in *C. glutamicum* wild-type strain as well as in *C. glutamicum* mutant strains with deleted genes coding for stress responsive sigma factors.

Measurement of promoter activity of *sigH* gene

The construct containing pET2 vector with cloned promoter fragment was used for determination of promoter activity by measuring the activity of the reporter enzyme CAT in different strains of *C. glutamicum*. CAT activity was measured under standard physiological conditions (30 °C) and after the heat shock (40 °C for 60 minutes).

The results of CAT measurement of the promoter *PsigH* are shown in Fig. 2.

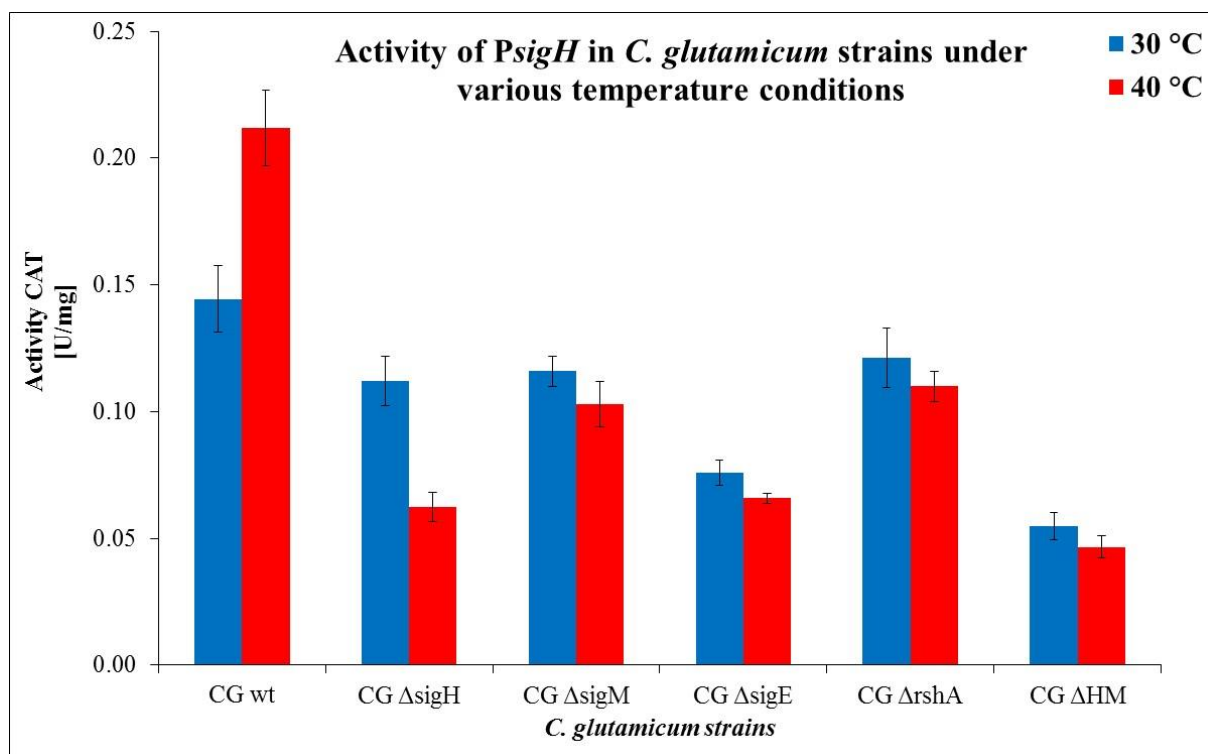


Fig. 2 - Activity of *PsigH* in *C. glutamicum* under standard conditions and after heat shock. Promoter activity was measured under standard physiological conditions (blue column, 30 °C) and after the heat shock (red column, 40 °C, 60 min). Standard deviations of three measurements are depicted by error bars.

The promoter activity increased in *C. glutamicum* wild-type (wt) strain after the heat shock compared to values measured under standard conditions. This result proves that the cloned promoter region contains active promoter. There is a visible decrease of promoter activity in all mutant strains, especially after the heat shock. The biggest difference in the promoter activity was found in the $\Delta sigH$ strain after the heat shock compared to wild type strain.

The next experiments analysed the effect of other stresses on the *PsigH* activity. The promoter activity was measured after the ethanol (10% ethanol in the medium), the disulfide (2 mM diamide in the medium) and oxidative (1% H₂O₂ in medium) stress conditions. Cells were exposed to the above mentioned stress factors for 15 min.

In *C. glutamicum* wild type strain the *PsigH* activity increased after ethanol stress (for 51%), after treatment with H₂O₂ (for 10%) and also after exposure to disulfide stress (for 27%) compared to values measured under standard conditions. The visible increase of promoter activity was found in the $\Delta rshA$ after the disulfide stress while slight decrease was found in the $\Delta sigH$ deletion strain.

The obtained results demonstrated that the activity *PsigH* is influenced by the various stress factors. It can be concluded that sigma factor SigH is involved in the regulation of the expression of its own gene. This finding is consistent with previously published results (Kim *et al.*, 2005a), where it was found that the *sigH* gene expression requires the SigH protein.

Measurement of promoter activity of *rshA* gene

The *PrshA* promoter activity significantly increased after heat shock by 85% in *C. glutamicum* wild strain compared to the values measured under standard conditions. In mutant strain *C. g. ΔsigH* the activity of the *PrshA* decreased after the heat shock. The effect of disulfide stress caused the increase of promoter activity only in the *C. g.* wild type strain (Fig. 3). Visible slight decrease of the promoter activity was found in the mutant strains *ΔsigH* and *ΔrshA* compared to wild type strain.

It was proved that both promoter regions are activated by heat shock. The *sigH* promoter region was activated besides the heat shock also by ethanol, disulfide and oxidative stresses. The promoter activity of *PrshA* and *PsigH* being affected by the presence and deletions in the gene encoding the alternative sigma factor SigH.

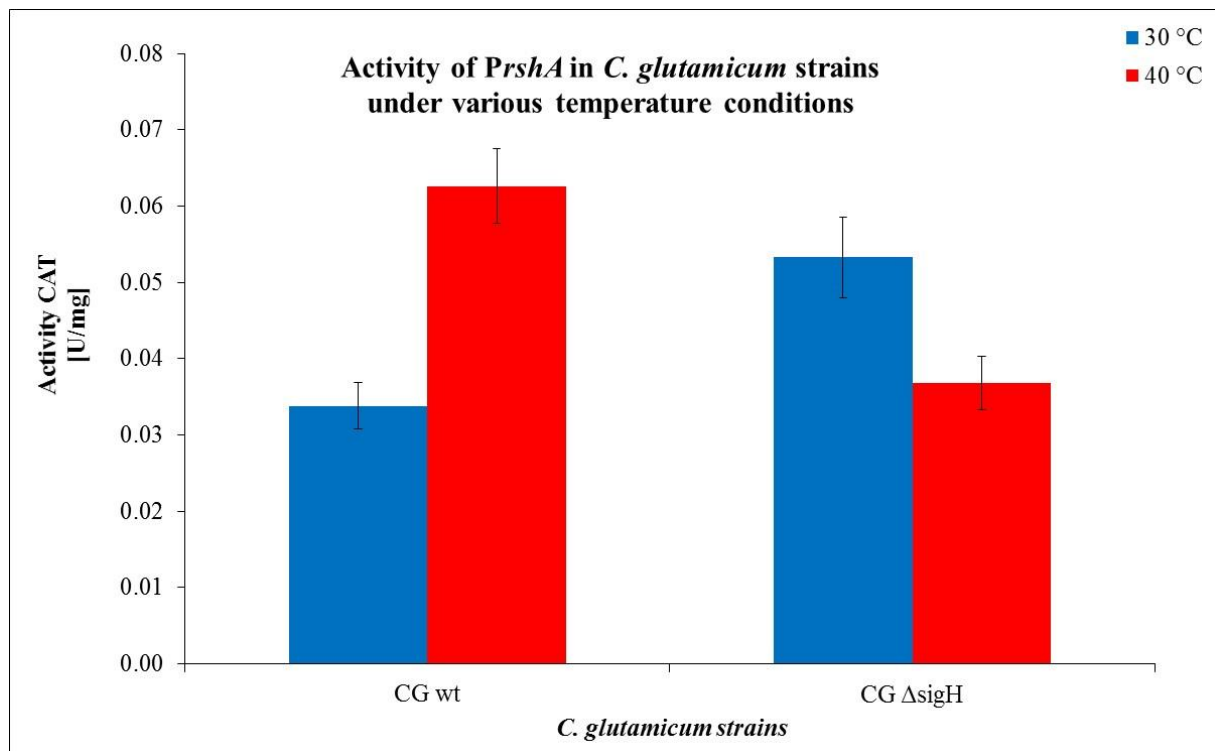


Fig. 3 - Activity of *PrshA* in *C. glutamicum* under standard conditions and after heat shock. Promoter activity was measured under standard physiological conditions (blue column, 30 °C) and after the heat shock (red column, 40 °C, 60 min). Standard deviations of three measurements are depicted by error bars.

The obtained results demonstrated that sigma factor SigH is involved in the regulation of gene expression of *rshA* gene and simultaneously is involved in the regulation of the expression of its own gene. This finding is consistent with previously published results (Kim *et al.*, 2005a), where it was found that the *sigH* gene expression requires the SigH protein.

The determination of transcriptional start points of *sigH* gene

The determination of the 5' ends of the respective mRNAs and thus transcription starts (TSP) of *sigH* gene, the non-radioactive method of primer-extension (PEX) was used. The construct *C. glutamicum*/pET2/*sigH* was cultivated under the same conditions as in the experiment for measurement of CAT activity. Reverse transcription was carried out with primer CM4 (labelled by fluorescein), whose sequence is complementary to the sequence of the vector pET2 downstream of the cloned fragment. The reverse transcription goes in the opposite direction from this primer and reaches the beginning of the transcribed mRNA of the cloned DNA. The resulting single stranded cDNA was analysed on polyacrylamide gel sequencer A.L.F. Sequencing of the cDNA and the DNA construct of the reference was done simultaneously with the same CM4 primer. Both results were visualized using the Fragment Manager program, wherein the position signal from the product of reverse transcription has been assigned to the corresponding nucleotide of the sequenced DNA of the test sample.

The transcription analysis of the *PsigH* region is shown in the Figure 4.

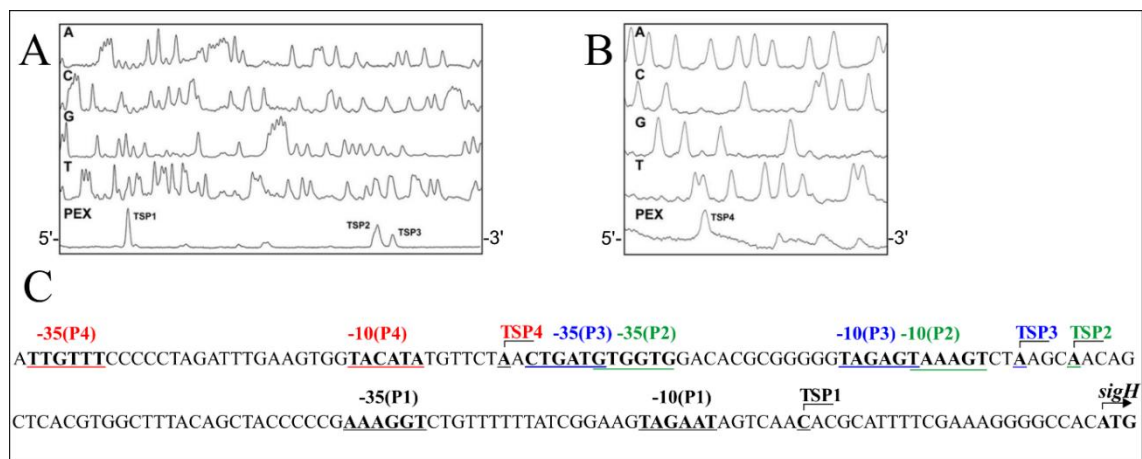


Fig. 4 - Determination of TSPs in the upstream region of the *sigH* gene by primer-extension. (Busche *et al.*, 2012)

- A, B** - Lanes A, C, G and T represent the sequencing reactions using the same primers CM4 as for the primer extensions. The bottom peaks (PEX) represent cDNA synthesized in the reverse transcription using RNA from *C. glutamicum*
- C** - The nucleotide sequence of upstream region of the *sigH* gene (sequence is reverse complementary to the sequence shown in sequencing reactions in part A and B)

The result from primer-extension is shown in Fig 4. Fourth lanes labelled A, C, G, T show a control sequencing reaction in the form of four bases, adenine, cytosine, guanine and thymine. Lanes marked PEX display the sequencing product of the sample. Three TSPs were located within the upstream region of the *sigH* gene. TSP1, TSP2 and TSP3 were mapped at nucleotide A in all cases, 22 nt, 89 nt and 93 nt upstream of the *sigH* start codon, respectively. The putative -10 hexamers of the respective promoters, 5'-TAGAAT-3' (P1), 5'-TAAAGT-3' (P2) and 5'-TAGAGT-3' (P3) are similar to each other and fit well to the consensus -10 hexamer TANANT of SigA-dependent promoters driving the expression of housekeeping genes in *C. glutamicum* (Larisch *et al.*, 2007). The putative -35 sequences of P1 (5'-AAAGGT-3'), P2 (5'-GTGGTG-3') and P3 (5'-CTGATG-3') are less similar to the consensus, which is a common feature of *C. glutamicum* housekeeping promoters. In conclusion, all three promoters seem to be SigA-dependent (Busche *et al.*, 2012).

Several PEX analysis identified the TSP4 located 131 nt upstream of the *sigH* initiation codon. Therefore the TSP4 is shown separately (Figure 2B). Using this transcriptional fusion, a CAT activity of P4*sigH* was determined. This result indicated that there is a promoter within this upstream fragment. The position of TSP4 was further confirmed by additional PEX analysis and also by RACE analysis (data not shown, Chapter Material a Metody in PhD thesis, part 3.2.9.11.). The hexamers -10 (5'-TACATA-3') and -35 (5'-TTGTTT-3'), were located in the appropriate distance from TSP4. The obtained results suggested another SigA-dependent promoter (P4) (Patek & Nesvera, 2011).

The CAT assay was used for determination of the P4*sigH* activity. The *C. glutamicum* wild type strain and *C. g. ΔsigH, ΔrshA* mutant strains were used for the CAT analysis. It was found that the promoter activity is influenced by heat shock and by the diamide stress condition. It was also found that the promoter activity was influenced by the deletion in *sigH* and *rshA* genes. The promoter analysis of *sigH* promoter region given that all four promoters of their correspond areas -10 and -35 are vegetative promoters, apparently recognized by a primary sigma factor SigA. The observed negative influence of *sigH* gene deletion on their promoter activity indicates that gene expression is indirectly influenced by SigH. Similarly, in the *E. coli*, where sigma factor RpoH affects the expression of genes necessary for correct functioning of the organism in exponential growth phase and of which expression is primarily controlled by the sigma factor RpoD (Maeda *et al.*, 2000) (Patek & Nesvera, 2011).

Based on the knowledge of the genomic sequence the feature called. 'SOS box' was identified in the upstream region of the *sigH* gene, which was described as a LexA binding site in *C. glutamicum*. The specific sequence of the SOS box (5'-TGGTACATATGTTCTA-3') was

found to overlap with the proposed -10 region of P4, hereby under standard conditions apparently blocked gene expression from this promoter due to binding of the LexA protein to the DNA region (Busche *et al.*, 2012; Jochmann *et al.*, 2009; Kalinowski *et al.*, 2003).

The transcriptional start point identification of *rshA* gene

The *primer-extension* technique was used in the analysis of the *rshA* promoter region by using the construct *C. glutamicum*/pET2/*PrshA* which was cultivated under standard conditions (30 ° C). Identified transcriptional start points are shown in Fig. 5 and described in the text.

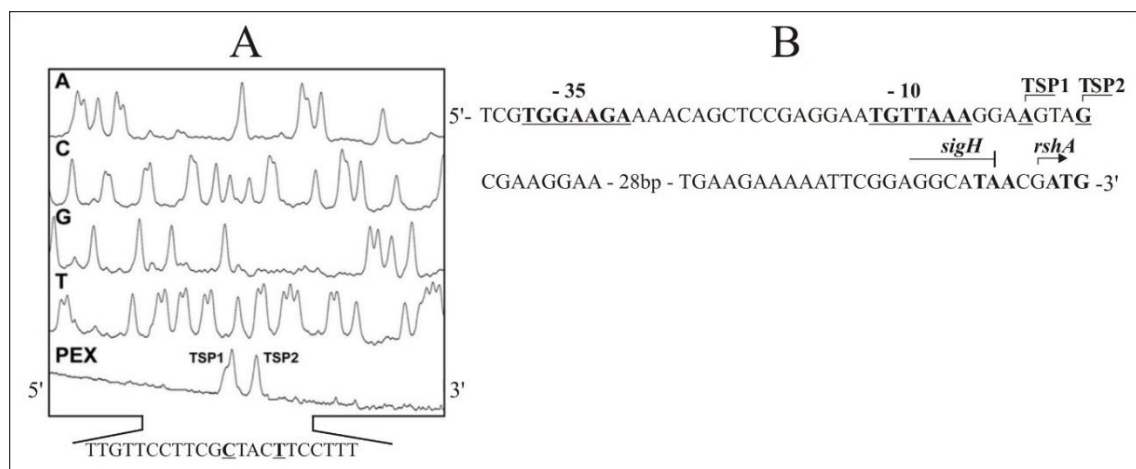


Fig. 5 - Primer-extension analysis of *PrshA* promoter region (Busche *et al.*, 2012).

- A** - Lanes A, C, G and T represent the sequencing reactions using the same primers CM4 as for the primer extensions. The bottom peaks (PEX) represent cDNA synthesized in the reverse transcription using RNA from *C. glutamicum*
- B** - The nucleotide sequence of upstream region of the *rshA* gene (sequence is reverse complementary to the sequence shown in sequencing reactions in part A and B)

Two TSPs were detected at nt G and A, 62 nt and 66 nt upstream of the *rshA* initiation codon (Figure 5). The proposed motifs -10 (5'-tggttaa-3') and -35 (5'-tggaaga-3')(Busche *et al.*, 2012) fit well to the consensus sequence of the -35 and -10 regions of the proposed SigH-dependent promoters of the *M. tuberculosis* (G/TGGAAC/TA -16 nt -C/GGTT) (Raman *et al.*, 2001).

DNA Microarray analysis of *C. glutamicum* Δ *rshA*

Sigma factor SigH is bound with an anti-sigma factor RshA under standard conditions causing its inactivation. Under conditions of cellular stress, the SigH is released from the inhibition. This model of regulation was already described in *C. glutamicum* in the sigma factor SigE, which its activity is regulated by anti-sigma factor CseE (Park *et al.*, 2008). The genes

encoding SigR (an ortholog of *C. glutamicum* SigH) in *S. coelicolor* and SigH in some mycobacteria (e.g. *M. smegmatis* and *M. avium*) are located in close proximity to the genes encoding their anti-sigma factors RsrA and RshA, respectively, which were found immediately downstream (Kang *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2003).

It can therefore be assumed that the sustained-release bindings Sigh-RshA would result in increased gene expression recognized by sigma factor SigH without inducing stress conditions in the environment. To discover genes that are under the control of SigH, the deletion strain carrying the deletion in the *rshA* gene *C. glutamicum* $\Delta rshA$ was constructed. It was expected that SigH would be released from inhibition by the anti-sigma factor in this deletion strain and SigH-dependent genes might be expressed without applying any stress.

A comparative DNA Microarray hybridization analysis was performed using total RNA isolated from *C. glutamicum* and its *rshA* deletion derivative growing under standard cultivation conditions (30 °C). The signal intensity ratio (m) / signal intensity (α) plots deduced from hybridizations are shown in Figure 6. The differentially transcribed genes are listed in the PhD thesis. Altogether, 83 genes in 61 putative transcriptional units were found to be upregulated in the $\Delta rshA$ mutant compared to its parent strain. The highest ratios were observed for the genes previously described as members of the SigH regulon (Ehira *et al.*, 2009c). These data strongly confirmed the assumption that the SigH sigma factor would be highly active in the $\Delta rshA$ strain in which the functional *rshA* gene product is absent and are in line with the notion that RshA plays the role of an anti-sigma factor controlling SigH activity *in-vivo* (Busche *et al.*, 2012).

This experiment was performed during my internship at the centre Microbial Genomics and Biotechnology, Centrum für Biotechnologie, Bielefeld University, Germany in 2010.

Interestingly, the Microarray assay did not confirm several genes previously reported as SigH-dependent: *clpC* (molecular chaperone), *sigB* (sigma factor) operon *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* (molecular chaperones) and the majority of genes of cluster *suf* encoding a Fe-S proteins (*sufB*, *sufD*, *sufC*, *sufS*, *Zuph*) (Ehira *et al.*, 2009b; Engels *et al.*, 2004). This fact may be due to the absence of stress conditions, which are required for transcriptional activation by SigH.

Among the newly identified Sigh-dependent genes include following genes: *uvrA*, *uvrC* and *uvrD* (encoding proteins involved in excision repair of DNA), *mshC* and *mca* (mycothiol synthesis) and the *pup* (ubiquitin-like protein). These results confirmed the assumption the role of RshA protein as anti-sigma factor to SigH. (Busche *et al.*, 2012).

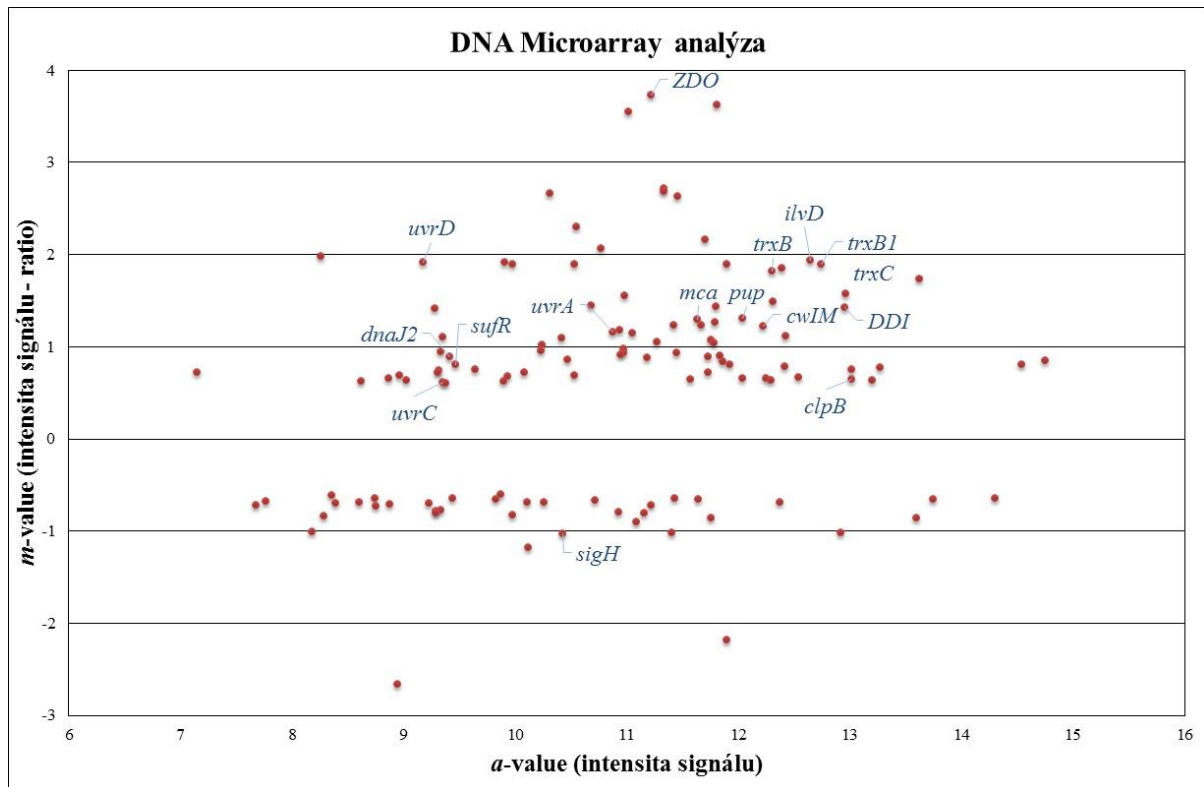


Figure 6 - Microarray analysis of the *C. glutamicum* compared with its $\Delta rshA$. Ratio/intensity plot obtained from the DNA Microarray comparing the transcriptomes of RES167 and DN2 is shown. Total RNA was isolated from two biological replicates grown in minimal medium to the exponential phase and used for hybridization. Genes with increased amounts of mRNA in the $\Delta rshA$ strain have positive ratios, while genes with a higher mRNA amount in the wild type strain have negative ratios, indicated with green diamonds (upregulated) or red triangles (downregulated) respectively; those not exhibiting differential expression are indicated with grey spots. M values of higher than +0.6 or lower than -0.6 (corresponding to fold changes of 1.52 and 0.66, respectively) were considered to be significant. (Busche *et al.*, 2012)

The analysis of promoters recognized by alternative sigma factor SigH

In total 83 genes were identified with the enhanced transcriptional activity in the deletion strain *C. glutamicum* $\Delta rshA$ compared with the wild strain *C. glutamicum*. The promoter motifs -10 and -35 for a total of 45 SigH-dependent promoters were proposed (Busche *et al.*, 2012). The following genes with SigH-dependent promoters were studied in detail in this thesis: *dnaJ2* (*cg2515*, molecular chaperone), *uvrA* (*cg1560*, protein nucleases involved in excision repair of DNA), *uvrD* (*cg1555*, RNA/DNA helicase), *sigM* (*cg3420*, ECF sigma factor), *ddi* (*cg2661*, dithiol-disulfide isomerase), and is *zdo* (*cg3405*, Zn-dependent oxidoreductase). The respective promoter regions were cloned into the promoter-probe vector pET2, transformed into *E. coli* and subsequently into the *C. glutamicum* wild strain and *C. glutamicum* strains carrying different chromosomal deletions in the genes encoding alternative

sigma factors ($\Delta sigH$, $\Delta rshA$, $\Delta sigE$, $\Delta sigM$). Selected constructs were also transformed into *C. glutamicum* $\Delta sigHM$ and $\Delta sigEM$ carrying the double deletions in genes encoding sigma factors.

The specific promoter activity using CAT assay was performed and the transcriptional start points were identified with the proposed promoter regions with the consensus sequences motifs -10 and -35.

The promoter analysis of *dnaJ2* gene (*cg2515*)

The *dnaJ2* gene encodes a molecular chaperone involved in the cellular response to heat shock, whose expression is regulated by alternative sigma factor SigH (Ehira *et al.*, 2009b; Busche *et al.*, 2012). The results obtained from CAT measurement demonstrated that promoter *PdnaJ2* is activated by heat shock and ethanol stress and also that the sigma factor SigH is involved in regulation of the gene expression. The transcriptional analysis (Fig. 7) has determined three transcription start points (TSP1, TSP2 and TSP3) from which the subsequently derived three promoter regions with the proposed following promoter motives: *P1dnaJ2* -10 (5'-taatct-3') and -35 (5'-tatagt-3'); *P2dnaJ2* -10 (5'-cgttgc-3') and -35 (5'-gggaac-3'); *P3dnaJ2* with conventional motifs -10 (5'-ggttgg-3') and -35 (5'-gcgcact-3'). The consensus sequences of promoter region *P1dnaJ2* is similar to SigA-dependent promoters (Larisch *et al.*, 2007). The *P2dnaJ2* promoter region contains in their promoter motifs -35 and -10 typical nucleotide sequences of SigH-dependent promoters (Patek & Nesvera, 2011). The third identified promoter region *P3dnaJ2* does not contain the typical sequence motives of SigH- or SigA-dependent promoter. It was therefore possible to assume that the promoter is recognized by the other alternative sigma factor.

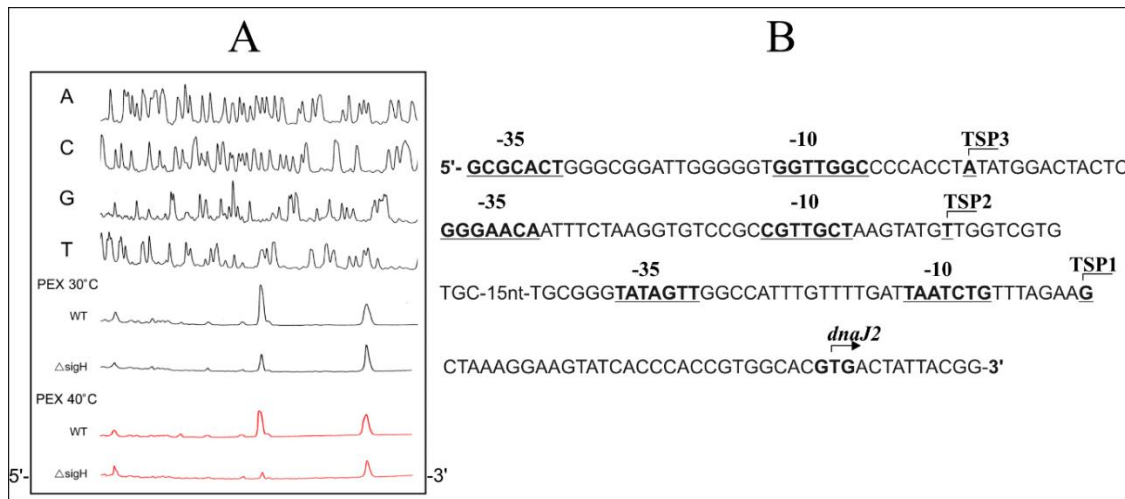


Fig. 7 - The primer-extension analysis of the *dnaJ2* promoter region.

- A** - Lanes A, C, G and T represent the sequencing reactions using the same primers CM4 as for the primer extensions. The bottom peaks (PEX) represent cDNA synthesized in the reverse transcription using RNA from *C. g. wt* and *C. g. ΔsigH* under standard conditions and after the heat shock.
- B** - The nucleotide sequence of upstream region of the *dnaJ2* gene (sequence is reverse complementary to the sequence shown in sequencing reactions in part A and B) .

The obtained data showed that the TSP2 and TSP3 and their suggested promoter regions P2*dnaJ2* and P3*dnaJ2* are located inside the HRCA gene sequence which codes for the transcriptional repressor HRCA. This protein specifically binds to DNA segments called CIRCE (Control Inverted Repeat of Chaperone Expression) (Buttner *et al.*, 2001).

The promoter analysis of *uvrA* gene (*cg1560*)

The *uvrA* gene encodes a protein nuclease UvrA participating on the SOS response and DNA repair. The DNA Microarray results found that the *uvrA* gene expression increased in the deletion strain of *C. glutamicum ΔrshA* and therefore it was assumed that the gene expression is regulated by SigH-RshA complex (Busche *et al.*, 2012). The data obtained from measuring promoter specific activity did not demonstrate the any effect of extracellular stress on the *PuvrA* promoter activity. By *primer-extension* analysis one transcription start point (TSP1) was determined and the promoter region *PuvrA* was proposed (Fig. 8) containing the conventional motifs -10 (5'-tggtcga-3') and -35 (5'-cggaac-3'). The proposed promoter region contains *PuvrA* contains motifs -10 and -35 which consensus sequences are typical for SigH-dependent promoters (Patek & Nesvera, 2011).

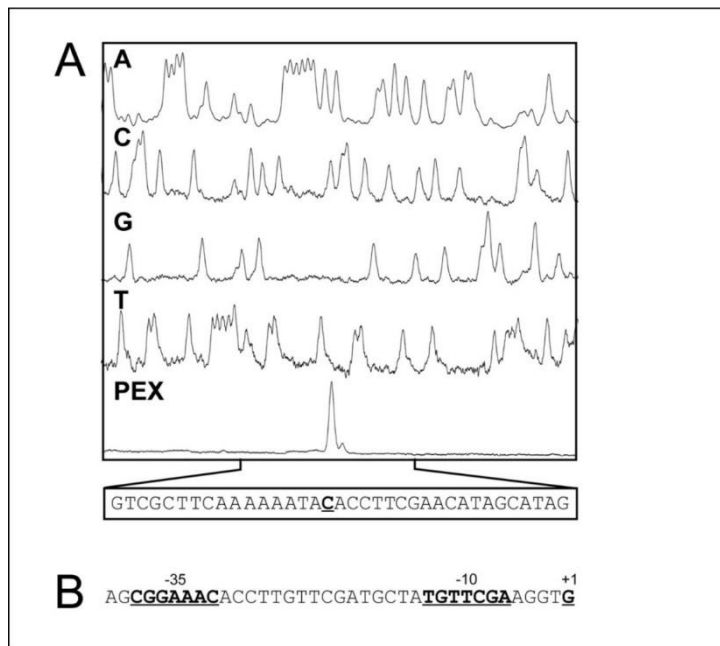


Fig. 8 - The primer-extension analysis of the *uvrA* promoter region. (Busche *et al.*, 2012)

A - Lanes A, C, G and T represent the sequencing reactions using the same primers CM4 as for the primer extensions. The bottom peaks (PEX) represent cDNA synthesized in the reverse transcription using RNA from *C. glutamicum*

B - The nucleotide sequence of upstream region of the *uvrA* gene (sequence is reverse complementary to the sequence shown in sequencing reactions in part A and B)

Based on the knowledge of the genomic sequence the feature called. 'SOS box' was identified in the upstream region of the *uvrA* gene, which was described as a LexA binding site in *C. glutamicum* (Jochmann *et al.*, 2009). The specific sequence of the SOS box (5'-TGGTACATATGTTCTA-3') was found to overlap with the proposed -10 region of *PuvrA*, hereby under standard conditions apparently blocked gene expression from this promoter due to binding of the LexA protein to the DNA region (Busche *et al.*, 2012).

The promoter analysis of *uvrD* (*cg1555*)

The *uvrD* gene encodes protein DNA/RNA helicase involved in the SOS response and DNA repair. Based on the results from DNA Microarray assay, it was found that the gene expression *uvrD* is increased by the deletion strain $\Delta rshA$. This result suggested the present of SigH-dependent promoter.

The results from CAT assay measured in the *C. g.* wild type, $\Delta sigH$ and $\Delta rshA$. The obtained results showed the increase the promoter activity of *PuvrD* after heat shock in the wild type strain. The CAT activity values measured in both mutant strains were not possible to be statistically analysed.

Transcriptional analysis identified one transcription start (56 nt from the translational codon of gene *uvrD*) and the promoter motives of *PuvrD* -10 (5'-tggtgta-3') and -35 (5'-tggaatg-3') were mapped. The identified promoter motives -10 and -35 contain the typical consensus sequences SigH-dependent promoters (Patek & Nesvera, 2011).

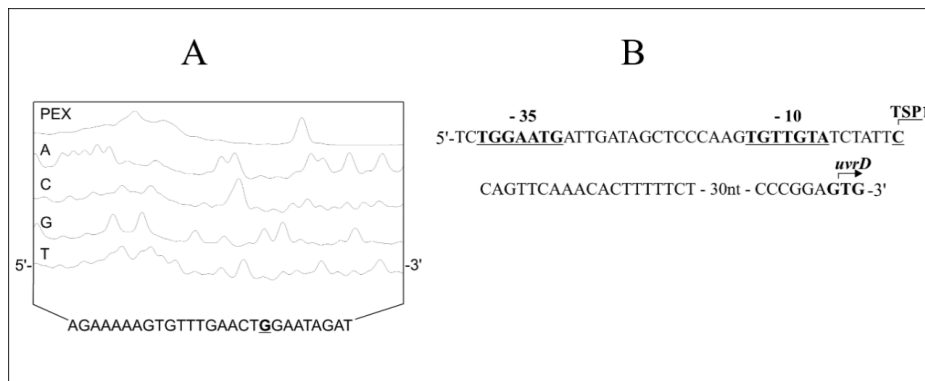


Fig. 9 - The primer-extension analysis of the *uvrD* promoter region.

- A** - Lanes A, C, G and T represent the sequencing reactions using the same primers CM4 as for the primer extensions. The bottom peaks (PEX) represent cDNA synthesized in the reverse transcription using RNA from *C. glutamicum*
- B** - The nucleotide sequence of upstream region of the *uvrD* gene (sequence is reverse complementary to the sequence shown in sequencing reactions in part A and B)

The results showed the sigma factor SigH involvement in the expression of genes *uvrC* and *uvrD*. The proposed promoter regions of both genes correspond to the previously published data.

The promoter analysis of *sigM* gene

The CAT assay was used for measuring the promoter activity of *sigM* gene. The promoter activity of mutant strains decreased by 35% (strain $\Delta sigH$) respectively for 15% (strain $\Delta sigM$) after heat shock. The activity in the $\Delta sigE$ was significantly reduced compared to other investigated strains. The results indicate the effect of deletions in *sigH* and *sigM* genes on the promoter activity especially after the heat shock.

The previous published studies identified one transcriptional start driven from *PsigM* promoter with consensus motives -10 (5'-CGTTC-3') and -35 (5'-TGGTGAT-3') (Nakunst *et al.*, 2007). These authors suggest that the promoter is SigH-dependent. Our results of the measurement of specific activities confirmed that this promoter region contains an active promoter. Decreased activity of this promoter in the mutant strain $\Delta sigE$ suggests that promoter *PsigM* can be specifically recognized and sigma factor SigE.

The promoter analysis of genes *cg2661* (DDI) and *cg3405* (ZDO)

Gene *DDI* codes for dithiol-disulfide isomerase and the product of *ZDO* gene is Zn-dependent oxidoreductase. Both proteins are involved in cellular SOS responses. The orthologs of both genes were found in the *C. glutamicum* R (cgR_2320 and cgR_2964). Within the upstream region of both genes the SigH-dependent promoter was proposed (Ehira *et al.*, 2009c). The specific promoter activity of both promoter regions was measured under standard conditions and after the heat shock. Both studied promoter regions showed a slight increase in activity after the heat shock in *C. glutamicum* wild-type strain and also in the $\Delta sigH$ deletion strain. However, the SigH-dependent promoter was not proved.

The analysis of promoters recognised by two sigma factors

The three TSPs in *dnaJ2* promoter region were located. These results indicated that the the gene expression can be driven by ECF sigma factor and also by vegetative sigma factor SigA. The similar model was already documented in the promoter region of *dnaK* gene, where the promoter P1*dnaK* was found to be SigA-dependent otherwise P2*dnaK* is SigH-dependent promoter.

To test the effects of deletions of stress-responding ECF sigma factors, promoters of the *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* operon encoding proteins involved in heat shock response (Barreiro *et al.*, 2004), the *dnaJ2* gene encoding a chaperone protein (Busche *et al.*, 2012) and the *clgR* gene encoding a transcriptional regulator (Engels *et al.*, 2005) were chosen. It was previously found that all these genes are expressed from two promoters: a housekeeping one (i.e. most probably SigA-dependent) and a SigH-dependent one. For transcriptional fusions with the promoterless *gfpuv* reporter gene of the promoter-test vector pEPR1, DNA fragments only containing active SigH-dependent promoters P2*dnaK*, P2*dnaJ2* and P1*clgR*, respectively were used. The activities of the promoters were assayed as green fluorescence intensity of the reporter in *C. g.* wild type, $\Delta sigH$ and *sigE*. It was necessary to inactivate the promoter region -10 of P2 (gene *clgR*) in the pEPR1/P1*clgR*, because both promoter region are located to close each other.

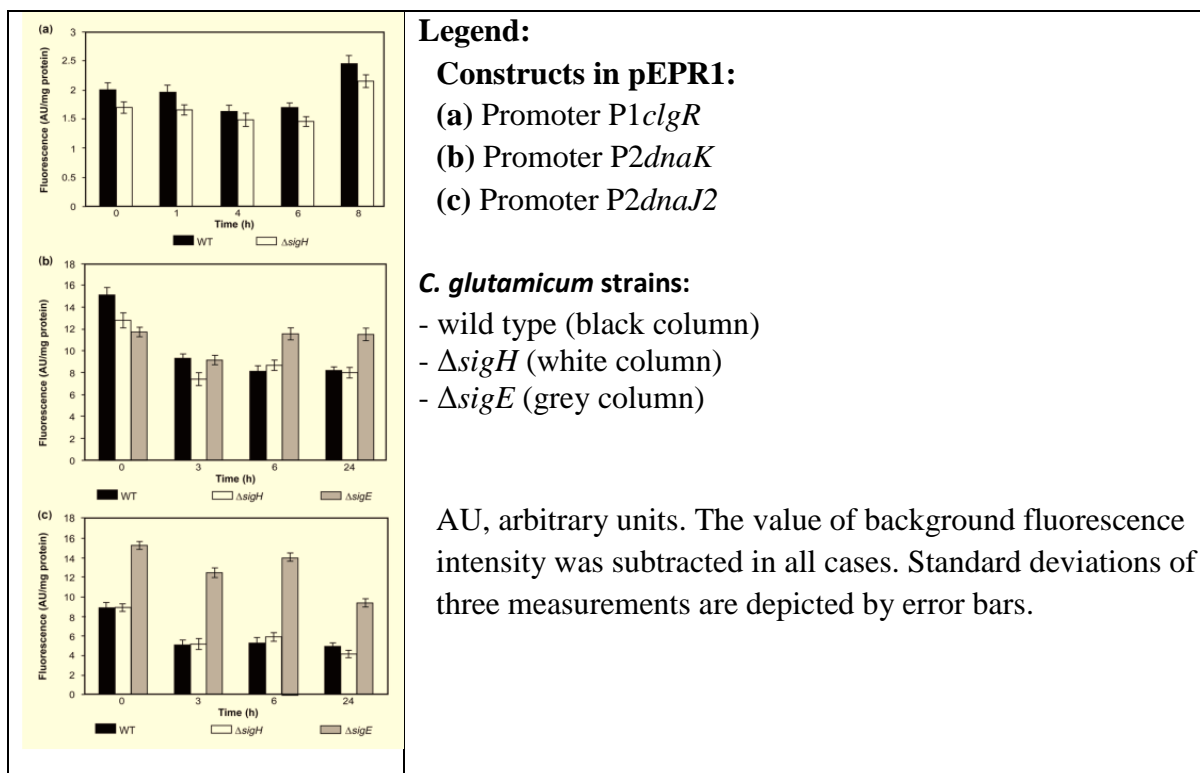


Fig. 10 - The promoter activity of P1clgR, P2dnaK a P2dnaJ2 in *C. glutamicum* strains under standard conditions (30 °C). (Silar *et al.*, 2016)

The results showed on the Fig. 10 showed that the promoter activity P1clgR decreased slightly in the deletion strain of *C. glutamicum* $\Delta sigH$ compared to *C. glutamicum* wild type strain, which confirmed the presence of SigH-dependent promoter. The results also shows residual activity in deletion strain. It can therefore be assumed that the promoter P1clgR is recognized as other ECF sigma factor.

The activity of SigH-dependent P2dnaK promoter was found to be decreased in $\Delta sigH$ only in early exponential growth phase. To test if the observed high residual activity of P2dnaK in $\Delta sigH$ is due to recognizing this promoter by another ECF sigma factor, activity of this promoter was measured also in *C. glutamicum* $\Delta sigE$. However, no decrease of P2dnaK activity was observed during growth of this strain.

Deletion of the *sigH* gene was shown to have no effect on the activity of promoter P2dnaJ2 (SigH-dependent) whereas deletion of *sigE* showed even positive effect on the activity of this promoter. The effect of deletions of both *sigE* and *sigH* in the same strain could not be tested since all attempts to construct *C. glutamicum* $\Delta sigE \Delta sigH$ failed, probably due to a lethal effect of the double deletion (Silar *et al.*, 2016).

***In-vitro* analysis of selected promoter regions**

The *in-vitro* transcription system was constructed and used for the analysis of the recognition specificity of *C. glutamicum* sigma factors and many other aspects of transcriptional regulation including mutational studies of RNAP functions which cannot be performed *in-vivo* (Holatko *et al.*, 2012). The *in-vitro* transcription system also allows to test each of sigma factors specific promoter regions *in-vitro*, without the presence of other transcription factors that can positively or negatively affect gene expression. *In-vitro* transcription system has proved well suited as a system for the detection of distinguishing one promoter in two different sigma factors.

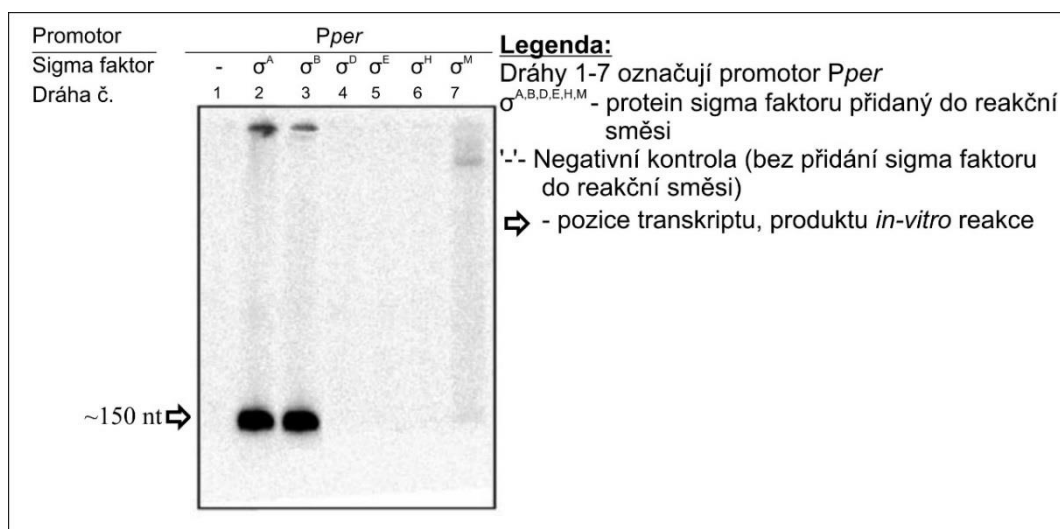


Fig. 11 - *In-vitro* transcription from *C. glutamicum* promoter *Pper*. Promoter used as templates and sigma factors in holo-RNAP are indicated at the top. The specific transcripts are indicated with arrows. The upper bands in some samples probably represent transcripts arising from the vector. (Silar *et al.*, 2016).

The following *C. glutamicum* promoters have been tested by using the *in-vitro* transcriptional system: *Pper* (naturally present in *C. glutamicum* pGA1 plasmid (Nesvera *et al.*, 1997)), *P4sigH*, *P2dnaJ2*, *P3dnaJ2*, *P2dnaK*, *P1clgR*, *PtrxB* (gene encoding thioredoxin reductase) and *PtrxB1* (gene encoding thioredoxin), with the following results:

Results of *in-vitro* transcription reaction with the promoter *Pper* (Fig. 11) showed two strong signals in the lines of added sigma factors SigA and SigB. No signal was in the reaction mixture containing other ECF sigma factors SigD, SigE, SigH or SigM. From this results it was concluded that the *Pper* promoter contains -35 and -10 hexamers (TAGAAT and TATAAT, respectively (Nesvera *et al.*, 1997) is active with the primary-like sigma factor SigB as well as with primary sigma factor SigA.

The only primary transcript with added sigma factor SigA was obtained in the *in-vitro* analysis of P4*sigH* promoter. Subsequent experiments with the use of alternative sigma factors SigH, SigE did not lead to the formation of any transcript.

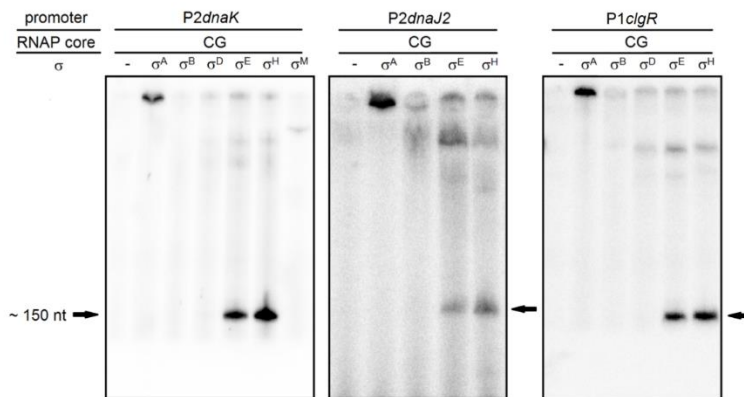


Fig. 12 - *In-vitro* transcription from *C. glutamicum* promoters P2dnaK, P2dnaJ2 and P1cIgR recognized by SigH and SigE. Promoters used as templates and sigma factors in holo-RNAP are indicated at the top. The specific transcripts are indicated with arrows. The upper bands in some samples probably represent transcripts arising from the vector. (Silar *et al.*, 2016)

To broaden testing of overlapping specificity of different *C. glutamicum* sigma factors, the following known SigH-dependent promoters were analysed by in vitro transcription assay: P2dnaK, P2dnaJ2 and P1cIgR. As shown in Fig. 12, using templates containing each of these SigH-dependent promoters, clear signals were obtained not only with the RNAP + SigH holoenzyme, but also with RNAP + SigE. On the other hand, no signal was obtained when RNAP holoenzymes containing primary sigma factor SigA, primary-like SigB or other ECF sigma factors (SigD and SigM) were used for in vitro transcription assay. These results indicate that the examined SigH-dependent promoters were also recognized by SigE. The two stress-responding sigma factors, SigH and SigE, thus overlap in their recognition specificity in these cases. The results suggest that still unknown consensus sequence of *C. glutamicum* promoters recognized by SigE is most probably highly similar to that recognized by SigH (GGAA – 19-20 nt – GTT) (Busche *et al.*, 2012).

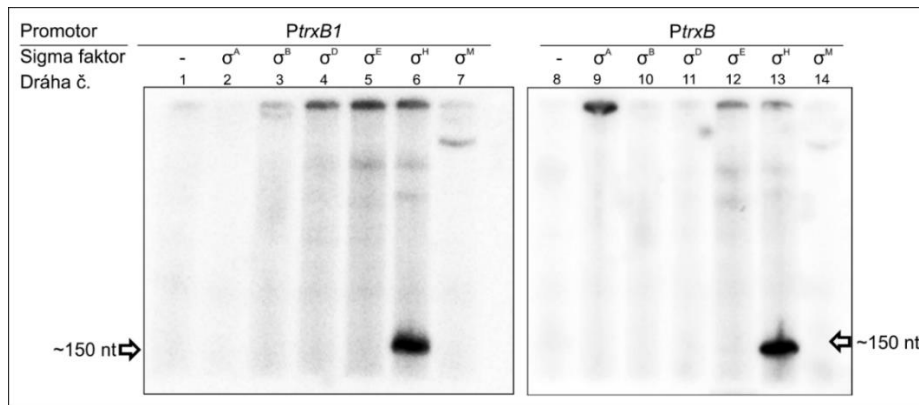


Fig. 13 - *In-vitro* transcription from *C. glutamicum* promoters *PtxB* and *PtxB1* recognized by SigH and SigE. Promoters used as templates and sigma factors in holo-RNAP are indicated at the top. The specific transcripts are indicated with arrows. The upper bands in some samples probably represent transcripts arising from the vector. (Silar *et al.*, 2016)

In contrast, it was shown that promoters *PtxB* and *PtxB1*, considered as SigM-dependent (Nakunst *et al.*, 2007) were *in-vitro* analysis recognized only by sigma factor SigH (Fig. 13).

The presented results suggest that the combination of *in vivo* and *in vitro* techniques is useful for obtaining reliable data on transcriptional regulation by sigma factors of RNA polymerase.

10. Conclusions

The submitted thesis ‘*The role of alternative sigma factors of RNA polymerase on regulation of gene expression in Corynebacterium glutamicum*’, is focused on studies of the regulation of expression of genes encoding proteins involved in the cellular responses to environmental stresses.

The aims of the thesis were the following: (1) transcriptional analysis of the *sigH-rshA* operon coding for the alternative sigma factor SigH and its putative anti-sigma factor RshA; (2) identification of genes whose transcription is controlled by the SigH-RshA system; (3) Analysis of promoter regions of SigH-dependent genes, i.e. – promoter activity assessment under various physiological conditions, identification of transcriptional start points and mapping the promoter motives -35 and -10; (4) the construction of *in-vitro* transcriptional system and its use for analysis of selected promoters.

The following results were obtained:

1) The promoter activity of upstream regions of genes *sigH* and *rshA* was determined. The active promoter regions of both genes were confirmed under various physiological conditions. The results suggested that the deletion in *sigH* gene had a negative influence on the activity promoters of both tested genes. The promoter analysis of *sigH* gene determined 4 transcriptional start points and 4 respective promoter motives -10 and -35 were proposed. All of these identified promoters were suggested to be SigA-dependent. The *sigH* gene expression is controlled by primary sigma factor SigA and indirectly also by alternative sigma factor SigH which is thus involved in expression of its own gene. Two possible transcriptional start points were identified upstream of the *rshA* gene. The proposed prolonged promoter contains the typical motives of the SigH-dependent promoters (GGAA (-35) a GTT (-10). This finding confirms that the expression of *rshA* gene is controlled by sigma factor SigH and also that the protein RshA functions as anti-sigma factor to SigH.

2) A comparative Microarray hybridisation analysis using total RNA isolated from *C. glutamicum* $\Delta rshA$ and the wild type strain was performed. Altogether, 83 genes were found to be upregulated in the $\Delta rshA$ mutant compared to its parental strain. These genes probably contain the SigH-dependent promoter region. The newly proposed genes with SigH-dependent promoter are *uvrA*, *uvrC*, *uvrD* (involved in SOS response), *mshC* and *mca* (involved in response to disulfidic stress). These results confirmed the assumption of the role of RshA protein as an anti-sigma factor to SigH.

3) The promoter activity of genes *uvrA*, *uvrD* and *dnaJ2* was determined and the transcriptional start points were identified with the proposed promoter motives -10 and -35. One transcriptional start point and one SigH-dependent promoter were identified for genes *uvrA* and *uvrD*. The promoter analysis of *dnaJ2* gene revealed three transcriptional start points and therefore three proposed promoters (P1*dnaJ2*, P2*dnaJ2* a P3*dnaJ2*). Based on the -10 and -35 sequences in the promoter regions P1*dnaJ2* and P2*dnaJ2* it was suggested that the promoter P1*dnaJ2* is recognized by primary sigma factor SigA whereas promoter P2*dnaJ2* is recognized by alternative sigma factor SigH. The promoter P3*dnaJ2* does not contain typical -10 and -35 motives of SigA- or SigH-dependent promoters. Therefore the sigma factor specificity of this promoter and its function are unclear.

4) The analysis of SigH-dependent promoters identified the transcriptional start points and then the respective promoter motives -10 and -35 were proposed. Based on the results from measuring the promoter activities in *C. glutamicum* strains with deletions in genes encoding various sigma factors, it was possible to conclude that these promoters could be specifically

recognized by more than one ECF sigma factor. To prove that different sigma factors are involved in recognition of promoters, the *in-vitro* transcriptional system consisting of the reconstituted RNA polymerase and sigma factors was constructed. This *in-vitro* system allows to test the sigma factor recognition specificity to selected promoters cloned in the plasmid pRLG770. The obtained data proved that the promoters P2*dnaJ2*, P1*clgR* a P2*dnaK* are recognized by two stress-responding sigma factors SigH and SigE. A typical housekeeping promoter P*per* was found to interact with the alternative sigma factor SigB (primary like sigma factor) in addition to the primary sigma factor SigA.

In-vitro transcription system thus proved to be a useful direct technique for demonstrating the overlap of different sigma factors in recognition of individual promoters in *C. glutamicum* and sorting such dual promoters into specific classes.

Based on the results, the genes with enhanced transcriptional activity after various environmental stresses were found - mainly the genes with the increased transcriptional level after the heat shock. The transcriptional start points were identified and the corresponding promoter regions were proposed. The promoter analysis used various *in-vivo* techniques. To determine the sigma factor recognition specificity to the promoter region, the *in-vitro* transcriptional system was developed. The use of *in-vivo* and *in-vitro* techniques experimentally proved for the first time in *C. glutamicum*, that the gene expression driven from the promoter is activated by more than one sigma factor. *C. glutamicum* is widely used in industry as amino acid producer. The understanding of the mechanism of gene expression activation under the heat shock condition could be used in the future for construction of amino acid producers by cloning the heat inducible promoters into the upstream region of genes encoding enzymes for amino acid biosynthesis. The potential new heat-inducible and the plasmid-free amino acid producers would be also environmental friendly.

Seznam použité literatury

- 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.
- Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Sola-Landa, A. & Martin, J. F. (2012).** Transcriptional control of the F0F1-ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microb Biotechnol* **6**, 178-188.
- Blombach, B. & Eikmanns, B. J. (2011).** Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Bioeng Bugs* **2**, 346-350.
- 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.
- 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.
- Buttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C. & other authors (2001).** A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **22**, 2908-2935.
- 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., Ogino, H., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2009a).** Regulation of Quinone Oxidoreductase by the Redox-sensing Transcriptional Regulator QorR in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 16736-16742.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2009b).** Regulation of *Corynebacterium glutamicum* Heat Shock Response by the Extracytoplasmic-Function Sigma Factor SigH and Transcriptional Regulators HspR and HrcA. *Journal of Bacteriology* **191**, 2964-2972.
- Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2009c).** 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.
- Engels, S., Ludwig, C., Schweitzer, J. E., Mack, C., Bott, M. & Schaffer, S. (2005).** The transcriptional activator ClgR controls transcription of genes involved in proteolysis and DNA repair in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **57**, 576-591.
- 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.
- Halgasova, N., Bukovska, G., Ugorcakova, J., Timko, J. & Kormanec, J. (2002).** The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiol Lett* **216**, 77-84.
- Hermann, T. (2003).** Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* **104**, 155-172.

- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. & Drauz, K. (2005).** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 1-8.
- 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.
- 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. (2002).** Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **296**, 1285-1290.

- 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.
- 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.
- 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.
- Patek, M. & Nesvera, J. (2011).** Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **154**, 101-113.
- 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.
- 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*.
- 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.
- Vertes, A. A., Inui, M. & Yukawa, H. (2012).** Postgenomic approaches to using corynebacteria as biocatalysts. *Annu Rev Microbiol* **66**, 521-550.
- 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.
- Wieschalka, S., Blombach, B. & Eikmanns, B. J. (2012).** Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**, 449-459.
- 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.

Životopis / Curriculum Vitae

Narozen / Born 19. 02. 1982, Ústí nad Orlicí, Česká republika

February 19, 1982; Usti nad Orlici, Czech Republic

Vzdělání / Education

od / since 2007 postgraduální studium, Katedra genetiky a mikrobiologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Ph.D. study, Department of Genetics and Microbiology, Charles University in Prague, Faculty of Science

2002 – 2007 magisterské studium, Katedra genetiky a mikrobiologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

MSc. Study, Department of Genetics and Microbiology, Charles University in Prague, Faculty of Science

Zaměstnání / Occupation

2013 – současnost Chiltern International, s.r.o., Praha

2013 – 2013 BioTech Europe, Praha

2004 – 2013 Laboratoř molekulární genetiky bakterií, Mikrobiologický ústav AV ČR

Granty / Grants

Účast na grantovém projektu institucionálním výzkumným projektem při MBÚ AV ČR /
This work was funded by Institutional Research Project of the Institute of Microbiology.

- Bilaterální projekt (ČR – Korea) č. 204/07/J012: „Regulace stresové odpovědi u *Corynebacterium glutamicum*“
- Bilaterální projekt (ČR – Německo) č. 204/09/J015: „Mechanismy regulace transkripce řízené sigma faktory v *Corynebacterium glutamicum*“
- Výzkumný záměr Mikrobiologického ústavu AV ČR č. RVO61388971

Stáže / Experiences

- 2010 vědecká stáž v rámci projektu v laboratoři Microbial Genomics and Biotechnology, Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, SRN, (tři měsíce)
scientific stay the laboratory Microbial Genomics and Biotechnology, Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, Germany (three months)
- 2011 vědecká stáž v laboratoři Thermophile and Microbial Biochemistry and Biotechnology Unit na Univerzitě Waikato v Hamiltonu (šest měsíců)
scientific stay at Thermophile and Microbial Biochemistry and Biotechnology Unit, University of Waikato, Hamilton New Zealand (six months)

Seznam publikací / List of publications

Radoslav Šilar, Jiří Holátko, Lenka Rucká, Andrey Rapoport, Hana Dostálová, Pavla Kadeřábková, Jan Nešvera, Miroslav Pátek (2016) Use of in vitro transcription system for analysis of *Corynebacterium glutamicum* promoters recognized by two sigma factors. *Current Microbiology*: DOI :10.1007/s00284-016-1077-x (IF = 1,423)

Tobias Busche, **Radoslav Šilar**, Martina Pičmanová, Miroslav Pátek and Jörn Kalinowski (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* 2012 13:445. doi:10.1186/1471-2164-13-445 (IF = 3,986)

Jiří Holátko, **Radoslav Šilar**, Alžbeta Rabatinová, Hana Šanderová, Petr Halada, Jan Nešvera, Libor Krásný, Miroslav Pátek (2012) Construction of in vitro transcription system for *Corynebacterium glutamicum* and its use in the recognition of promoters of different classes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volume 96, Issue 2, pp 521-529. DOI 10.1007/s00253-012-4336-1 (IF = 3,337)

Martina Zemanová, Pavla Kadeřábková, Miroslav Pátek, Monika Knoppová, **Radoslav Šilar** and Jan Nešvera (2007) Chromosomally encoded small antisenseRNA in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Letters*. 279 (2008) 195–201. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.01024.x (IF = 2,121)

Konference příspěvky / *Conference presentations*

Postery / *Posters:*

Radoslav Šilar; Pavla Kadeřábková; Martina Zemanová; Miroslav Pátek; Jan Nešvera: Involvement of alternative sigma factors in expression of stress responding genes in *Corynebacterium glutamicum*, Biomicroworld, Seville, Spain, November 28 - December 1, 2007

Radoslav Šilar; Pavla Kadeřábková; Martina Zemanová; Miroslav Pátek; Jan Nešvera: **Promoters of stress responding genes in *Corynebacterium glutamicum***, 21st IUBMB & FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai, China, July 31 - August 10, 2009

Radoslav Šilar, Tobias Busche, Pavla Kadeřábková, Miroslav Pátek, Jörn Kalinowski and Jan Nešvera: **The role of sigma factor SigH in transcriptional regulation in *Corynebacterium glutamicum***. Congress of Czechoslovak Society for Microbiology, Stara Lesna, Slovakia, September 15 - September 18, 2010

Přednášky / *Lectures:*

Radoslav Šilar; Pavla Kadeřábková; Martina Zemanová; Miroslav Pátek; Jan Nešvera, **Involvement of alternative sigma factors in expression of stress responding genes in *Corynebacterium glutamicum***, XIIth Meeting of Biochemists and Molecular Biologists, Brno, Česká republika, February 6 - February 7, 2008

Radoslav Šilar; Pavla Kadeřábková; Martina Zemanová; Miroslav Pátek; Jan Nešvera: **Transcriptional Regulation of Stress-Responding Genes in *Corynebacterium glutamicum***, International Conference On Industrial Microbiology and Applied Biotechnology, Galati, Romania, October 8 - October 13, 2008

Radoslav Šilar; Pavla Kadeřábková; Martina Zemanová; Miroslav Pátek; Jan Nešvera: **Role of the alternative sigma factor SigH in cell stress response in *Corynebacterium glutamicum***, Microbial Stress: from Molecules to Systems, May 7 - May 10, 2009